

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYONANOKOMPOZİT DESTEĞE LİPAZIN TUTUKLANMASI

AYŞENUR ÖĞRETMEN

KOCAELİ 2021

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYONANOKOMPOZİT DESTEĞE LİPAZIN TUTUKLANMASI

AYŞENUR ÖĞRETMEN

Doç.Dr. Nurcan KAPUCU

Danışman, Kocaeli Üniv.

.....

Prof.Dr. Afife GÜVENÇ

Jüri Üyesi, Ankara Üniv.

.....

Doç. Dr. Başar UYAR

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 25.06.2021

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve tez konusunda isteklerimi göz önünde bulundurup görüşleri ile çalışmalarına katkıda bulunan, bu zorlu pandemi sürecinde beni tecrübeleri ve bilgisi ile yönlendiren, yardımını, güleryüzünü ve zamanını esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Nurcan KAPUCU'ya,

Tez çalışmamın tüm aşamalarında benimle her koşulda mücadele eden, sabırla bana motivasyon kaynağı olan canım laboratuvar arkadaşım Selda AYDOĞDU'ya ve her daim en içten dostluğuyla yanımda olan Esra ZENGİN'e

Bu tez çalışmasını FYL-2020-2052 nolu yüksek lisans projesi kapsamında destekleyen Kocaeli Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili babam Mehmet ÖĞRETMEN, annem Nimet ÖĞRETMEN, ablam Şeyma ÖĞRETMEN, kardeşim Ali ÖĞRETMEN, maneviyatını benden eksik etmeyen büyükannem Nurten ÖĞRETMEN ve canım eşim Halil MACİT'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran – 2021

Ayşenur ÖĞRETMEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
TABLolar DİZİNİ.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Enzimler.....	3
1.2. Lipazlar.....	4
1.3. Tutuklanmış Enzimler	6
1.3.1. Tutuklama yöntemleri	7
1.3.2. Enzim tutuklanmasını etkileyen parametreler	10
1.4. Tutuklanmış Enzimlerin Kullanım Alanları	12
1.5. Küresel Pazar.....	13
1.6. Destek Çeşitleri	14
1.7. Kitosan.....	18
1.8. Çok duvarlı karbon nanotüpler.....	20
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMALARI	22
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	27
3.1. Malzemeler.....	27
3.2. Cihazlar.....	28
3.3. Deneysel Yöntem	29
3.3.1. Biyonanokompozit destek üretilmesi	29
3.3.2. Biyonanokompozit desteğe lipaz tutuklanması ve ön denemeler	29
3.3.2.1. Tutuklamaya pH ve sürenin etkisi	30
3.3.2.2. Tutuklamaya sıcaklığın etkisi	30
3.3.2.3. Enzim derişiminin etkisi.....	30
3.3.2.4. Çapraz bağlayıcı derişimi etkisi.....	30
3.3.2.5. Destek miktarı etkisi.....	31
3.3.2.6. ÇDKNT miktarının etkisi.....	31
3.4. YYY ile Enzim Tutuklama Optimizasyonu.....	31
3.5. Analiz Yöntemleri	33
3.5.1. Protein tayini.....	33
3.5.3. Enzim kararlılıklarının belirlenmesi.....	35
3.5.4. Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) analizi	35
3.5.5. Termogravimetrik (TGA) analiz.....	36
3.5.6. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi	37
3.5.7. Polarize optik mikroskobu (POM) ile yüzey analizi	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Biyonanokompozit Desteğe TL 100 L Tutuklanması Ön Deneyleri.....	38
4.1.1. pH ve sürenin etkisi.....	38

4.1.2. Sıcaklık etkisi.....	40
4.1.3. Enzim derişiminin etkisi.....	41
4.1.4. Çapraz bağlayıcı derişimi etkisi.....	42
4.1.5. Destek miktarı etkisi.....	44
4.1.6. ÇDKNT miktarının etkisi.....	44
4.2. YYY ile Deneyin Optimizasyonu.....	46
4.2.1. Tutuklama veriminin YYY ile optimizasyonu.....	47
4.2.2. Tutuklanan protein miktarının YYY ile optimizasyonu.....	53
4.3. Biyonanokompozit Desteğin Karakterizasyonu.....	59
4.3.1. FTIR analizi.....	59
4.3.2. TGA analizi.....	60
4.3.3. Yüzey analizleri (SEM, POM).....	62
4.4 Enzim Kararlılıkları.....	64
4.4.1. Termal kararlılık.....	64
4.4.2. pH kararlılığı.....	65
4.4.3. Tekrarlı kullanım.....	67
4.4.4. Depolama.....	68
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR.....	73
EKLER.....	82
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Üç boyutlu lipaz kapalı/açık formu	4
Şekil 1.2.	Lipazların katalizlediği bazı tepkimeler.....	5
Şekil 1.3.	Enzim tutuklama yöntemleri	7
Şekil 1.4.	2013-2018 yılları arasındaki araştırmalarda kullanılan tutuklama yöntemleri	10
Şekil 1.5.	Kapalı formdaki TL 100 L lipazının 3D görüntüsü.....	12
Şekil 1.6.	2018-2023 yılları arası öngörülen mikrobiyal lipaz pazarı büyümesi.....	13
Şekil 1.7.	Küresel pazarda kullanılan enzim kaynakları	14
Şekil 1.8.	Desteklerin sınıflandırılması	14
Şekil 1.9.	Kitinden kitosan eldesi.....	19
Şekil 1.10.	Kitosanın çapraz bağlayıcı ajan ile yaptığı bağlar.....	20
Şekil 1.11.	ÇDKNT (a), iç ve dış çap uzunlukları belirtilen eş merkezli tübüllerin gösterimi(b)	20
Şekil 1.12.	f-ÇDKNT ile biyonanokompozit üretimi.....	21
Şekil 3.1.	Deneyde kullanılan cihazlar	28
Şekil 3.2.	FTIR cihazı	36
Şekil 3.3.	TGA cihazı	36
Şekil 3.4.	POM cihazı görünümü.....	37
Şekil 4.1.	Tutuklama verimi (A) ve protein miktarına (B) pH etkisinin incelenmesi.....	39
Şekil 4.2.	Tutuklama verimine sıcaklığın etkisinin incelenmesi	40
Şekil 4.3.	Tutuklanan protein miktarına (A) ve enzim aktivitesine (B) Sıcaklığın etkisinin incelenmesi	41
Şekil 4.4.	Enzim miktarının tutuklama verimi verimi (A) ve tutuklanan protein miktarına (B) etkisi	42
Şekil 4.5.	GLA derişiminin tutuklama üzerindeki etkisi, (A) Tutuklama verimi, (B) Tutuklanan protein miktarı isi	43
Şekil 4.6.	Destek miktarının tutuklama üzerindeki etkisi.....	44
Şekil 4.7.	f-ÇDKNT'nin tutuklama verimi (A) ve tutuklanan protein miktarı (B) üzerindeki etkisi.....	45
Şekil 4.8.	Tutuklama verimi için hataların dağılım eğrisi	49
Şekil 4.9.	Parametrelerin tutuklama verimi üzerindeki etkisi (A);Sıcaklık etkisi; (B); pH etkisi;(C) Enzim miktarı etkisi	50
Şekil 4.10.	pH ile enzim miktarının tutuklama verimindeki iç etkileşim.....	51
Şekil 4.11.	Tutuklama verimine pH ve enzim miktarının etkisi (a) Üç boyutlu gösterim, (b) İki boyutlu gösterim	52
Şekil 4.12.	Tutuklanan protein miktarı için hataların dağılım eğrisi	55
Şekil 4.13.	Parametrelerin tutuklanan protein miktarı üzerine etkisi (A); Sıcaklık etkisi; (B); pH etkisi ; (C) Enzim miktarı etkisi.....	56
Şekil 4.14.	Tutuklanan protein miktarına sıcaklık ve enzim miktarının etkisi (a) Üç boyutlu gösterim, (b) İki boyutlu gösterim.....	57
Şekil 4.15.	Biyonanokompozit desteğin FTIR spektrumları	60

Şekil 4.16. Biyanokompozit desteğin ısı bozunma termogramları	61
Şekil 4.17. Biyanokompozit desteğin SEM mikrografları	63
Şekil 4.18. Biyanokompozit desteğin POM görüntüleri	63
Şekil 4.19. Biyanokompozit desteğin boyutu	64
Şekil 4.20. Tutuklanmış enzimin termal kararlılığı	65
Şekil 4.21. Tutuklanmış enzimin fosfat (a), Tris-HCl (b) tamponlarındaki pH kararlılığı.....	66
Şekil 4.22. Tutuklanmış enzimin tekrarlı kullanımı.....	68
Şekil 4.23. Tutuklanmış enzimin raf ömrünün incelenmesi a) enzim aktivitesi, b) Bağlı aktivite	69



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Enzimlerin bazı avantaj ve dezavantajları	3
Tablo 1.2. Tutuklanmış enzimlerin bazı avantaj ve dezavantajları.....	7
Tablo 1.3. Tutuklama yöntemlerinin karşılaştırılması	10
Tablo 1.4. Lipazların endüstriyel uygulamaları.....	12
Tablo 1.5. İnorganik ve organik desteklerdeki tutuklama çalışmaları	16
Tablo 2.1. TL 100L lipazının farklı taşıyıcı destek malzemelerine tutuklanması ile ilgili literatür çalışmaları	26
Tablo 3.1. Deneyde kullanılan kimyasalların adı ve özellikleri	27
Tablo 3.2. Deney tasarım bağımsız değişkenleri, kodlanmış ve gerçek değerleri....	31
Tablo 3.3. Merkezi bileşik tasarımı.....	32
Tablo 3.4. Deney desen parametrelerinin kodlanmış ve gerçek değerleri.....	32
Tablo 4.1. Bağımsız değişkenleri içeren deney koşulları için yanıtlar	46
Tablo 4.2. Tutuklama verimi için YYY ile önerilen model tablosu	47
Tablo 4.3. Tutuklama verimi için kuadratik modele ait ANOVA sonucu	48
Tablo 4.4. Tutuklanan protein miktarı için YYY ile önerilen model tablosu.....	54
Tablo 4.5. Tutuklanan protein miktarı için kuadratik modele ait ANOVA sonucu	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

T	: Sıcaklık (°C)
W	: Kütle kaybı (%)
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
M	: Molarite
µl	: Mikrolitre
t	: Tepkime süresi
%T	: Geçirgenlik
nm	: Nanometre
λ	: Dalgaboyu (nm)

Kısaltmalar

CCD	: Merkezi bileşik dizaynı (Central Composite Design)
ÇDKNT	: Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
ECH	: Epiklorohidrin
f- ÇDKNT	: Fonksiyonel Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transforms Infrared Spectroscopy)
GLA	: Gluteraldehit
KLU	: K= Kilo, LU=Lipase unit
KTS	: Kitosan
POM	: Polarize Işık Mikroskobu (Polarized Optical Microscopy)
RSM	: Response Surface Methodology
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)
TL 100 L	: <i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipozyme TL 100 L
TGA	: Termogravimetrik Analiz (Thermogravimetric Analysis)
YYY	: Yanıt Yüzey Yöntemi

BİYONANOKOMPOZİT DESTEĞE LİPAZIN TUTUKLANMASI

ÖZET

Modern kimya endüstrisi enzimlerin seçiciliği ve özgülüğünden faydalanarak biyoproduktlerin üretimiyle daha yeşil bir kimyaya yön çevirmektedir. Endüstride kullanılan serbest enzimlerin aktivitesinin düşürülmeden geri kazanımının ve tekrar kullanımının mümkün olmaması nedeniyle endüstride tercih edilmezler. Lipazlar, yüksek seçicilikleri, çözücüsüz ortamda aktivite göstermeleri, biyobozunur olmaları nedeniyle pek çok avantaja sahip biyobozunur ve biyoyumlu biyo-katalizörlerdir. Biyanokompozit destekler çevre dostu ve yeşil kimya görüşüne uygunluk gösterdikleri için, enzim destek malzemesi olarak son yıllarda oldukça tercih edilen malzemelerdir.

Bu çalışmada kitosan ve fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (f-ÇDKNT) biyanokompozit destek malzemeleri olarak seçilmiştir. Lipazı tutuklamak için çapraz bağlayıcı ajan kullanılmıştır. Biyanokompozit kürelere dönüştürülen destek üzerine *Thermomyces lanuginosus* (TL 100 L) lipazı ilk kez bu çalışma ile tutuklanmıştır. FTIR, TGA ve SEM analizleri ile üretilen desteğin karakteristik bağ yapısı doğrulanmıştır. Sıcaklık, pH, çapraz bağlayıcı derişimi, f-ÇDKNT derişimi, destek miktarı, enzim miktarı ve sürenin tutuklamaya etkileri ön denemelerle incelenmiştir. Bunlar arasından sıcaklık, pH ve enzim miktarının tutuklamaya etkisi Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) kullanılarak optimize edilmiştir. Belirlenen optimum parametrelerle (38.3°C, 7,75 Tris-HCl, 70 mg/ml enzim derişimi) gerçekleştirilen tutuklama verimi ve destek başına tutuklanan protein miktarı YYY ile sırasıyla, %98.77 ve 42.4 mg protein/g destek olarak, doğrulama deneyi sonucunda ise sırasıyla, % 91.76 ve 35.7 mg protein/g destek olarak belirlenmiştir. Serbest ve tutuklanan enzim aktiviteleri zeytinyağı hidroliz yöntemi ile belirlenmiştir. Tutuklanan enzimin 9 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %70'ini koruduğu saptanmıştır. f-ÇDKNT ilavesi ile geliştirilen bu yeni ve özgün biyanokompozit desteğe tutuklanan lipazlar, katalizledikleri tepkimelerde tekrar kullanıma olanak sağladıkları için ticari enzimlere alternatif olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Biyanokompozit, Fonksiyonel Çok Duvarlı Karbon Nanotüp, Kitosan, *Thermomyces lanuginosus*, Tutuklama.

IMMOBILIZATION OF LIPASE ON BIONANOCOMPOSITE SUPPORT

ABSTRACT

The modern chemical industry is moving towards greener chemistry with the production of bio-products, utilizing the selectivity and specificity of enzymes. Lipases are environmentally friendly biocatalysts with many advantages due to their high selection, active in solvent-free conditions, biodegradable. In recent years, bionanocomposite carriers have been preferred as an enzyme support material because they are environmentally friendly, biodegradable, biocompatible, and suitable for green chemistry.

In this study, chitosan and f-multi-walled carbon nanotube (f-MWCNT) were selected as bionanocomposite support materials. *Thermomyces lanuginosus* (TL 100 L) has been immobilized on bionanocomposite beads for the first time with this study. Characterization of support was determined with FTIR, TGA, and SEM analysis. The effect of temperature, pH, concentration of crosslinking, f-MWCNT concentration, bionanocomposite amount, enzyme amount and immobilization time was examined with preliminary trials. Among these, the effect of temperature, pH and enzyme quantity on the immobilization is optimized using the Response Surface Methodology (RSM). The immobilization yield and amount of protein immobilized with the optimum parameters (38,3°C, 7,75 Tris-HCl, 70 mg/ml enzyme concentration) were determined as 98,77% and 42,4 mg protein/g support with RSM, respectively, and 91,76% and 35,7 mg protein/g, respectively, as a result of the verification experiment. It was determined that after 9 uses it retained 70% of its initial activity. Lipase, which has been immobilized for this new and original bionanocomposite support developed with the addition of f-ÇDKNT, can be considered as an alternative to commercial enzymes as they provide reuse in their catalytic reactions.

Keywords: Bionanocomposite, Functional multi-walled carbon nanotube, Chitosan, *Thermomyces lanuginosus*, Immobilization.

GİRİŞ

Son yıllarda iklimlerin değişmesi, küresel ısınmanın ve çevre kirliliğinin artması, dünyanın doğal dengesinin bozulmaya başlaması bilim insanlarının yeni ürün-üretim yöntemlerine olan ilgi ve araştırma taleplerinin artmasına yol açmıştır. Kimya endüstrisinde biyobozunur ürünlerin üretim ve kullanımını giderek yaygınlaşmaktadır.

Günümüzde, yenilenebilir ve biyobozunur biyokompozit malzemeler; akıllı gıda paketlenme, biyomedikal ve ilaç salınımı, biyo-membranlar, otomotiv endüstriyel uygulamaları gibi çeşitli uygulama alanlarında umut vaadedici yeşil malzemeler olarak büyük dikkat çekmektedir [1].

Biyoteknolojik uygulamalarda enzimlerin kullanımının önemi giderek artmaktadır. Lipaz enzimi ticari olarak en çok kullanılan enzimlerden biridir[2]. Lipazlar; çok fonksiyonlu kullanım sağlamaları, kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, proses sonrası ayırma işlemlerinin kolaylaştırmaları nedeniyle tercih sebebi olmuşlardır Bugüne kadar bitki, hayvan ve mikroorganizmalarından izole edilen doğal kaynaklı çok fazla lipaz bulunmaktadır. Hayvan hücrelerinde, çeşitli bitkilerin yapılarında, insan vücudunda ve mikroskobik canlılarda çeşitli kısımlarda (biyolojik sıvılar, organlar, dokular vb.) lipaz bulunmaktadır. Lipaz enziminin; kağıt sanayi, gıda endüstrisi, temizlik endüstrisi, ilaç endüstrisi gibi birbirinden farklı endüstriyel kullanım alanları bulunmaktadır [3]. Lipazların hidrofobik destekler üzerine tutuklanmaları, destek yüzeyi ile lipazın aktif merkez yüzeyleri arasındaki etkileşime bağlıdır[4].Hidrofobik yüzey, lipaz molekülünün açık formdaki halini hareketsiz kılar ve diğer dış ara yüzeyler tarafından açılmasını engelleyerek daha fazla enzimin aktif merkezle etkileşimini sağlar [5]. Desteğin yapısı tutuklanma koşullarını ve enzim katalitik özelliklerini de değiştirebilir [6].

Bu bilgiler ışığında ilerlendiğinde bu tez çalışması için enzim destek malzemesinin hidrofobik özellikte olmasına karar verilmiştir. Hidrofobik destek üzerine lipazın tutuklanmasında fiziksel ya da kimyasal moleküler arası çapraz bağlayıcılar kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında yaygın olarak kullanımı bulunan glutraldehit (GLA) çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. GLA ile çapraz bağlama yapıldığında, enzimin serbest lipaza göre daha kararlı hale geldiği literatürde belirtilmiştir.

Destek malzemesi olarak yüksek mekanik dayanıma sahip, hidrofobik özellikte, biyobozunur doğal bir polisakkarit olan KTS biyopolimeri seçilmiştir. Enzim substrat kompleksinin oluşmasını sağlaması için çok geniş yüzey alanına sahip olduklarından f-ÇDKNT kullanılmıştır. Oldukça geniş yüzey alanı sunmaları sayesinde desteğe adsorblanan enzim miktarını arttırdıklarından dolayı enzim aktivitesi de yüksek olmaktadır [7]. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde çok duvarlı karbon nanotüplerinin, enzim yükleme miktarını artırmalarının yanısıra, enzim kararlılığını, mekanik dayanımını ve termal dayanımını iyileştirme potansiyeline sahip oldukları görülmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, kitosana (KTS) belli oranda f-ÇDKNT eklenmesiyle elde edilen biyanokompozit desteğe enzim tutuklanması ve aktivitesinin iyileştirilmesidir. Bu amaçla *Thermomyces lanuginosus* (TL 100 L) lipazı yüzeyi aktif hale getirilen f-ÇDKNT destekli KTS bazlı biyanokompozit kürelere tutuklanmıştır. YYY kullanılarak ANOVA analizi ile tutuklama optimize edilmiştir. Bu çalışma ile enzim uygulamaları için alternatif oluşturacak, yeni ve özgün bir biyanokompozit destek üretilmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, çalışmanın amacı, çalışmada kullanılan malzemelerin üstünlükleri ve oluşturulacak olan biyonanokompozit desteği anlamak için teorilere yer verilmiştir.

1.1. Enzimler

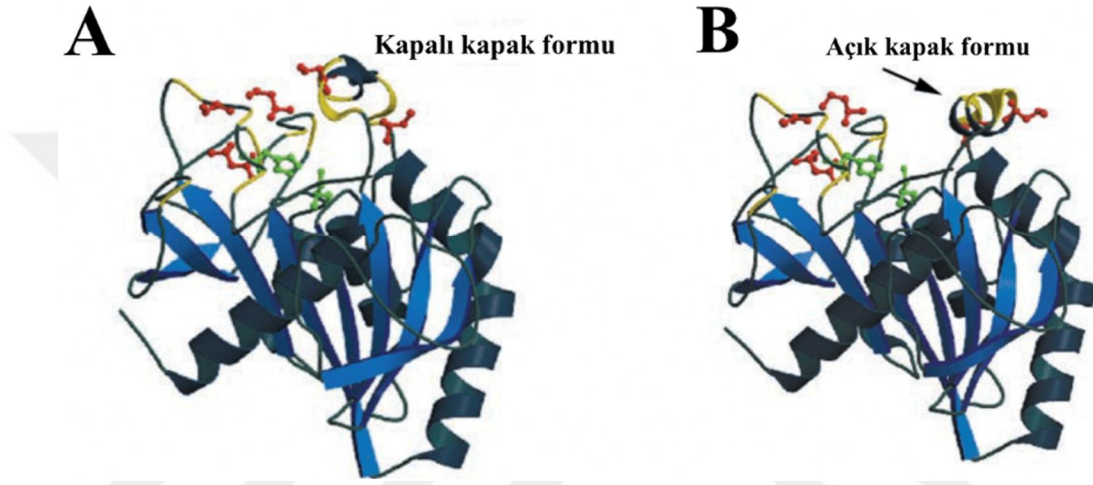
Enzimler canlı hücrelerde kimyasal dönüşümleri katalizleyen, amino asit zincirlerinden oluşan protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Enzimler apoenzim ve ona yardımcı olan kofaktör veya koenzim kısımlarından oluşmaktadır. Protein kısımdan oluşan apoenzime, organik moleküllerden oluşan kofaktör veya vitamin gibi moleküllerden oluşan koenzim kısmı destek olmaktadır. Bitkisel, hayvansal, mikroorganizma kaynaklı elde edilebilirler. En önemli rollerinden biri hücre içerisindeki kimyasal dönüşüm oranlarını hemen hemen hepsini arttırmaktadırlar. Tepkimelerde kalıcı bir değişikliğe neden olmadan veya harcanmadan sentez oranını arttırırlar [8]. Genellikle katalizledikleri tepkimeleri oda sıcaklığı veya nötral sulu koşullar gibi ılımlı şartlar altında gerçekleştirmeleri, seçici substrat spesifikliğı sağlamaları nedeniyle kimya endüstrisinde oldukça kullanımı yaygındır. Organik sentezlerde bu biyokatalizörler diğer enzimlerle farklı kombinasyonlar oluşturur veya biyolojik olmayan reaktiflerle bir tepkimede tek katalizör olarak kullanılabilirler [9]. Enzimlerin sentezlerde uygulanması, kimya endüstrisi ve farmasötik gibi sektörlerde ürünlerin geliştirilmesi için fırsatları temsil etmektedir. Biyoteknolojik alanda enzimlerin kullanımı oldukça yaygındır. Tepkimelerin optimizasyonunun sağlanması için enzimlerin tercih edilmesi ve enzimatik katalizörler ile geliştirilmesi spesifik ürün ve polimer üretilmesine kadar ilerlemiştir [10]. Enzimlerin sahip olduğu bazı avantaj ve dezavantajlar Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Enzimlerin bazı avantaj ve dezavantajları

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Spesifiklik/özgüllük sağlamaları İlmlı koşullarda yüksek aktivite Biyobozunurluk Reaksiyon enerjisini düşürmeleri	Karmaşık molekül yapıları Yüksek üretim maliyetleri Yapısal kırılgnlık Proses sonrası ayırma işlemlerinde güçlük

1.2. Lipazlar

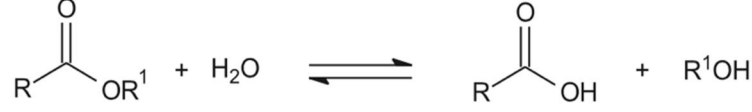
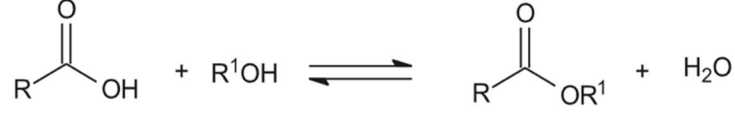
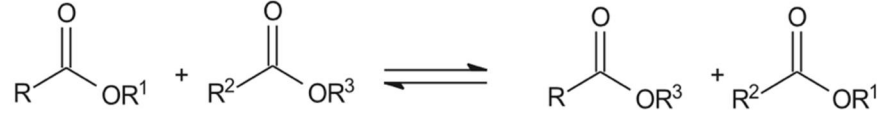
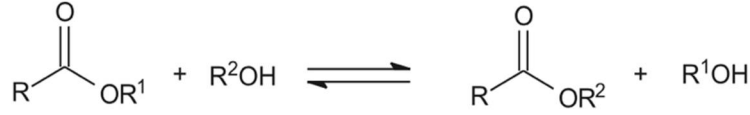
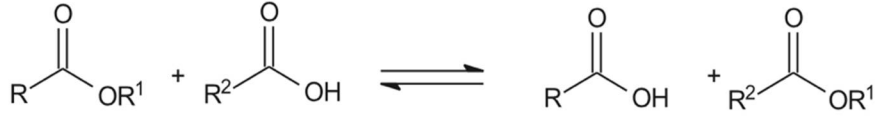
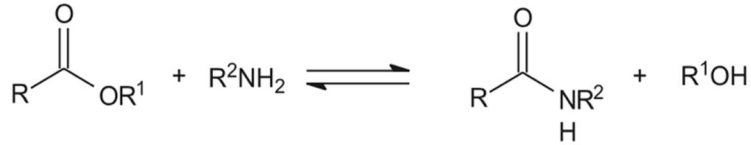
Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar, EC 3.1.1.3), yağ hidrolizi, esterleşme, transesterifikasyon ve aminoliz gibi birçok biyolojik dönüşümü katalizleyen enzim gruplarıdır [11 – 13]. Hidrolaz grubundan olan lipazlar; çok yönlülüğe, organik çözücülere karşı toleransa ve termal stabiliteye sahip olması nedeniyle ticari olarak en çok kullanılan enzimlerden biridir. Şekil 1.1’de lipazların üç boyutlu yapılarıdaki açık ve kapalı kapak formu gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Üç boyutlu lipaz kapalı/açık formu [14]

Katalitik özelliklerine göre hayvansal (pankreatik, hepatik, mide), mikrobiyal (bakteriyel, mantar, maya) veya bitkisel kaynaklı olabilirler. Birbirinden farklı substratlar ile benzerlikleri, sıcaklık, pH kararlılıkları nedeniyle de çeşitli uygulamalarda kullanılabilirler. Lipazlar, biyodizel üretimi için olduğu kadar agrokimya, ilaç ve gıda endüstrilerinde ve yağlı atık arıtmada etkili olarak kullanılabilir [15].

Lipazlar karmaşık molekülleri katalizeyebildikleri için iyi bir alternatif olarak görülmektedir. Sulu ve susuz ortamların ara yüzeylerinde katalizör işlevi görmeleri lipazların önemli özelliklerinden biridir. Lipazların katalizledikleri reaksiyonlarda ara yüzeyin aktivasyonu substratlarının agregate halde olmasından kaynaklıdır. Fakat ara yüzeylerinde lipaz-lipit ilişkisinin nasıl meydana geldiği halen bir araştırma konusudur [16].

A) Hidroliz**B) Esterleşme****C) Trans Esterleşme****D) Alkoliz****E) Asidoliz****F) Aminoliz**

Şekil 1.2. Lipazların katalizlediği bazı tepkimeler [17]

Lipazların çoğu aktif bölgelerinde hidrofilik dış kapaklara sahiptirler. Aktive oldukları zaman bu kapaklar açılır ve yüzeyler arası bağlanma meydana gelir. Açık formdaki kapak, hidrofobik yüzeyler ile etkileşim haline geçerek substratların aktif alana geçmesine izin verir [18]. Lipazların katalizlediği bazı tepkimeler şekil 1.2'de gösterilmiştir.

- *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL 100 L)

Thermomyces lanuginosus (*Humicola lanuginosa*), termofilik bir mantar türüdür [19]. Termofilik mantarlar, 20-60°C arasında yetişen mantar türleridir. Termofiller, mezofillerden daha fazla ısıya dayanıklıdır.

Lipozyme TL 100 L, esterleşme, transesterleşme, ester hidrolizi ve asimetrisizasyonu için kullanılan etkisi yüksek bir katalizördür.

Lipozyme TL 100 L, *Thermomyces lanuginosus* kaynaklı 1,3 spesifik bir fungal lipaz türüdür. Bu termofilik mantar tarafından üretilen lipolaz, amilaz, ksilanaz, fitaz ve kitinaz gibi hidrolitik enzimler ile hemiselülozların parçalanmasına yardımcı olurlar. Bu enzimler hidrolitik özelliklerinden dolayı kimyasal, çevresel ve endüstriyel uygulama alanlarına sahiptir. Gıda, petrol, kağıt hamuru, kağıt ve hayvan yemi endüstrilerinde kullanılırlar [20].

Lipozyme TL 100 L aktivitesi 100 KLU/g olarak bilinmektedir [21]. Renk yoğunluğu enzim aktivitesinin bir göstergesi olarak ileri sürülemez. Serin ve güneş ışığından uzak yerde depo edilmelidir.

1.3. Tutuklanmış Enzimler

Enzimler belirlenmiş bir bölgede fiziksel/kimyasal olarak hapsedilmiş, ya da inert/suda çözünmeyen bir taşıyıcı destek üzerine tutuklanmaktadır [22]. Enzim tutuklaması üzerine araştırmalar 1900'lü yılların ortalarına doğru başlamış olup ilk olarak endüstriyel kullanımı, sentetik rasemik D-L amino asitlerinin *Aspergillus oryzae*'dan elde edilen aminoasilaz ile parçalanmasıdır. [23]. Enzim tutuklama yöntemlerinin esas amacı tepkime ortamından kolaylıkla ayrılabilen ve tepkime sonunda çok az miktarda aktivite kaybıyla birkaç kez kullanılabilen bir biyokatalizör sağlamaktır [24].

Endüstride serbest formda kullanılan enzimlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Lipazların ise endüstriyel işlemlerde kullanım fizibiliteleri birkaç faktöre bağlıdır; endüstriyel koşullar altında enzim kararlılığı, organik çözücülere direnç, pH, sıcaklık, basınç; endüstriyel substrata yönelik enzim aktivitesi, seçiciliği ve özgüllüğü; ve enzim saflığı vb [25]. Başka bir sorun ise enzimlerin serbest halde kullanıldıklarında ortamdaki ayrılmasını zorlaştıran, suda çözünür bir yapıda olmasıdır. Bu nedenle, serbest halde kullanılan enzimler, proses sonunda hala aktivitelerini korumalarına rağmen kaybedilebilirler ve her proses başlangıcında yeni bir enzim yüklemesi yapılması gerekmektedir. Serbest enzimin sürekli olarak yeni yükleme yapılması proses maliyetlerini arttırmaktadır.

Bu işlem enzimlerin endüstrideki kullanım maliyetini arttırdığı için katalizör olarak kullanımını engelleyebilmektedir. Bu gibi dezavantajlar, araştırmacıları enzimler ile katalizlenen tepkimelerde serbest enzim yerine tutuklanmış enzim kullanımına yöneltmektedir [26].

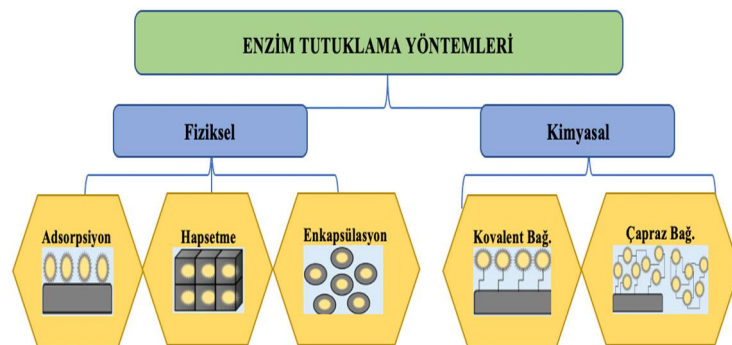
1.3.1. Tutuklama yöntemleri

Enzimlerin endüstride proses maliyetlerini ve enzimlerin aktivitelerinin düşürülmeden geri kazanımları için bazı tutuklama yöntemleri geliştirilmiştir. Enzimlerin tutuklanması yüksek üretim maliyetleri, çözünürlük ve enzimlerin belirli ortam koşullarındaki kararsızlığına karşı geliştirilen en basit çözümdür [27].

Tablo 1.2 Tutuklanmış enzimlerin bazı avantaj ve dezavantajları[28]

Avantajlar	Dezavantajlar
Yüksek enzim substrat oranı	Yüksek maliyet oranı
Tekrarlı kullanım olanağı	Sınırlı uygulamalarda kullanım
Gelişmiş hiperaktivite	Destek sınırlamaları
Süreç kontrolü	Destegin yüzey özellikleri
Arttırılmış fonksiyonel verimlilik	Çapraz bağlayıcı gereksimi sorunları
İyileştirilmiş ürün stabilitesi	Sistemde oluşan ısının neden olduğu deaktivasyon

Tablo 1.2’de tutuklanmış enzimlerin avantaj ve dezavantajları verilmiştir. Enzim tutuklama yöntemleri Şekil 1.3’de gösterildiği gibi enzim-destek arası iç etkileşimlerine göre fiziksel ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Fiziksel yöntemler, enzim ve destek arasında zayıf hidrojen, Van der Walls etkileşimleri ile meydana gelmektedir. Kimyasal yöntemler ise geri döndürülemeyen enzim ve taşıyıcı destek arasında daha güçlü iç etkileşimlerin kurulması yani kovalent bağlanmalar sonucu meydana gelmektedir [29].



Şekil 1.3. Enzim tutuklama yöntemleri

- Adsorpsiyon

Fiziksel yöntemlerden biri olan adsorpsiyon yöntemi hidrofobik, hidrojen, Van der Wall etkileşimleri yardımıyla gerçekleşir. Suda çözünmeyen bir destek üzerine enzimlerin adsorbe edilmesi ile meydana gelmektedir. Bu yöntemde sıklıkla tercih edilen substratlar, katyon-anyon değişim reçineleri, aktif karbon, silika jel, alümina, selüloz, agaroz, cam, seramik gibi doğal malzemelerdir. Maliyeti düşük ve basit bir süreçtir. Difüzyon ile kontrol edilmektedir[29].

Proses ılımlı koşullar altında gerçekleştiği için katalitik etkinliğini kaybetmez ve enzimin protein yapısında çok az kayıp veya hiç değişiklik oluşmaz. İyonik güç, isoelektrik nokta, pH ve yüzeyin karakteristik özellikleri enzimin desteğe adsorpsiyonunu etkileyen parametrelerdir. Çoğunlukla desteğin kapasitesi 2-50 mg protein /gram destek olarak bilinmektedir [30].

- Hapsetme

Enzimlerin kümeleşme eğilimi göstermeleri katalitik aktivitelerini azaltmaktadır. Hapsetme yöntemi, polimer veya gözenekli bir matris içerisinde enzimlerin hareketsizleştirilmesi esasına dayanmaktadır.

Yöntem düşük maliyetlidir. KTS, kalsiyum aljinat, kollajen, selüloz triasetat, poliakrilamid, jelatin, agar, silikon kauçuk, polivinilalkol ve poliüretan gibi farklı matrisler kullanılabilir [31].

- Enkapsülasyon

Bu teknikte, hem organik hemde inorganik destek malzemeler içerisinde çeşitli kapsülleme işlemleri geliştirilmiştir [32]. Normal şartlarda kapsüllenmiş bir biyolojik bozunmaya karşı dayanım göstermektedir. Tekrarlı bir şekilde proseslerde kullanılabilmeyle olanak sağlamaktadır.

Adsorpsiyondan ayıran özelliği ise enzimi tepkime ortamı ile doğrudan temastan koruyarak ortamdaki çözücülerden dolayı meydana gelebilecek inaktivasyonu minimize etmektedir. Bu yüzden diğer yöntemlere göre enzimin daha uzun süre kararlı kalmasına olanak sağlar ve enzimin ortam şartlarından çıkarılması gibi bir proses basamağına ihtiyaç yoktur [33].

- Kovalent bağlama

Enzim tutuklanmasında kullanılan geleneksel bir yöntem olan kovalent bağlanma enzim ile taşıyıcı destek materyali arasındaki genellikle modifiye edilmemiş enzim zincirinin fonksiyonel gruplarını içeren kimyasal tepkimelerin meydana gelmesiyle oluşmaktadır [31]-[34].

Amino, karboksilik, imizadol ve fenolik hidroksil gruplarının fonksiyonel grupları kovalent bağların oluşumu için elverişlidir [35]. Kovalent bağlar, enzimin destek matrisinden sızmasını önleyerek kararlılığının korumasına yardımcı olur. Fakat enzim molekülleri ve destek matrisleri arasındaki kimyasal tepkimelerin oluşması enzimin aktif bölgelerini inaktive edebilir ve bu durum katalitik aktivitesinin düşmesine sebep olur.

- Çapraz bağlama

Biyoteknolojik uygulamalarda enzimi daha kararlı, yeniden kullanılabilir ve düşük maliyetli bir kullanımla sunabilmek için enzim tutuklama yöntemlerinden biridir. Enzim moleküllerinin iç tepkimelerine dayanarak çift fonksiyonlu reaktif ajanların kullanımıyla destek matrislerine tekrarlı kullanımı ve kararlılığı iyileştirmek için sıkı bir şekilde hareketsiz hale getirilirler. GLA, izosiyanat ve N,N-etilen bis maleimid, epiklorohidrin fonksiyonel gruplara sahip reaktiflerdir [29].

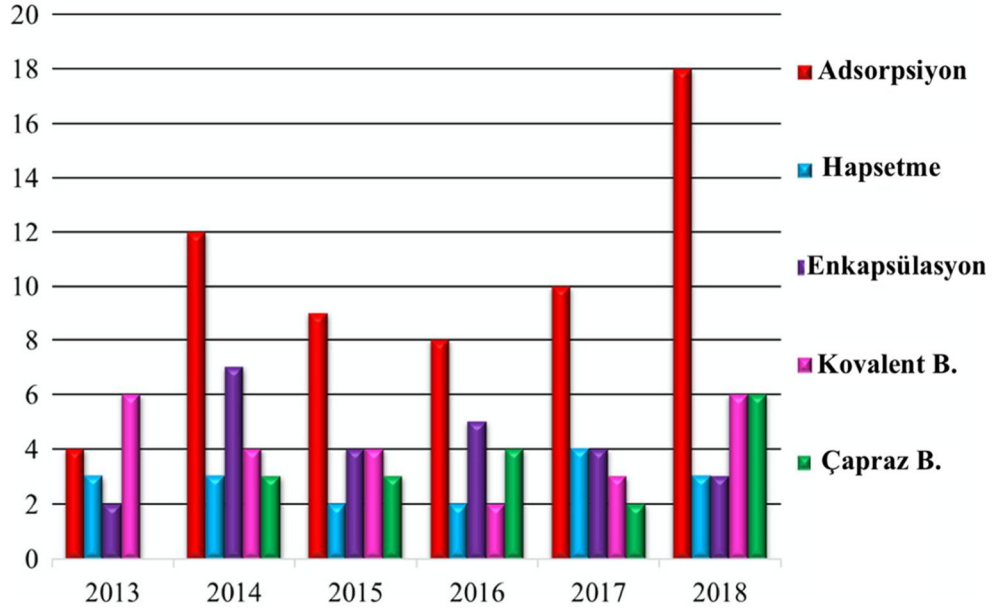
Son yıllarda enzim ve destek arasındaki etkileşimleri geliştirmek için bir çok çalışma yapılmaktadır. Çapraz bağlı ajan yardımıyla enzimin yüzeyinde bulunan amino asit grupları ile molekül içi ve moleküler arası çapraz bağlar oluşturularak gerçekleştirir. Enzimler, çapraz bağlama reaktiflerinin iki ucunun reaktif olmasından dolayı bir taşıyıcı desteğe veya birbirine çapraz bağlı olarak bağlanabilmektedir. Çapraz bağlama enzimin termal kararlılığını artırırken, çapraz bağlama sırasında katalitik aktivitelerini kaybetme gibi riskleri de vardır. Sıcaklık, pH, çapraz bağlayıcı ajan derişimi gibi faktörler çapraz bağlama sırasında enzimi inhibe edebilir [29 -31].

Çapraz bağlama yönteminin amacı enzimi dış ortam koşullarından korumaktır ve ayrıca adsorpsiyonla birlikte uygulanarak enzim sızıntısını en düşük seviyeye indirmektedir [24]. Tutuklama yöntemlerinin karşılaştırılması Tablo 1.3'de verilmiştir.

Tablo 1.3. Tutuklama yöntemlerinin karşılaştırılması[36]

Spesifik özellikler	Adsorpsiyon	Hapsetme	Kovalent bağlama	Çapraz bağlama
Proses öncesi hazırlık	Kolay	Zor	Zor	Zor
Enzim aktivitesi	Düşük	Çok iyi	Çok iyi	İyi
Substrat spesifikliği	Değişmez	Değişmez	Değişken	Değişken
Rejenerasyon	Mümkün	Mümkün	İmkansız	İmkansız
Bağ kuvveti	Zayıf	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Uygulanabilirlik	Düşük	Yüksek	Orta	Düşük
Maliyet	Ucuz	Ucuz	Pahalı	Orta

Literatürdeki çalışmalar referans alınarak Şekil 1.4'de 2013-2018 yılları arasında uygulanan enzim tutuklama yöntemleri incelendiğinde adsorpsiyon ve çapraz bağlayıcı ajan yardımıyla tutuklama yönteminin öne çıktığı söylenebilir [29].



Şekil 1.4. 2013-2018 yılları arasındaki araştırmalarda kullanılan tutuklama yöntemleri[29]

1.3.2. Enzim tutuklanmasını etkileyen parametreler

Enzim tutuklanması yapılırken enzim aktivitesini ve tutuklama verimini etkileyen bazı parametreler vardır; kullanılan enzimin türü ve miktarı, tamponun türü, pH'ı ve derişimi, destek derişimi, sıcaklık ve tutuklama süresi. Bu parametreler enzimin tutuklandığı ortam koşulları için büyük önem taşımaktadırlar.

- Optimum pH

Tutuklanan enzimin en yüksek aktivite/verim sağladığı pH değeri optimum pH olarak tanımlanmaktadır. Bazı lipazlar geniş pH aralıklarında ciddi miktarda kararlılık göstermektedirler. Çoğunlukla lipazlar için optimum pH değeri 4,5 ile 8,5 aralığı olarak bilinmektedir.

Mikrobiyal lipazlar pH 7-9 arasında çalışırken fungal kaynaklı *Thermomyces lanuginosus* pH 7-10 arasında optimum pH aktivite değerini göstermektedir [21]. Optimum pH değerleri genellikle nötral pH'larda veya pH 6 -7,5 aralığına yakın olmakla beraber, asidik pH 4'den alkali pH 8'e kadar geniş bir aralıkta önemli kararlılık gösteren türler de mevcuttur [2].

- Optimum sıcaklık

Her enzimin maksimum aktivite göstererek çalışabildiği bir optimum sıcaklık değeri vardır. Enzimler belli sıcaklık aralıklarında iyi aktivite gösterirken, yüksek sıcaklıklarda protein yapılı olduklarından ötürü denatüre olabilirler. Pankreatik lipazlar 40 °C üzerinde depolandığında aktivitesini kaybederken mikrobiyal kaynaklı lipazlar ısıya karşı direnç gösterirler.

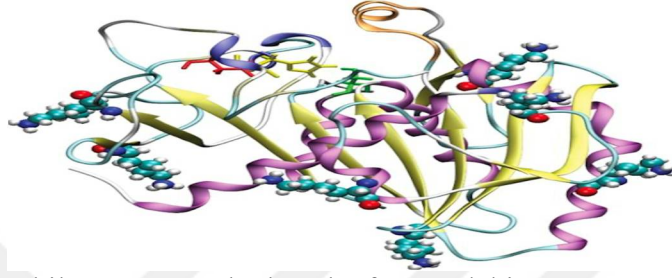
Aspergillus niger, *Rhizopus japonicus* ve *Chromobacterium viscosum* tarafından sentezlene enzimler 50 °C'de çözelti içerisinde termal kararlılığa sahipken, *Humicola lanuginosa* fungalı (*Thermomyces Lanuginosus*) 60 °C'de lipaz üretmektedir. Termofilik bakteriyel lipazlar 40-60 °C'de yüksek enzim aktivitesi göstermektedirler [2]. Bu nedenle, lipazların hangi kaynaktan elde edildiği termal özelliklerini belirleyen bir unsurdur. Serbest haldeki enzimlere göre tutuklanmış enzimler sıcaklığa karşı daha fazla direnç göstermektedirler. Bu yüzden tutuklama sonrası kullanımlar için tutuklama işleminin önemli olduğu söylenebilir.

- Tepkime süresi

Serbest enzimlerin tutuklanma süreçleri için uygun deney koşulları altında tepkimeleri gerçekleştirmeleri gereklidir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde sürenin belli bir değere kadar artması tutuklanma verimine olumlu etki yaparken, belli bir süreden sonra enzim tutuklanması için negatif etki yaptığı veya sabit kaldığı görülmüştür [37- 38].

- Enzim türü ve derişimi

Lipazların yapısal özellikleri gereği aktif merkezleri vardır ve bu aktif merkezlerdeki kapaklarda hidrofobik yapıyı sağlayan bir bölge bulunmaktadır. Lipazın aktif konuma geçebilmesi için bu kapağın açılması gerekmektedir. Şekil 1.5’de *Thermomyces lanuginosus* (TL 100 L) lipazının üç boyutlu kapalı kapak hali gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Kapalı kapak formundaki TL 100 L lipazının 3D görüntüsü [38]

1.4. Tutuklanmış Enzimlerin Kullanım Alanları

Endüstride serbest halde kullanımlarının aksine sağladıkları avantajlar nedeniyle tutuklanmış enzimler tercih edilmektedir. Bu enzimlerin aktif olarak endüstride kullanılabilmesi için kararlı ve ortam şartları altında tamamen işlevsel çalışarak tepkimeleri katalizlemeleri gerekmektedir [39].

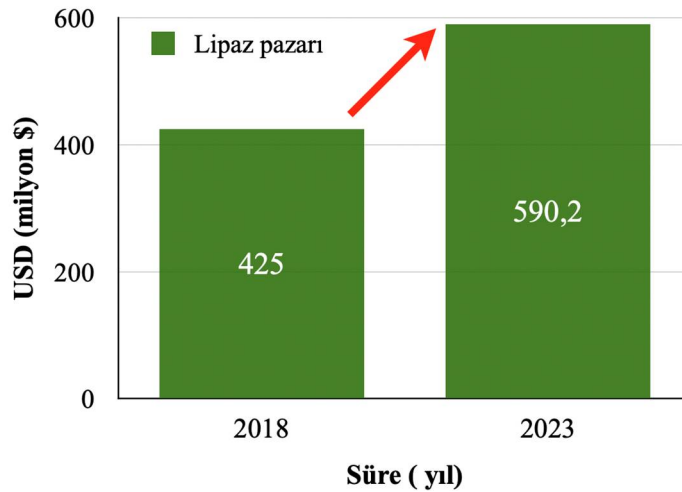
Tablo 1.4. Lipazların endüstriyel uygulamaları [40]

Endüstriyel kullanımı	Kullanım amacı	Nihai Ürün
Unlu mamüller	Lezzet arttırıcı, raf ömrü uzatıcı	Unlu mamüller
İçecek	Aroma geliştirici	İçecekler
Kimya	Enantiyo seçicilik	Kiral kimyasallar
Temizleme	Hidroliz	Deterjanlar
Kozmetik	Esterleşme	Emülgatör, nemlendiriciler
Süt ve süt ürünleri	Tereyağı modifikasyonu	Peynir, tereyağı
Gıdasal yağlar	Trans esterleşme, hidroliz	Kakao yağı, yağ asitleri
Soslar	Kalite geliştirilmesi	Mayonez, krema
Sağlıklı Gıdalar	Trans esterleşme	Sağlıklı gıdalar
Biyoyakıt	Biyoyakıt üretimi	Biyodizel
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Et ve Balık	Lezzet geliştirmesi, yağın parçalanması	Et ve balık ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Eczacılık	Trans esterleşme	Lipitler, probiyotikler

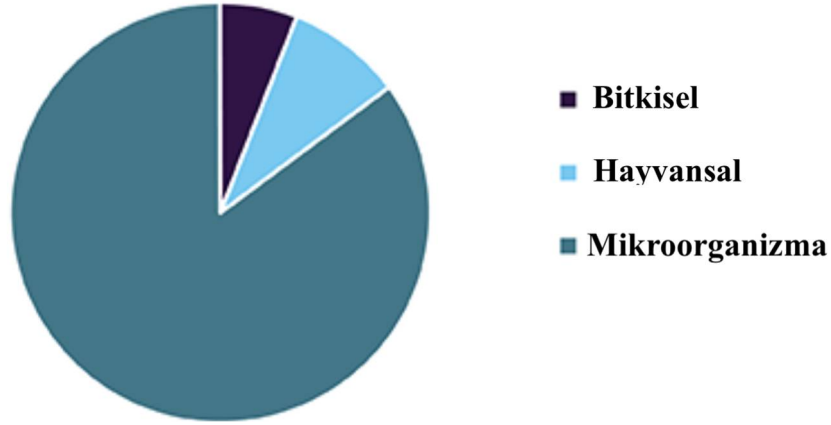
Genellikle endüstriyel alanlarında kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı mikroorganizmalardan elde edilirken, bitkilerden üretilen enzimler de bu alanda tercih edilmektedir. Endüstriyel alanlarda özellikle deterjan, gıda, ilaç, kozmetik, deri, biyoteknoloji (biyosensör), kağıt endüstrisinde kullanım alanları mevcuttur. Yapımında fungal kaynaklı proteazlar kullanılırken, deri işlemlerinde pankreatin kaynaklı enzimler kullanılmaktadır.

1.5. Küresel Pazar

Lipazlar temel olarak sayısız sağlık ve endüstriyel yararlar için enzim pazarında hızla ivme alan pazarlardan biridir. Endüstriyel uygulamaları, küresel enzim pazarının %80'ini ifade etmektedir [9]. Mikrobiyal kaynaklı lipaz pazarının 2018 yılında 425 milyon dolar \$ değer bazında % 6,8'lik bir yıllık birleşik büyüme oranı ile 2023 yılına kadar 590,2 milyon dolara \$ ulaşması öngörülmektedir (Şekil 1.6). Şekil 1.7'de dünya pazarında kullanılan enzim kaynakları içerisinde mikroorganizma kaynaklı enzimlerin en büyük paya sahip olduğu, ardından hayvansal kaynaklı enzimlerin kullanıldığı görülmektedir. Enzim modifiyeli peynirlerin ve süt ürünleri içeren gıdalara olan talebin küresel bazda büyümesi, hayvansal ve bitkisel lipazlara göre mikrobiyal lipazların daha çok avantaj sağlaması nedeniyle mikrobiyal lipazların kullanım hacminde artış beklenmektedir. Hindistan, Çin ve Brezilya gibi ekonomisi gelişmekte olan ülkelerde lipaz hacminin artırılması istenmektedir. 2014 yılındaki en büyük lipaz kullanım hacminin Asya- Pasifik bölgelerindedir [41].



Şekil 1.6. 2018-2023 yılları arası öngörülen mikrobiyal lipaz pazarı büyümesi [41]

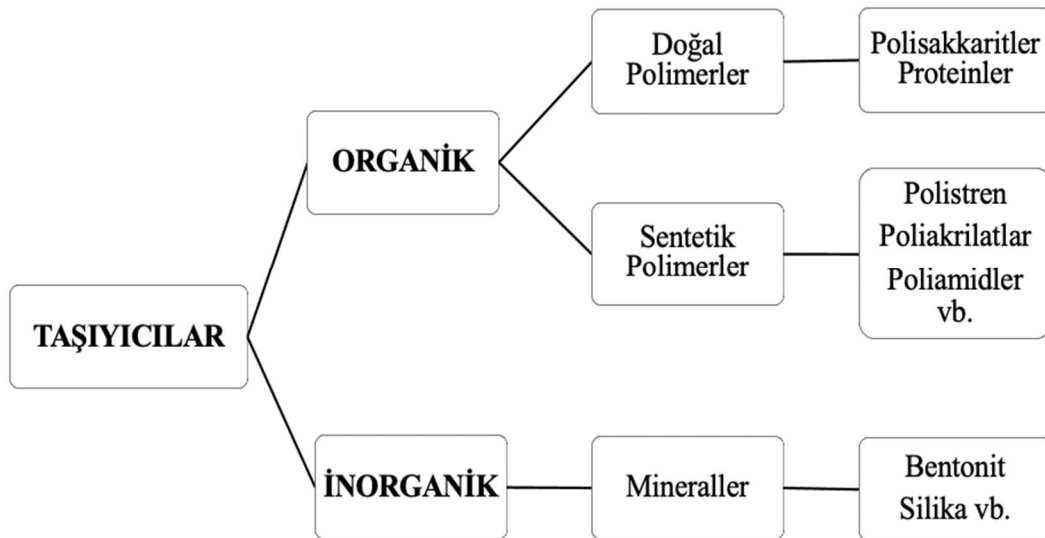


Şekil 1.7. Küresel pazarda kullanılan enzim kaynakları [42]

1.6. Destek Çeşitleri

Enzimlerin taşıyıcı destek üzerinde tutuklanması için uygun destek seçimi oldukça önemlidir. Enzim tutuklama çalışmalarında taşıyıcı destek maddesi olarak organik, inorganik, sentetik polimerler, nano malzemeler gibi çeşitli destek malzemeleri kullanılabilir.

Hidroksil, karboksil ve amino grupları gibi aktif grupları taşıyıcı içermeli ve bu gruplar enzim-destek tutuklaması sırasında aktivitelerini kaybetmemeli ve enzimi inhibe etmemelidir. Enzim destek malzemesi kolaylıkla bulunabilmesi, enzimin görevini yerine getirebilmesi için geniş yüzey alanına ve minimum seviyede difüzyon kısıtlaması ile substrat ve ürün taşınımını sağlamalıdır [43].



Şekil 1.8. Desteklerin sınıflandırılması

Enzimin tutuklanması için destek malzemesi seçilirken mekanik dayanım, kimyasal dayanım, termal dayanım, yüksek tutuklama verimi, biyoyumluluk, mikrobiyal saldırılara karşı dirençli olma, toksik olmama, tekrarlı kullanıma uygun olma gibi özellikler göz önüne alınabilir [44- 45]. Desteklerin sınıflandırılması Şekil 1.8’de gösterilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda çevre dostu, yeşil malzemelerin kullanımıyla öne çıkan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen KTS temelli destek malzemesi tercih edilmektedir.

Enzimin tutuklanması için kullanılacak olan bir destek malzemesinden beklenen özellikler:

- √ Kimyasal kararlılık
- √ Termal kararlılık
- √ Tekrarlı kullanım
- √ Ulaşılabilirlik ve uygun fiyat
- √ Fonksiyonel reaktif grupların bulunması
- √ Biyoyumluluk
- √ Enzim için yüksek ilgi
- √ Tepkime koşullarında çözünmemesi [46].

Organik destekler, enzim uygulamaları için standart bir destek malzemesi yoktur bu yüzden uygulama/proses’de istenilen özelliğe göre enzim taşıyıcı malzemesi organik veya inorganik seçilebilir. Organik destekler genellikle doğal ve sentetik polimerler olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. Doğal polimerler; polisakkaritler, proteinler gibi doğada bulunan destekler iken polistriten, poliakrilatlar gibi sentez ürünleri sentetik polimerler olarak bilinmektedir. Sentetik polimerlerin sağladığı en büyük avantaj ise uzun polimer zincirini oluşturan monomerlerin enzimin tutuklanacağı prosese göre uygun olarak seçilebilmesidir [47].

Biyopolimerler, sentetik polimerlere alternatif olarak sunulan biyo (doğal) kökenli polimerlerin enzim destek materyalidir. Kitin, KTS, selüloz, keratin, karregen, aljinat, kolajen enzim tutuklamasında kullanılan bazı biyopolimerlere örnek olarak gösterilebilir [48- 49].

İnorganik destekler, doğada bolca karbon kaynaklı malzemeler, metal oksitler ve mineraller inorganik destekleri oluşturmaktadır. Mineraller, tepkime koşulları altında iyileştirilmiş enzim kararlılığına sahip geri kazanılabilir biyokatalitik prosesleri meydana getirmek için destek malzemesi olarak kullanılabilirler. Saflaştırma prosesi olmadan elde edilen mineraller maliyet olarak daha ekonomik bir çözüm sunar. Kolaylıkla doğada bulunması ve mükemmel biyoyoumluluk sağlarlar [50- 51] .

Silika, iyi mekanik özelliklere, yüksek kimyasal ve ısı dayanımına sahip olması nedeniyle sıklıkla kullanılan inorganik bir enzim desteğidir. Gözenekli yapısı, iyi emme özellikleri ve yüzey alanı sağlaması tercih sebeplerindendir [52]. 21. yüz yılın başından beri karbon kaynaklı malzemeler enzim destek malzemesi olarak verimli bir şekilde kullanılmaya başlamıştır. Aktive edilmiş karbonlar, modifiye edilmiş ve işlem görmemiş kömürler gibi karbon bazlı malzemeler kullanılmaktadır. Geliştirilmiş gözenekli yapıları vardır, istenilen boyutta elde edilebilirler ve enzimin tutuklanması için gerekli olan geniş bir temas yüzeyine (50-1315 m²/g'ye kadar) sahiptirler [46- 53]. Tablo 1.5’de inorganik ve organik destekler kullanılan tutuklama çalışmaları gösterilmiştir.

Tablo 1.5. İnorganik ve organik desteklerdeki tutuklama çalışmaları[46]

Destek türü	Destek malzemesi	Fonksiyonel grup	Tutuklama yöntemi	Tutuklanan enzim
İnorganik	Sol-jel silika	-OH	Adsorpsiyon	<i>Aspergillus niger</i>
İnorganik	Silika jel	-OH, C=O	Kovalent b.	Lipaz
İnorganik	Hidroksiapatit	-OH	Adsorpsiyon	Glukoz oksidaz, <i>Aspergillus niger</i>
İnorganik	Bentonit	-OH, -NH ₂	Kovalent b.	Glukoz oksidaz, <i>Aspergillus niger</i>
İnorganik	Aktif carbon	-OH, C=O, COOH	Adsorpsiyon	Papain
Organik	Kitosan	-OH, -NH ₂	Hapsetme	<i>Candida rugosa</i>
Organik	Polistren	C=O, epoksi grupları	Kovalent b.	Lipaz
Organik	Selüloz	-OH	Adsorpsiyon	<i>Candida rugosa</i>
Organik	Agar	-OH	Hapsetme	<i>α-amylase</i>

Kompozit destekler, birbirinden farklı özelliklere sahip iki veya daha fazla malzemenin birleştirilmesiyle oluşan malzemeler kompozit olarak tanımlanır. Üstün mekanik özellikleri, hafifliği, çevresel koşullara karşı dayanımlı özellikleri bu malzemelerin talep görmesine yol açmıştır.

Bu malzemelerin tekne, inşaat panelleri, otomotiv gövdeleri gibi alanlarda kullanımı yaygındır. Gelişen teknolojiyle birlikte camın yerini karbon elyaf almıştır. Bunlar özellikleri bakımından cam elyafтан daha üstün olmasına karşı üretimleri yüksek maliyetlidir.

Kompozit malzemelerin kullanımında yüzey özelliklerinin yetersiz kaldığı durumlarda nano boyuttaki malzemeler ile bu yetersizlik giderilmektedir. Bir diğer kompozit malzemesi olan karbon nanotüpler cam elyaf ve karbon elyaf ile karşılaştırıldığında hafif ve daha mukavemettir. Karbon nanotüplerin pahalı oluşu dezavantaj olarak söylenebilmektedir [54].

Nano destek malzemeleri, biyoteknoloji ve biyomedikal alanlar gibi çeşitli sektörlerdeki potansiyel enzim uygulamalarına yol açan bir çok alternatif sunmaktadır [55]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, polimer mikroküreler, fiberler, nanotüpler gibi nano boyutlu taşıyıcılara tutuklanan enzimler, metal ve manyetik nanopartiküllerin olduğu bilinmektedir [55- 56].

Biyokatalizörlerin çalışma etkinliklerinin iyileştirilmesi için mükemmel bir taşıyıcı özelliği sağlayan nanomalzemeler, tutuklanma verimindeki ana unsurları belirleyen parametreleri (yüzey alanı, kütle transfer dayanımı ve yüksek enzim etkinliği vb.) sağlamaktadır [57- 58].

Karbon nanotüpler; optik, elektronik, termal, mekanik ve kimyasal özelliklerinin çok iyi olması nedeniyle nano malzemeler içerisinde yoğun ilgi görmektedirler. Grafenin farklı yönlerde şekillendirilip nano düzeyde silindir haline dönüştürülmesiyle karbon nanotüpler elde edilebilmektedir. Fonksiyonel hale getirildiklerinde organik, biyolojik ve polimerik yapılar ile mükemmel nanokompozit malzemeler oluştururlar.

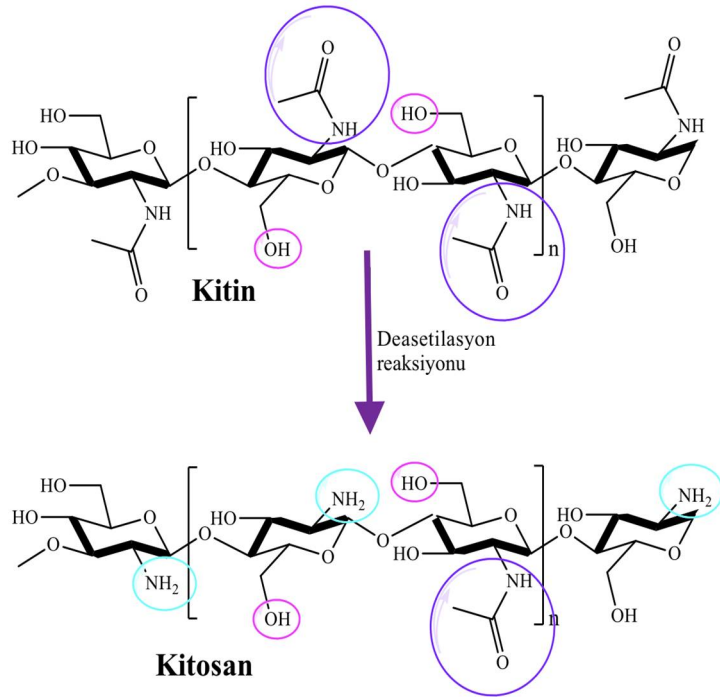
Nano boyuttaki malzemeler ile oluşturulan nanokompozit malzemeler bir çok avantaja sahiptirler ve bunlardan bazıları aşağıda belirtildiği gibidir:

- √ Mekanik kararlılık
- √ Termal kararlılık
- √ Optik kararlılık
- √ Fiziko kimyasal kararlılık
- √ Bariyer özelliği [59].

1.7. Kitosan

KTS, kitinin deasetillenmiş bir türevi olan katyonik bir polisakarittir. Çoğunlukla yengeç, karides, istakoz gibi deniz kabuklarının dış duvarlarında, eklem bacaklılarda, kafadanbacaklıların gagalarında ve mantarların da hücre duvarlarında bulunmaktadır [49]. Doğada selülozdan sonra en çok bulunan biyopolimer KTS'dir.

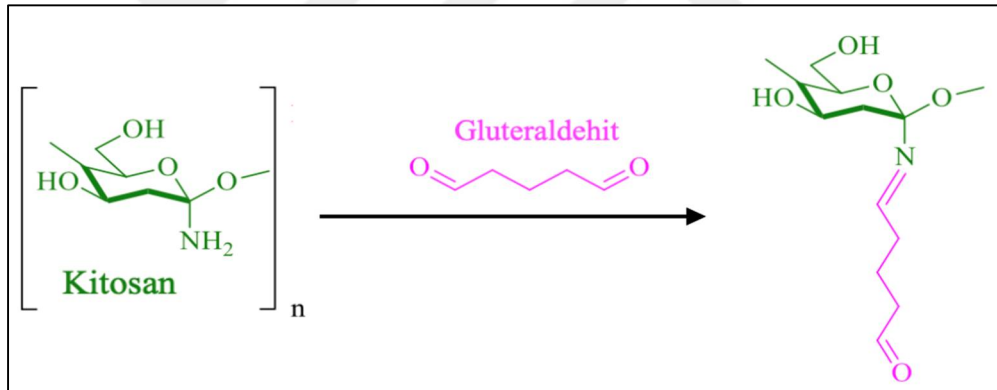
KTS, kitinin alkali koşullar altında deasetilasyonu veya kitin deasetilaz ile enzimatik hidroliz sonucu elde edilen veya kitinin alkali koşullar altında deasetilasyonu ile β -(1 \rightarrow 4) bağlı monosakkaritlerin (2-asetamin-2 deoksi- β -Dglukopiranoz) içeren doğrusal yapıya bir kopolimerdir (Şekil 1.9) [61]. Polimer molekülüne başına düşen şeker birimi sayısı, molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi KTS'nin fonksiyonel fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemektedir [62- 63].



Şekil 1.9. Kitinden kitosanın eldesi [64]

Doğada en bol bulunan polisakkaritlerden biri olan KTS, çok işlevlilik, biyoyuymuluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, düşük maliyet, toksik olmama, çevre dostu olma, yüksek kararlılık, proteinlere karşı yüksek ilgi, yüksek yükleme kapasitesi gibi çok sayıda avantaj sunmaktadır. Medikal, gıda, tarım, kozmetik, farmasötik, atık su arıtımı ve tekstil gibi birbirinden farklı bir çok alanda kullanımı yaygındır.

Biyoyumlu ve doğada kendiliğinden yok olması kemik doku tedavilerinde kullanımını sağlarken, antibakteriyel olması kontrollü ilaç salınımı, optik lens üretimi ve cerrahi ipliklerin üretimi gibi birçok medikal sektörde kullanımını elverişli hale getirmiştir [65-67]. Serbest halde amino ve hidroksil gruplarına sahip olması biyoteknoloji alanında enzim tutuklama proseslerinde taşıyıcı destek malzemesi olarak kullanılması için olanak sağlamaktadır [64]. Şekil 1.10'da KTS'nin çapraz bağlayıcı ajan ile tepkimesi görülmektedir.

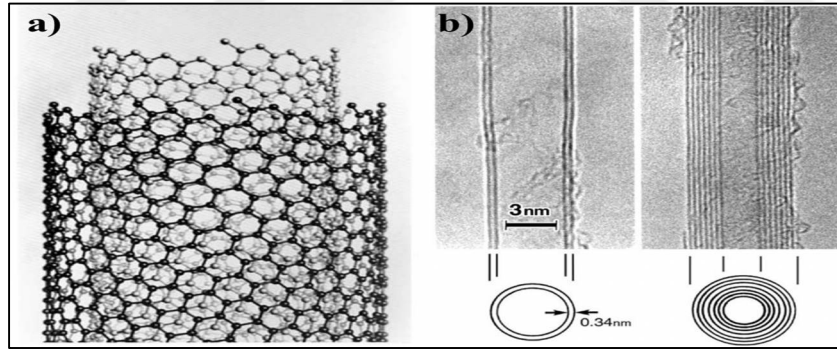


Şekil 1.10. Kitosanın çapraz bağlayıcı ajan ile yaptığı bağlar [64]

KTS'nin çevre dostu bir materyal olması nedeniyle enzim tutuklama süreçlerinde kullanımı öne çıkan bir destek malzemesi olmuştur. Hidrofobik, katyonik ve anyonik özelliklerini kontrol etmek için çeşitli fonksiyonel gruplar kullanılabilir. Genellikle bu tutuklama proseslerinde epiklorohidrin, etilendiamin, 1-etil-3-karbodiimid, gliksal, sitrik asit ve GLA çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılır. GLA'nın bakteri ve mantarlara karşı ilgisi, uygulama kolaylığı ve güvenilir olması nedeniyle adsorpsiyon ve kovalent bağlama yöntemlerinde kullanımı yaygındır. GLA'nın KTS ile birlikte kullanımının bir diğer önemli görevi ise tepkime sırasında enzimle Schiff bazına dönüşecek aldehit grupları oluşturmak için amino gruplarına sahip KTS'yi aktive etmektedir [63].

1.8. Çok duvarlı karbon nanotüpler

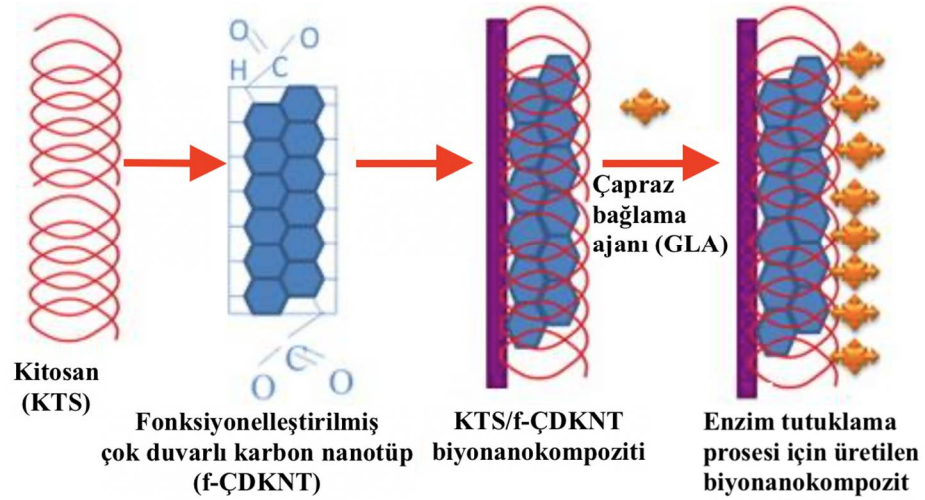
90'lı yıllarda ark buharlaşma yöntemi sırasında keşfedilen ÇDKNT arı kovanına benzeyen yapılardır. ÇDKNT kalınlıkları saç teli ile karşılaştırıldığında binlerce kat daha incedir. Dış çapları 4-30 nm ve uzunluklar 1 mm'ye kadar olan grafit kaynaklı karbon tübüleri eş merkezli olarak iki veya daha fazla iç içe geçmiş grafen silindirlerinden oluşmaktadır. Bu silindirler ve ÇDKNT yapısı Şekil 1.11'da gösterilmiştir [68]. He ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise ÇDKNT'lerin dış çaplarının 2-100 nm olduğu ve iki silindir arasındaki mesafenin 0,38 nm olduğu belirtilmiştir. ÇDKNT'ler tek duvarlı karbon nanotüpler ile karşılaştırıldığında herhangi bir katalizör kullanılmadan meydana getirilebilir ve sentezlenmeleri daha basit bir prosestir, çok yüksek saflıkta üretilebilirler, çok sayıda iç içe geçmiş grafenlerden oluşurlar, daha dayanıklıdırlar, daha büyük yüzey alanı sağlamaktadırlar. ÇDKNT'ler genellikle HNO_3 , H_2SO_4 gibi güçlü asitlerin oksidasyonu ile fonksiyonel özellik kazanırlar (f-ÇDKNT). Açık uçlarında ve yan duvarlarında karboksil grupları (-COOH) oluşturulur ve kovalent bağlama ile amino asitlerin etkileşimi sağlanır [69].



Şekil 1.11. ÇDKNT (a), iç ve dış çap uzunlukları belirtilen eş merkezli tübülerin gösterimi(b) [68]

Aynı merkezli tek duvarlı karbon nanotüplerin, merkez noktalarının birleştirilmesiyle meydana gelirler. İçi boş küreler, elipsoid, tüpler ve farklı birçok karbon allotrop sınıfını oluşturmaktadırlar. Tek duvarlı karbon nanotüplere göre kimyasal dayanıma ve geniş çapa sahip olması nedeniyle üretim prosesi daha basittir. Endüstriyel kullanımda ise mekanik ve kimyasal dayanımının iyi olmasından dolayı tercih edilmektedir.

Kimya sektöründe gaz, enzimatik, immüno ve DNA biyosensörleri olarak kullanımları mevcuttur [70]. Şekil 1.12’ de enzim tutuklaması için üretilen biyonanokompozitin f-ÇDKNT ve KTS ile kurduğu bağlar gösterilmiştir.



Şekil 1.12. f-ÇDKNT ile biyonanokompozit üretimi

Karbon nanotüpler polar yapılı bağlara sahip olmamaları nedeniyle sulu çözeltilerde ve kimyasal şartlama olmadıkça herhangi bir çözücü içerisinde çözünmezler. Yüzey hacim oranı yüksek olması ve toluen, dimetil formamit gibi organik çözücüler içerisinde kararlı yapıda olmaları ekstraksiyon proseslerinde oldukça tercih edilmelerini sağlar [71]. Çok hafif olmaları, elektronik performanslarının iyi olması, yüksek elastisite modülüne sahip olmaları ve sağladığı geniş yüzey alanları nedeniyle enzim tutuklanmasında ve biyosensör substratların geliştirilmesinde potansiyel bir destek malzemesi olarak görülmektedir [72].

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMALARI

Bu tez çalışmasının amacına yönelik olarak literatürdeki çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, manyetik Fe₃O₄-KTS nanopartikülleri NaOH içerisinde çöktürülerek hazırlamışlardır. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile manyetik nanopartikülleri tutuklama öncesi ve sonrası karakterize etmişlerdir. KTS için karakteristik adsorpsiyon bantları N-H için 3438 cm⁻¹, OH grubu 2899 cm⁻¹, alifatik C-H ve C-O kırılma titreşimlerine karşılık gelen 1069 cm⁻¹ olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Manyetik Fe₃O₄ ile karşılaştırdıklarında 598 cm⁻¹’de yeni bir karakteristik pik gözlemlemişlerdir. *Thermomyces lanuginosus* (TL 100 L) tutuklamada kullanılan enzim olup optimum tutuklama koşullarını 30 °C, pH 5 ve 4 saat süre olarak belirlemişlerdir. Bu koşullar altında, %75 en yüksek tutuklama veriminde destek başına düşen protein miktarını 16,8 mg/g destek olarak elde etmişlerdir. Tekrarlı kullanımını incelediklerinde 10 kez kullanım sonunda tutuklanan enzimin halen başlangıç aktivitesinin %70’ini koruduğunu saptamışlardır [73].

Aisvarya ve Sudha, hazırladıkları f-ÇDKNT ile KTS/Polivinilpirolidon (PVP) karışımının karakterizasyonunu FTIR ve termogravimetrik analiz (TGA) ile incelemişlerdir. Hazırladıkları karışımda KTS’nin amin gruplarının yapıya bağlanması için aldehit fonksiyonel gruplarına sahip olan GLA çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. TGA yöntemi ile ısıl kararlılığını 0-800 °C aralığında gerçekleştirmişlerdir. Geliştirdikleri GLA çapraz bağlı f-ÇDKNT/KTS/PVP kompozitin %80’inin 780 °C sıcaklığında bozunduğunu görmüşlerdir. Analiz sonunda, GLA içermeyen örneğin %24,77 GLA kullandıkları örneğin %33,7’sinin kalıntı olarak kaldığını saptamışlardır [74].

Yücel, zeytin posası üzerine tutuklama işlemi gerçekleştirilmiş ve deney koşulları YYY ile optimize edilmiştir. 25 °C ’de 24 saat süresince TL 100 enzimini tutuklamıştır. Tutuklanmış TL 100 L için uygun bulduklarını koşullar pH 7,5

tamponunda konsantrasyonu 65 Mm, enzim konsantrasyonu %9 (v:v) olarak yanıt yüzey yöntemi ile bulmuştur. Yöntemi 5 merkezli düzey, 3 faktör olarak kullanmıştır. Sistem tarafından tutuklanmış enzim spesifik aktivitesi belirlenen optimum koşullarda 6 mmol p-NP/mg enzim olarak önerilirken, doğrulama deney sonucu ile karşılaştırıldığında 6,21 p-NP/ mg enzim olarak bulmuştur. Tutuklanmış lipazın prina yağı transesterifikasyonu ile 10 kez tekrarlı kullanımından sonra kalan %80 aktivitesini koruduğunu belirlemiştir [75].

Yücel ve arkadaşları, iki farklı lipazı *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL 100 L) ve *Novozyme 388* olmak üzere kullanarak tutuklama parametrelerini incelemiştir. Birbirinden farklı destek materyalleri (celite 545, silika jel, stiren-divinilbenzen kopolimeri) adsorpsiyon bütçesi göz önünde bulundurarak kullanmışlardır. En iyi destek malzemesi celite 545 olarak seçildi ve *Thermomyces lanuginosus* için maksimum immobilizasyon verimi % 79, en yüksek spesifik aktivite *Novozym 388* için 6,5 U / mg protein olarak bulmuşlardır. Maksimum metil ester verimi % 98,3 olarak saptamışlardır. Kovalent bağlama yöntemiyle tutuklanan lipazların 10 defa tekrarlı kullanımdan sonra bile kararlı olduğunu kanıtlanmışlardır [76].

Shahedi ve arkadaşları, palm yağından biyodizel üretimini geliştirmek amacıyla epoksi ile fonksiyonelleştirilmiş silika jel üzerine *Candida antarctica lipaz B* (CALB) ve *Thermomyces lanuginosus* (TL 100 L) lipazlarını tutuklamışlardır. Tutuklama işlemi için deney koşullarını pH 7, 25 tamponunda 3 saat boyunca 25°C'de gerçekleştirmişlerdir. Bu koşullar altında tutuklama verimini %100 ve enzim aktivitesini 1,23 U/mg bulmuşlardır. Tutuklanan enzimleri palm yağının transesterifikasyonu ile biyodizel prosesi için kullanmışlardır. YYY optimizasyon çalışmalarında merkezi bileşik döndürebilir tasarımı, bağımsız 5 değişkenin (sıcaklık, metanol/yağ oranı, t-bütanol derişimi ve CALB/TLL derişimi) etkisini incelemek için seçmişlerdir.

Bu yöntemle,optimum tepkime koşullarını sıcaklık için 47°C, CALB/TLL oranı 2,1/1, metanol/yağ oranını 2/3 olarak belirlemişlerdir. Optimum koşullarda elde ettikleri biyodizel verim yanıtı %98 iken doğrulama deneyleri sonucunda %94'lük bir verim bulmuşlardır [77].

Shahedi ve arkadaşları, palm yağından biyodizel üretimini geliştirmek amacıyla epoksi ile fonksiyonelleştirilmiş silika jel üzerine *Candida antarctica lipaz B* (CALB) ve *Thermomyces lanuginosus* (TL 100 L) lipazlarını tutuklamışlardır. Tutuklama işlemi için deney koşullarını pH 7,25 tamponunda 3 saat boyunca 25°C'de gerçekleştirmişlerdir. Bu koşullar altında tutuklama verimini %100 ve enzim aktivitesini 1,23 U/mg bulmuşlardır. Tutuklanan enzimleri palm yağının transeserifikasyonu ile biyodizel prosesi için kullanmışlardır. YYY optimizasyon çalışmalarında merkezi bileşik döndürebilir tasarımı (CCRD) , bağımsız 5 değişkenin (sıcaklık, metanol/yağ oranı, t-bütanol derişimi ve CALB/TLL derişimi) etkisini incelemek için seçmişlerdir. Bu yöntemle,optimum tepkime koşullarını sıcaklık için 47°C, CALB/TLL oranı 2,1/1, metanol/yağ oranını 2/3 olarak belirlemişlerdir. Optimum koşullarda elde ettikleri biyodizel verim yanıtı %98 iken doğrulama deneyleri sonucunda %94'lük bir verim bulmuşlardır [77].

Aybastier ve arkadaşları, *Thermomyces lanuginosus* lipazını, mikro gözenekli stiren-divinilbenzen poliglutaraldehit (STY – DVB – PGA) kopolimerinden oluşan bir destek üzerine kovalent bağlı tutuklama gerçekleştirmişlerdir. Tutuklama koşullarını optimize etmek için YYY kullanmışlardır. TL 100 L lipazı için tutuklama koşulları; enzim derişimi (% 4–16, v/v), pH 6–8 tampon derişimi (20–100mM) ve tutuklama süresi 8-40 saat olarak belirlemişlerdir. Sonuçları optimize ederken, polinom denklemi oluşturmuşlardır. Optimum tutuklama yanıtları; süre 24 saat, pH 8, enzim derişimi %4 v/v ve tampon derişimini 75 mM olarak bulmuşlardır. Tahmini spesifik aktivite 8,78 mol p- NP / mg enzim iken optimum koşullar altında yapılan doğrulama deneyi ile 8,41 mol p-NP / mg enzim olarak elde etmişlerdir [78].

Kutluk, *Thermomyces lanuginosus* lipazını Mg/Al hidrotalsit ve perlit üzerine tutuklama işlemini bitkisel yağdan biyodizel üretimi amacı ile gerçekleştirmiştir. Tutuklama koşulları 0,01 g destek için Mg-Al hidrotalsit için 37 °C, pH 8,5 'de, 50 µl enzim kullanarak 24 saat boyunca gerçekleştirmiştir. Tutuklama verimleri sırasıyla Mg-Al hidrotalsit ve inorganik perlit için %36 ve %15 olarak bulmuştur. Tutuklama işlemini farklı olarak kalsine ve kalsine olmayan perlit kullanmış 24 saat sonraki tutuklama verimini sırasıyla %17 ve %12 olarak; spesifik enzim aktivitelerini sırasıyla 0,0072 U/mg destek ve 0,0069 U/mg destek olarak bulmuştur. Enzim tutuklama veriminin düşük olmasına bağlı olarak spesifik aktiviteleri de düşük

çıkıldığından dolayı perlit desteğin TL 100 L enziminin tutuklanması için uygun bir destek olmadığını önermiştir [79].

Ashjari ve arkadaşları, manyetik Fe₃O₄-SiO₂ nanopartikülleri üzerine *Rizomucor Miehei* ve *Thermomyces lanuginosus* lipazını aldehit gruplarıyla fonksiyonelleştirerek tutuklama prosedürünü uygulamışlardır. En yüksek spesifik aktiviteleri *Rizomucor Miehei* ve *Thermomyces lanuginosus* sırasıyla 5,8 mg enzim/ g destek ve 21,2 mg enzim/ g destek olarak bulurken, tutuklama verimini sırasıyla %79 ve %100 olarak saptamışlardır. Geliştirdikleri destek üzerine lipaz tutuklamasını biyodizel üretim prosesi için kullanmışlardır. YYY ile biyodizel verimine etki eden 5 değişken faktörü incelemişlerdir. Tutuklanmış lipazların 5 çevrim sonrasında başlangıç aktivitelerinin *Rizomucor Miehei* ve *Thermomyces lanuginosus* için sırasıyla %80 ve %95'ini koruduğunu gözlemlemişlerdir [80].

Kwon ve arkadaşları, lipaz aktivitesini geliştirmek amacıyla *Thermomyces lanuginosus* lipazını KTS parçacıklı bir destek malzemesine konjuge etmişlerdir. Destek malzemesini ürettikten sonra, yaptıkları çalışmada tutukladıkları lipaz aktivitesini oda sıcaklığında 7 ay boyunca başlangıç aktivitesinin %93'ü, immobilize edilmemiş lipazın %40 başlangıç aktivitesini koruduğunu gözlemlemiştir. Daha sonra mezogözenekli silika ile birleştirilen KTS-lipaz konjugatı 45 °C'de 28 hafta boyunca bozulmamış ve serbest enzime göre kararlı özellik sergilediğini görmüşlerdir. Mezogözenekli silikalar optimize edilmiş ve en iyi lipaz aktivitesi için gözenek boyutu 0,5 seçilmiştir [81]. *Thermomyces lanuginosus* lipazının farklı taşıyıcı destek materyale tutuklanmasına ilişkin olarak yapılmış literatür çalışmaları Tablo 2.1'de özetlenmiştir. Okura ve arkadaşları, KTS hidrojelini sırasıyla GLA ve glisin (Gly) ile aktive ederek daha fazla fonksiyonelleştirme yoluyla yeni bir heterofonksiyonel destek (KTS-GLA-Gly) hazırlamışlardır. *Thermomyces lanuginosus* lipazını bu destek üzerine aktive ederek KTS-GLA ile karşılaştırmışlardır. Destekleri FTIR, TGA analizleri ve zeta potansiyeli ile karakterize etmişlerdir. Her iki destek için 53-55 mg protein/g destek değerinde benzer maksimum lipaz yüklemesi bulmuşlardır. Her iki biyokatalizör heptan, toluen ve izo- oktan içerisinde 50 °C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve ilk aktivitelerinin %40'ını koruduklarını saptamışlardır. KTS-GLA-Gly ile kovalent bağlanan lipazın hem zeytinyağı hidrolizinde hem de esterleştirme yolu ile alkil

palmitat sentezinde KTS-GLA üzerinde tutuklanan lipaza göre 4 kat daha aktif olduğunu belirlemişlerdir. Ürettikleri biyokatalizörün dokuz kez esterleştirme tepkimesinde kullanımı sonrasında %40 başlangıç aktivitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir [82]. Literatürde *Thermomyces lanuginosus* kaynaklı lipazın KTS bazlı desteklere tutuklanmasına ait çalışmalar yapılmıştır. Ancak ÇDKNT gibi bir destek malzemesine fungal kaynaklı bir lipazın tutuklanmasına rastlanılmamıştır. Bu yüzden bu açığı gidermek amacıyla KTS esaslı ve f-ÇDKNT ile birlikte nano yapılı bir destek malzemesi üretilerek bilim dünyasına fayda ve yarar sağlanması hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasında *Thermomyces lanuginosus* lipazının tutuklanması için taşıyıcı destek materyali olarak KTS ile f-ÇDKNT kullanıldı.

Tablo 2.1 TL 100 L lipazının farklı taşıyıcı destek malzemelerine tutuklanması ile ilgili literatür çalışmaları

Tutuklanan lipaz	Optimum parametreleri	Destek malzemesi	Verim/ Enzim aktivitesi	Referan
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	T=30°C pH 5, t=4 h	Manyetik Fe ₃ O ₄ -KTS nanopartikülleri	%75 verim 16,8 mgprotein/ gdestek	[73]
<i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Novozyme 388</i>	T=25°C pH 7,5, t=24 h enzim: %9 (v/v)	Zeytin posası	transesterifikasyon 10 tekrarlı kullanım %80 kalan aktivite	[75]
<i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Novozyme 388</i>	-	Celite545,Silika jel stiren-divinilbenzen kopolimeri	TL verim %79 metil ester verimi:%98,3	[76]
<i>Candida antarctica</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i>	T=25°C, pH 7,25, t=3 h	Epoksi ile fonksiyonel silika jel	verim %100 spesifik aktivite 1,23 U/mg	[77]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	T=25°C pH 8 , t=24 h	Stiren-divinilbenzen poliGLA	spesifik aktivite 8,41 mol p-NP/mg enzim	[78]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	T=30°C pH 8,5, t=24h 50 µl enzim 0,01 g destek	Mg-Al hidrotalsit inorganik perlit	%36 ve %15 verim spesifik aktivite 0,0072 U/mg destek 0,0069 U/mg destek	[79]
<i>Thermomyces lanuginosus</i> <i>Rizomucor Miehei</i>	-	manyetik Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ nanopartikülleri	TL: 5,8 mgenzim/ g destek, %100 <i>Rizomucor M.</i> :21,2 mg enzim g destek,%79	[80]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	-	KTS-mezogözenekli silika	7 ay sonra başlangıç lipaz aktivitesi %93	[81]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	-	KTS- GLA KTS- GLA- glisin	spesifik aktivite: 53-55 U/mg katalitik aktivite: t= 48h, %40 Chit-GA-Gly 4 kat daha hidrolitik aktivite yüksek	[82]

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Malzemeler

Tez çalışmasında, *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme® TL 100 L) termofilik Tez çalışmasında, *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme® TL 100 L) termofilik fungus kaynaklı, lipaz aktivitesi 100 KLU/g olan ticari lipaz kullanılmış olup Novozymes (Danimarka) firmasından serbest sıvı formda tedarik edildi. Serbest lipaz enziminin tutuklandığı taşıyıcı biyonanokompozit desteğin oluşturulması için kullanılan KTS Sigma-Aldrich (Almanya), f-ÇDKNT Nanografi Nano Teknoloji A.Ş. firmasından, çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan GLA, %25 (w/v) sulu çözeltisi olarak Merck (Almanya) firmasından tedarik edildi. KTS çözünmesi için %2'lik asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Bradford yöntemi ile protein tayini etmek için Brilliant Blue G çözeltisi kullanıldı. Tutuklama sırasında tampon çözelti olarak 0,1 M Tris-HCl ve potasyum fosfat çözeltisi farklı pH'larda hazırlandı. Enzim aktivitesinin ölçümü için zeytinyağı (Riviera tipi) piyasadan, Etanol analitik saflıkta olup Merck (Almanya) firmasından, dietileter Riedel-de Haen (Almanya) firmasından tedarik edildi. Deneyleerde kullanılan kimyasallar ve özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deneyleerde kullanılan kimyasalların adı ve özellikleri

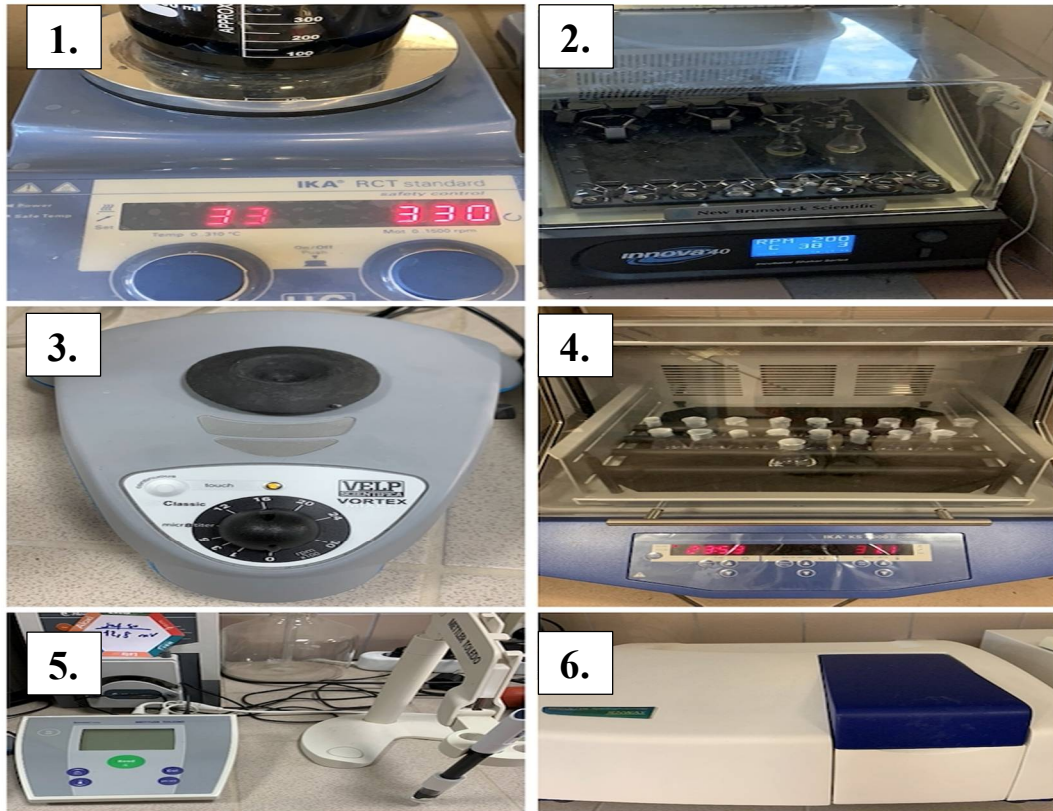
Kimyasal	Firma Adı	Özellikleri
Lipaz enzimi	Novozymes	Lipozyme TL 100 L, serbest
Kitosan	Sigma Aldrich	Orta Moleküler ağırlık
f-Çok duvarlı karbon nanotüp	Nanografi Nano Teknoloji A.Ş.	% 96 saflık, 8-18 nm
Gluteraldehit	Merck	% 25'lik Sulu çözelti
Asetik asit	Sigma Aldrich	% 100 Analitik saflık
Trizma bazı	Sigma Aldrich	%99,9 Analitik saflık
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich	%37 Analitik saflık
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	% 99,5 Analitik
Sodyum hidroksit	Merck	Saf peletler
Brillant Blue G	Sigma Aldrich	Konsantre Solüsyon
Etanol	Merck	Analitik saflık
Dietileter	Riedel-de Haen	% 99,5 Analitik saflık
Zeytinyağı	Zeo	Riviera tipi
Orto Fosforik Asit	Tekkim Kimya	% 85 Gıda Tipi
n-Bütanol	Merck	% 99,5 Analitik saflık
n-Propanol	Merck	% 99,5 Analitik saflık

3.2. Cihazlar

Bu tez çalışmasında ortam pH'larını istenen değerlere ayarlamak için pH metre (Mettler Toledo) kullanıldı.

Tüm tartımlar, hassas terazide (KERN) yapılmıştır. Biyonomkompozit oluşturabilmek için hazırlanan çözeltiler manyetik karıştırıcıda (IKA RTC standard) karıştırılmıştır. Numunelerin karıştırılması için vorteks (VELP Scientifica) cihazı kullanıldı.

Enzim tutuklama deneyleri ve parametrelerinin incelenmesi sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollü inkübatörlerde (IKA KS 4000 i ve New Brunswick Scientific Innova 40) gerçekleştirildi. Tutuklama işlemi için Bradford yöntemi ile protein tayin etmek için UV/Vis spektrofotometre (Jenway 6800) kullanıldı. Tutuklama sırasındaki ve sonrasındaki tüm numuneler ependorf numune kaplarına alınarak analiz için +4 °C'de buzdolabında saklandı. Deneylerde kullanılan tüm cihazlar Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Deneyde kullanılan cihazlar (1) manyetik karıştırıcı, (2) inkübatör (New Brunswick Scientific Innova 40), (3) vorteks, (4) inkübatör (IKA KS 4000 i), (5) pH metre, (6) UV-VIS spektrofotometre

3.3. Deneysel Yöntem

3.3.1. Biyonanokompozit destek üretilmesi

Lipazın tutuklanması için ilk olarak biyonanokompozit destek üretimi gerçekleştirildi. Bu üretim için Aisferya ve Sudha tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek uygulandı. Desteklerin üretimi için 2 g KTS, hacimce %2'lik (v/v) asetik asit çözeltisinde 24 saat boyunca, 500 rpm'de, 30°C'de çözdürülerek %2'lik (w/v) KTS aktif çözeltisi hazırlandı. Sonrasında hazırlanan çözelti içerisine, 2 ml saf su içinde hazırlanan 0,2 g f-ÇDKNT eklenmiş ve homojen süspansiyon bir karışım sağlanıncaya kadar karıştırıldı. Çözeltinin içerisine GLA çözeltisinden %2 (v/v) eklenerek 37 °C'de 2 saat boyunca karıştırıldı. Küreleri elde etmek için, 1 M NaOH bazik çözeltisi içerisine 100ml'lik enjektör yardımıyla hazırlanan bu karışımdandamlatılarak biyonanokompozit kürecikler elde edildi. Son işlem olarak biyonanokompozit küreler pH 7 olana kadar saf su ile yıkandı ve tutuklama işlemi için oda koşullarında distile su içerisinde muhafaza edildi [74].

3.3.2. Biyonanokompozit desteğe lipaz tutuklanması ve ön denemeler

Hazırlanan biyonanokompozit kürelere lipaz tutuklama işlemi cam viyaller içerisinde gerçekleştirildi. Bu çalışmada *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme® TL 100 L) termofilik fungus kaynaklı lipaz kullanıldı. Tutuklama işlemi için belirlenen deney koşulları 6 ml 0,1M Tris- HCl tamponu içerisine belirlenen enzim derişimlerinde (mg/ml), 35°C sıcaklık, 24 saatte gerçekleştirildi. Tutuklama yönteminde 2015 yılında Sristava ve arkadaşları tarafından kullanılan çapraz bağlayıcı ajan ekleme yöntemi revize edilerek kullanıldı.

Tutuklamanın ön aşaması için 1 gün önceden hazırlanan 0,5 g tartım alınan yağ kürecikler, 6 ml tampon ortamında gece boyunca %2 GLA sulu çözeltisi eklenerek inkübe edildi [83]. Ertesi gün bu destekler Tris-HCl tamponu ile yıkanarak tutuklama ortamına alındı ve belli miktarda serbest enzim eklendi. 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. Literatür incelendiğinde tutuklanma verimi için yeterli olması ve uygulamada kolaylık olması açısından tüm deneyler 200 rpm sabit karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir [79].

3.3.2.1. Tutuklamaya pH ve sürenin etkisi

Biyonanokompozit desteklere enzim tutuklanma süresinin belirlenmesi için 0-24 saat boyunca belli aralıklar ile ortamdan örnekler alınmıştır. Yapılan ön çalışmalarda 0-2 saat arasında tutuklanan enzim miktarında fazla bir değişim olmadığı için 0., 4., 6. ve 24. saatlerde örnekleme yapılmıştır. Tutuklama koşuluna karar verebilmek için farklı pH değerlerinde 0,1 M fosfat tamponu ve 0,1 M Tris-HCL tamponu kullanılarak 24 saat boyunca tutuklama işlemi gerçekleştirildi. Her enzimin çalışabildiği uygun bir pH aralığının olduğu bilinmektedir. Bu nedenle uygun tampon pH'nın belirlenmesi için 0,1M fosfat tampon pH aralığı 6-7,5 ve 0,1 M Tris-HCl tampon pH 5-9 aralığında ön denemeler yapıldı. Tutuklama işlemi için aksi belirtilmedikçe uygulanan deney koşulları şöyledir: 6 ml 0,1 M Tris-HCl tampon, pH 7,5, 100 µl TL 100 L enzimi, 35°C sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızı ve 24 saat süre.

3.3.2.2. Tutuklamaya sıcaklığın etkisi

Sıcaklık enzimlerin tutuklanma ve aktivitesini belirleyici bir parametredir. Bu nedenle denatürasyona izin verilmeden tutuklama işleminin yapılması gerekmektedir. Tutuklama prosesine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla tutuklama işlemi 25-45 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirildi. 24 saat boyunca belirli aralıklar ile numuneler alındı.

3.3.2.3. Enzim derişiminin etkisi

Biyonanokompozit desteğe enzim tutuklanmasında, TL 100 L enzim derişiminin etkisini incelemek amacıyla pH 7,5 olan 6 ml Tris-HCl tampon çözeltisi içerisine 100-500 µl aralığında serbest formdaki enzim çözeltisi eklenerek tutuklama işlemi cam viyallerde gerçekleştirilmiştir. Ortama eklenen enzim derişimleri sırasıyla, 17,5 (100 µl), 35 (200 µl), 52,5 (300 µl), 70 (400 µl) ve 87,5 mg/ml (500 µl,) olarak hesaplandı (Lipazın bağıl yoğunluğu $\rho_{lipaz}=1,05$).

3.3.2.4. Çapraz bağlayıcı derişimi etkisi

Üretilen KTS bazlı f-ÇDKNT desteğine tutuklama veriminin artırılması amacıyla yaygın olarak kullanılan ve ulaşılabilirliği kolay olan GLA çapraz bağlayıcısı kullanılarak tutuklama işlemi yapıldı.

Tutuklama öncesinde bir gece boyunca % 0, % 2, % 4 ve % 6 (v/v) derişimine sahip GLA tampon ortamında kürecikler bekletilmiş, daha sonra 300 µl (52,5 mg/ml) enzim miktarı ile 7,5 Tris-HCl tamponunda tutuklama prosesi gerçekleştirildi.

3.3.2.5. Destek miktarı etkisi

Sentezlenen KTS/f-ÇDKNT destek miktarının tutuklamaya etkisini incelemek için 0,1-0,6 gram aralığındaki yaş destekler 8 saat süresince 0,1 M Tris-HCl tamponunda bekletilmiş, daha sonra 200 µl (35 mg/ml) enzim derişimi kullanılarak tutuklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.6. ÇDKNT miktarının etkisi

KTS içerisine kütlece % 0-1 (w/v) oranında eklenen f-ÇDKNT miktarının tutuklamaya etkisinin incelenmesi amacıyla 6 ml 0,1 M Tris-HCl ortamında, 100 µl (17,5 mg/ml) enzim kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.4. YYY ile Enzim Tutuklama Optimizasyonu

YYY, ilgili bir yanıtın farklı değişkenlerden etkilendiği problemlerin modellenmesi ve yanıtın optimizasyonu için faydalı olan matematiksel ve istatistiksel yöntemlerden biridir. YYY, en küçük kareler tekniğiyle bir modele uyum sağlaması için merkezi birleşik tasarım (CCD) gibi deneysel bir tasarım kullanır [84]. Design Expert paket programı deneylerin tasarlanması için sıklıkla kullanılan bir bilgisayar programıdır.

Tablo 3.2. Deney tasarım bağımsız değişkenleri, kodlanmış ve gerçek değerleri

Bağımsız değişkenler					
Faktör	Parametreler			Birim	
A	Sıcaklık			°C	
B	pH			-	
C	Enzim			µL	
Kodlanmış ve Gerçek değerler					
Faktör	-2	-1	0	1	2
A	25	30	35	40	45
B	7.00	7.25	7.50	7.75	8.00
C	100	200	300	400	500

Bu çalışmada Design-Expert® Version 11 Software programı kullanılmıştır. Tutuklama ön denemeleri ile enzim miktarı, sıcaklık ve tampon pH değerinin tutuklamayı etkileyen önemli parametreler olduğu belirlenmiş ve bu üç parametre YYY etkili bağımsız değişken parametreleri olarak kullanıldı.

Ön deneyler sonucunda, orta değerler sıcaklık için 35°C, pH 7,5 olan Tris-HCl tamponu ve enzim miktarı 300 µl olarak belirlendi. Tutuklamaya etki eden parametrelerin kodlanmış ve gerçek değerleri Tablo.3.2’de verilmiştir.

Tutuklama verimi ve sentezlenen biyonanokompozit desteğe tutuklanan protein miktarı ise modelin yanıtları olarak belirlendi. Modelin karesel terimleri eksen noktalarına bakılarak belirlenir. Tablo 3.2’de CCD deneme deseni verilmiştir. Deseni oluştururken +1 ve -1 olarak birbirine eşit üst ve alt limit değerleri referans alındı. Bu değerler yukarıdaki Tablo 3.3’de gösterilmektedir.

Tablo 3.3. Merkezi bileşik tasarımı

X_1	X_2	...	X_k
$-\alpha$	0	...	0
$+\alpha$	0	...	0
0	$-\alpha$...	0
0	$+\alpha$...	0
0	0	...	$-\alpha$
0	0	...	$+\alpha$

Bu tasarımda CCD’de, k faktör sayısı olarak tanımlanmış olup, 2^k tane iki düzeyli faktöriyel denemenin, 2k tane eksen nokta veya yıldız kombinasyonundan oluşmaktadır [85].

Bu yöntemde 5 orta noktalı tekrar deneyi seçildi ve programın önerdiği 19 deney yapıldı. Deneylerin desen tasarımı ve değişen faktörleri için deney koşullarını veren EK-E’de verilmiştir.

3.5. Analiz Yöntemleri

Bu tez çalışmasında, üretilen biyonanokompozit desteğin tutuklanma sonrası protein miktarı Bradford yöntemi ile, enzim aktivitesi Zeytinyağı hidroliz yöntemiyle tayin edilmiştir. Fonksiyonel gruplarının belirlenmesi için Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, sıcaklığa karşı termal bozunmanın incelenmesi için Termogravimetrik (TGA) analiz, yüzey özelliklerinin mikroskopik boyutta incelenmesi için polarize optik mikroskobu (POM) kullanılarak analizleri yapıldı.

Biyonanokompozit desteklerin yüzey morfolojilerinin incelenmesi için SEM analizi hizmet alımı karşılığında Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı tarafından yapılmıştır.

3.5.1. Protein tayini

Tutuklama işleminde alınan örneklerdeki çözeltilerde kalan protein, Bradford yöntemi kullanılarak tayin edildi. Bu yöntem çözelti içerisinde kalan proteinlere bağlanan Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının Uv-Vis spektrofotometresinde 595 nm dalga boyunda absorbans vermesine dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir [86]. Ölçüm için gerekli olan absorbansa karşılık gelen protein miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ile standart protein kalibrasyon grafiği EK-A'da verilmiştir.

Uv-Vis spektrofotometresinde ölçüm yapmak için öncelikle Bradford çözeltisi; 1 ml etanol, 2ml orto fosforik asit, 0,45 ml Brilliant Blue G250, 15 ml distile suyun karıştırılması ile hazırlandı [79].

Cam kuvars küvet içerisine hazırlanan 2,4 ml Bradford çözeltisi içerisine 100 μl örnek eklendi. Örnek karıştırıldı ve 10 dakika boyunca Bradford çözeltisi ile tepkimeye girmesi için beklendi. 595 nm dalga boyundaki absorbans değeri ölçüldü. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak, elde edilen absorbans değerine karşılık gelen protein (enzim) miktarı ölçüldü.

Tutuklama verimini hesaplamak için, enzim tutuklama işlemine başlamadan önce $t=0$ anında, belirli aralıklarda ve $t=\text{son}$ anında örnekler alındı. Hesaplanan tutuklama verimi Denklem 3.1' de verilmiştir.

$$\% Y = \frac{c_{to} - c_t}{c_{to}} \times 100 \quad (3.1)$$

% Y : Tutuklama verimi

c_{to} : Tutuklanma öncesi protein miktarı (U/mg enzim)

c_t : Tutuklanma sonrası protein miktarı (U/mg enzim)

3.5.2. Zeytinyağı hidroliz yöntemi ile enzim aktivite tayin

Serbest veya tutuklanmış bir enzimin hidrolitik aktivitesini titrimetrik olarak ölçmek için yaygın olarak kullanılan zeytinyağı hidroliz yöntemi uygulanmaktadır. Öncelikle 25 ml'lik erlen içerisine 2,5 ml 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, daha sonra 2,5 ml zeytinyağı(Riviera tipi) eklendi. Erlen içerisindeki çözelti 37 °C'ye geldiğinde lipaz tutuklanmış lipaz içeren 0,1 g biyonanokompozit boncuk ortama eklendi ve 30 dakika boyunca 200 rpm karıştırma hızında inkübasyonu sağlandı. Tepkimeyi sonlandırmak için tepkime ortamına 2,5 ml 1:1 oranında etanol/eter karışımı eklendi ve 3-4 damla %1'lik fenoftalein çözeltisi damlalık ile damlatılmıştır. Enzim hidrolitik aktivitesinin hesaplanması için 0,1 M NaOH ile titre edilerek harcanan miktardan hesaplamalar yapıldı. Numunelerin her biri için ikişer tekrarlı ölçümler alındı.

Hesaplamalar aşağıda verilen Denklemler (3.2- 3.5) referans alınarak yapıldı. Denklemlerde tanımlanan lipaz aktivite değerleri, U/ml enzim ve U/mg enzim olarak verilmiştir[87].

$$\frac{U}{ml \text{ enzim}} = \frac{(\text{Örnek}, ml_{\text{harcanan}} - \text{şahit}, ml_{\text{harcanan}})_{(NaOH)} \times [NaOH] \times 1000}{(V_{\text{enzim}}, ml) \times t} \quad (3.2)$$

$$\frac{U}{ml \text{ enzim}} = \frac{(\text{Örnek}, ml_{\text{harcanan}} - \text{şahit}, ml_{\text{harcanan}})_{(NaOH)} \times 0,1N \times 1000}{(0,1ml) \times 30dk} \quad (3.3)$$

$$\frac{U}{mg \text{ enzim}} = \frac{(\text{Örnek}, ml_{\text{harcanan}} - \text{şahit}, ml_{\text{harcanan}})_{(NaOH)} \times [NaOH] \times 1000}{(m_{\text{enzim}}, mg) \times t} \quad (3.4)$$

$$\frac{U}{mg \text{ enzim}} = \frac{(\text{Örnek}, ml_{\text{harcanan}} - \text{şahit}, ml_{\text{harcanan}})_{(NaOH)} \times 0,1N \times 1000}{(100mg) \times 30dk} \quad (3.5)$$

Zeytinyağından dakikada 1 µmol yağ asidi hidroliz eden miktar bir ünite enzim (U) olarak tanımlanmıştır [87 – 89].

3.5.3. Enzim kararlılıklarının belirlenmesi

Biyonanokompozit desteğe tutuklanmış olan TL-100L'nin sıcaklık, pH ve depolama kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla uygulanan işlemler sonrasında hidrolitik aktiviteleri ölçüldü. pH kararlılığının belirlenmesi için, tutuklama sonrasında kürelerin t=0 anında hidrolitik aktiviteleri ölçüldü. Daha sonra değişen pH aralığında (5-9) 0,1 M fosfat tamponu içerisinde 1 saat inkübe edildikten sonra hidrolitik aktiviteleri tekrar ölçüldü.

Sıcaklık (termal) kararlılığının belirlenmesi için, tutuklanmış kürelerin t=0 anında hidrolitik aktivitesi ölçüldü. Ardından farklı sıcaklık değerlerinde (4 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C) 1 saat inkübe edildikten sonra hidrolitik aktiviteleri tekrar ölçüldü. Depolama kararlılığının belirlenmesi için, tutuklanan biyanokompozit küreler kurutulup sabit tartıma getirildikten sonra 28 gün boyunca 4°C ve 25°C oda sıcaklığında bekletildi.

Ölçümler alınırken önceden kurutulmuş olan küreler 1,5 saat boyunca 0,1M Tris-HCl pH 7,5 tamponunda aktivite ölçülmesi için inkübe edildi. 28 gün boyunca 7 günde bir ölçüm alınarak kararlılıkları hidrolitik aktivitelerine bakılarak tespit edildi.

3.5.4. Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi; katı, sıvı veya gaz materyallerin soğurma, emisyon, fotoiletkenlik veya Raman saçılmasının kızılötesi spektrumunun belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan spektroskopik yöntemlerden biridir [90]. Bir IR ışınının geçtiği yola yerleştirilmiş bir numune ile farklı IR frekanslarının absorpsiyon ölçümünü temsil etmektedir [91].

IR spektroskopik tekniğinin en önemli amacı ise, örnekteki kimyasal fonksiyonel grupları belirlemektir. Bu nedenle FTIR farklı analiz türleri için de faydalı bir yöntemdir. Bu tez çalışması için, Şekil 3.2' de gösterilmiş olan Perkin Elmer Spectrum 100 model FTIR cihazı kullanıldı. Üretilen biyanokompozit destek oda sıcaklığında kurutuldu ve fonksiyonel gruplarının belirlenmesi için germanyum kristal başlığı kullanılarak ölçümleri alındı. İlgili spektrumların elde edilmesi için 650- 4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçümler yapıldı.



Şekil 3.2. FTIR cihazı

3.5.5. Termogravimetrik (TGA) analiz

TGA, özellikle polimer gibi malzemelerin karakteristik özelliklerinin belirlenmesinde yaygınca kullanılan bir yöntemdir. Bu teknikle, malzemedeki bozunma sıcaklıkları, nem içeriği, inorganik ve organik bileşenlerin yüzdesi belirlenebilir [92].

Bu analiz yöntemi kullanılarak üretilen KTS/f-ÇDKNT destek malzemesinin ısı bozunma sıcaklıkları Şekil 3.3'deki Mettler Toledo TGA cihazı kullanılarak belirlendi. Termal karakterizasyon için, 0,5-0,7 mg arası kuru numune alınarak azot ortamı altında, 25-600 °C arasında dakikada 10 °C ısıtma yapıldı.



Şekil 3.3. TGA cihazı

3.5.6. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), malzemenin yüzey morfolojilerinin incelenmesi için kullanılan malzemenin oldukça yüksek kalitedeki bir görüntüsünün elde edildiği elektron mikroskobudur.

Biyonanokompozit desteklerin kurutulduktan sonraki enzim tutuklanmış hali ve tutuklanmamış yüzey morfolojilerinin görüntülenmesi için SEM analizi hizmet alımı karşılığında, Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı tarafından Quanta 400F Field Emission markalı cihazda farklı boyutta büyütme yapılarak görüntüler alındı.

3.5.7. Polarize optik mikroskobu (POM) ile yüzey analizi

Üretilen biyanokompozit desteklerin mikroskobik boyuttaki yüzey görüntülerinin incelenmesi için Nikon Eclipse LV100 Pol markalı POM cihazı (Şekil 3.4) kullanıldı.



Şekil 3.4. POM cihazı görünümü

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde tez dönemi boyunca yapılan deneysel çalışmaların sonuçları incelenmiş ve literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırılarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Serbest formdaki TL 100 L enziminin üretilen desteğe tutuklanması, tutuklamaya etki eden parametrelerin ön denemeleri, en kısa süre ve en az deney sayısı ile hangi parametrelerin ayrı ayrı ve birlikte etkilerinin önemli olduğunun belirlenmesi amacıyla YYY ile optimasyon çalışması yapılmış; son olarak üretilen biyonanokompozit destek karakterize edilmiştir.

4.1. Biyonanokompozit Desteğe TL 100 L Tutuklanması Ön Deneyleri

İlk olarak bölüm 3.1’de bahsedilen üretim yöntemi ve tutuklama koşulları altında biyonanokompozit destek üretilerek, TL 100 L enziminin tutuklanması gerçekleştirildi. Tutuklamaya tampon pH’ı ve tutuklama süresi, sıcaklık, enzim miktarı, çapraz bağlayıcı derişimi, f-ÇDKNT kullanımı ve destek miktarı gibi parametrelerin etkisi incelendi.

4.1.1. pH ve sürenin etkisi

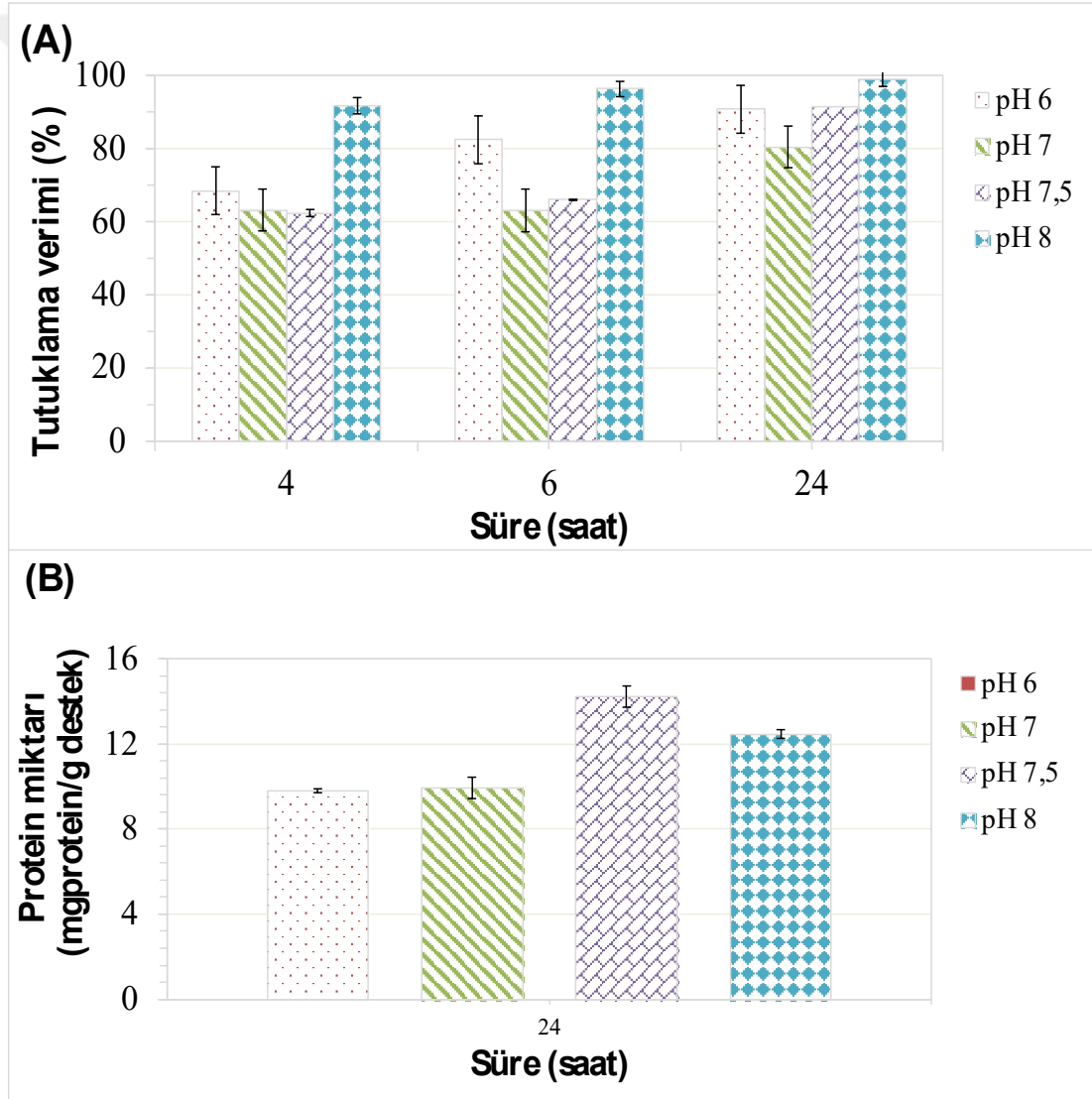
Tampon pH’ının tutuklamaya etkisinin incelendiği deneylerde fosfat tamponunda biyonanokompozit kürelerin çözünmesi nedeniyle tutuklama deneylerine Tris-HCL tamponu ile devam edilmesine karar verildi.

Şekil 4.1’de farklı pH değerlerinin tutuklama verimi üzerindeki etkisi (A) ve üretilen desteğe tutuklanan protein miktarına etkisi (B) görülmektedir. pH değerinin artmasıyla 24 saat sonunda elde edilen tutuklanma veriminin arttığı söylenebilir. En yüksek tutuklama verimine (%98,9) pH 8 Tris-HCL tamponu ile ulaşılmıştır. Aynı tutuklama koşullarında, tutuklama süresinin artmasıyla destek başına tutuklanan enzim miktarının Şekil EK-B’de arttığı söylenebilir.

Literatürde yapılan çalışmalardan birinde, KTS/f-ÇDKNT bazlı bir desteğe Porcine pankreatik lipaz enziminin tutuklama çalışmasında uygun tampon pH değeri 8 olarak,

KTS temelli destek malzemesinin kullanıldığı TL 100 L enziminin tutuklandığı bir diğer çalışmada ise pH 8,5 olan tampon uygun olarak belirlenmiştir [79-103]. Destek başına tutuklanan protein miktarı incelenen pH aralığında 9,8-14,2 mg protein/ g destek mertebesinde olmuş, en yüksek değere (14,2 mg protein/g destek) pH 7,5 tamponu ile ulaşılmıştır. Bu nedenle deneysel çalışmalara bu pH değerinde devam edilmesine karar verilmiştir.

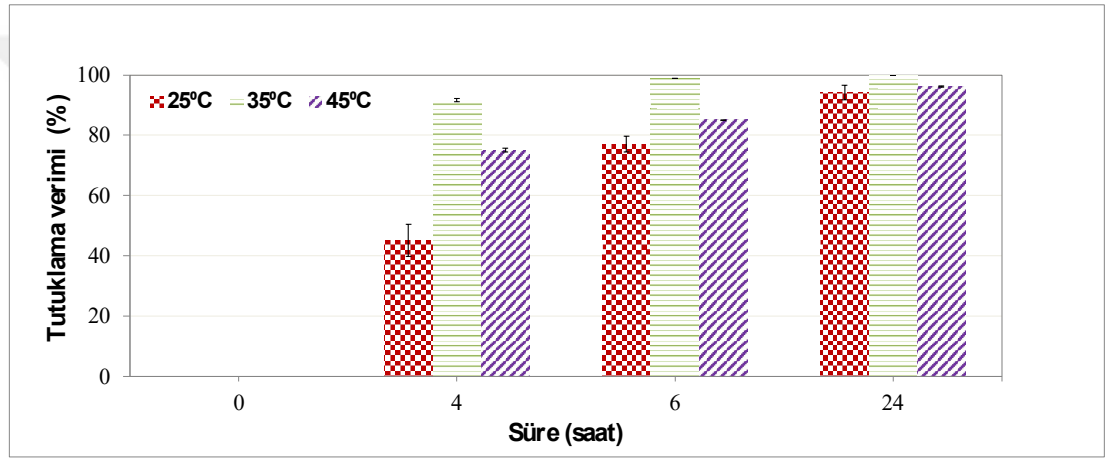
YYY ile tutuklamanın optimizasyon ön denemeleri için daha dar bir pH aralığında (7.25-7.75) çalışılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil EK-B’de verilmiştir. 8. saate kadar sürenin artmasıyla tutuklama veriminin arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. Tutuklama verimi (A) ve protein miktarına (B) pH etkisinin incelenmesi (Deney koşulları: 100 µl TL 100 L, 6 ml 0,1 M Tris-HCl, 35°C, 200 rpm, 24 h)

4.1.2. Sıcaklık etkisi

Tutuklama sıcaklığı ve süresinin tutuklama verimine etkisi Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Öncelikle tutuklama verimi incelendiğinde 24 saatin sonunda tüm sıcaklıklar için % 94-% 100 aralığında gerçekleşmiş, en yüksek tutuklama verimine (%100) 35 °C'de ulaşılmıştır. Sıcaklık etkisinden efektif olarak sonuç almak için tutuklanan protein miktarının etkisi incelenmelidir, nihai hedef en yüksek tutuklama veriminde destek başına tutuklanan protein miktarına en yüksek düzeyde ulaşırken enzim aktivitesini korumaktır. Protein miktarı 45 °C için 4. saatten sonra sabit ilerlemiştir (Şekil 4.3- A) fakat 25 °C ve 35 °C için zamanla giderek artmıştır.

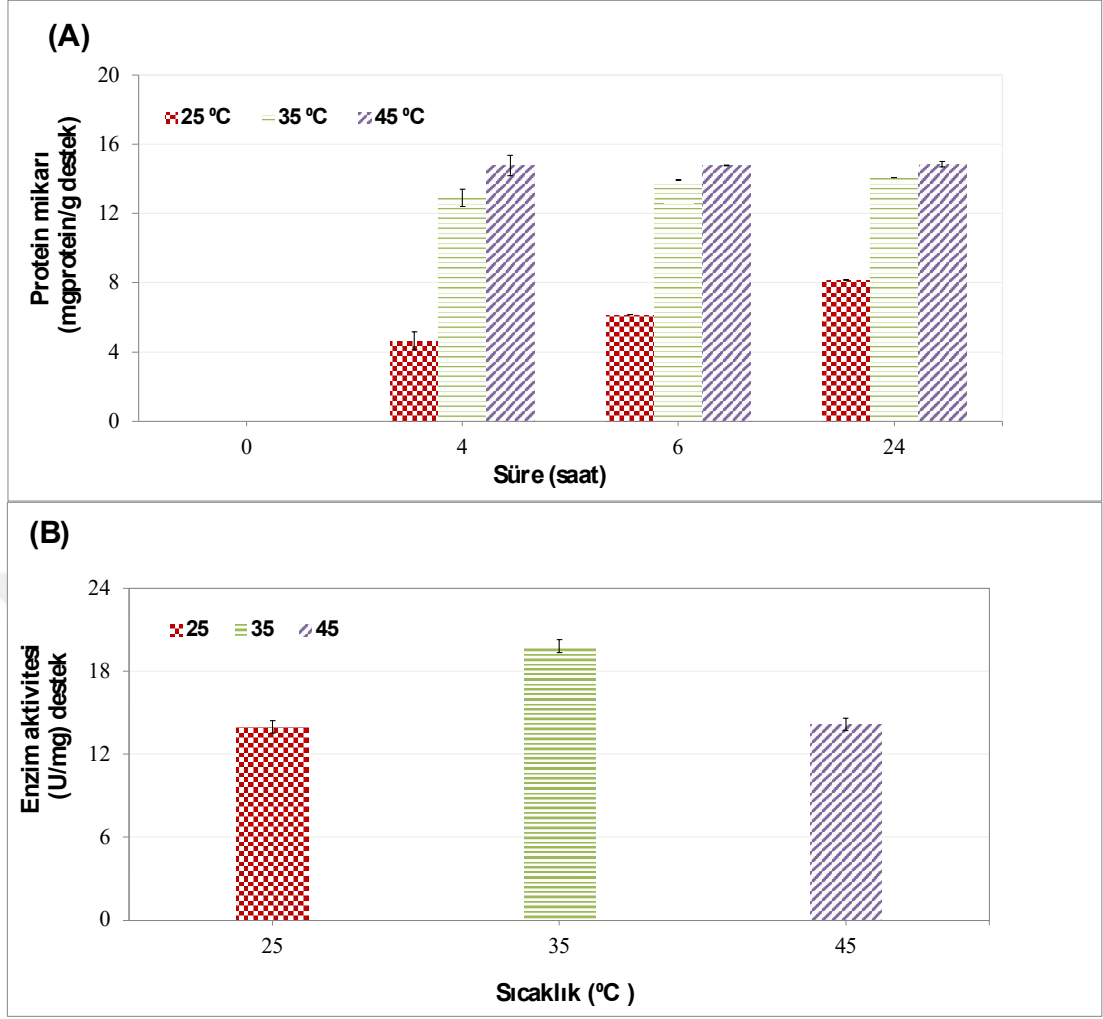


Şekil 4.2. Tutuklanma verimine sıcaklığın etkisinin incelenmesi (Deney koşulları: 100 µl TL 100 L, 6 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 200 rpm, 24 h, 0,5 g destek)

Tutuklanan protein miktarları 25 °C (8,1 mgprotein/g destek) için, 35 °C (14,1 mgprotein/g destek) ve 45 °C (14,8 mgprotein/g destek) ile karşılaştırıldığında yetersiz kaldığı söylenebilir. 35 ve 45 °C'de tutuklanan protein miktarı birbirine yakın olmakla beraber enzim aktivitesinin belirlenmesi ile uygun sıcaklık seçilebilir.

Tutuklanan enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi Şekil 4.3- B'de verilmiştir. Enzim aktivitesinin sıcaklık arttıkça artması ve daha yüksek sıcaklıkta azalmasının nedeni kullanılan TL 100 L lipazının denatüre olması ile açıklanabilir.

Şekil 4.3- B incelendiğinde tutuklanmış olan enzimin 35 °C'de en yüksek hidrolitik aktiviteye (19,8 U/mg) sahip olduğu görülebilir. Ön denemeler sonucunda 35°C'nin biyonanokompozit tutuklama prosesi için uygun sıcaklık olduğuna karar verilmiştir.



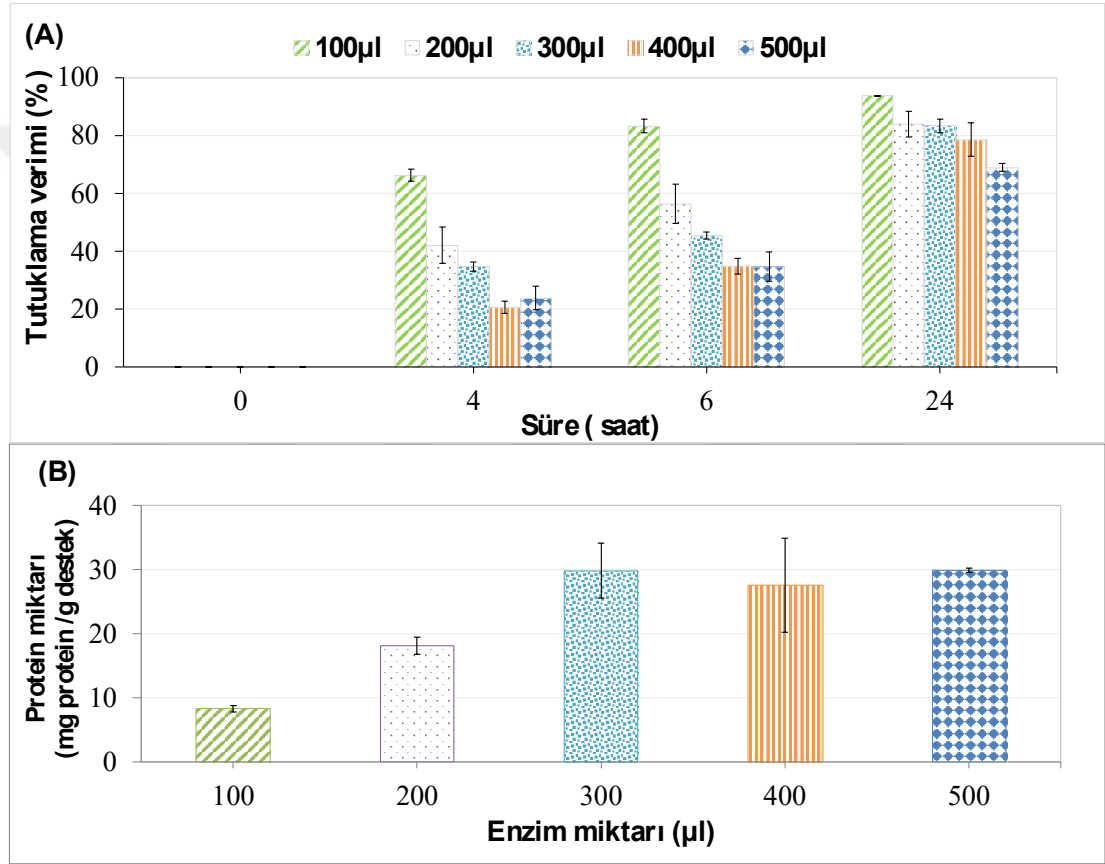
Şekil 4.3. Tutuklanan protein miktarına (A) ve enzim aktivitesine (B) sıcaklığın etkisinin incelenmesi (Deney koşulları: 100 µl TL 100 L, 6 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 200 rpm, 24 h, 0,5 g destek)

4.1.3. Enzim derişiminin etkisi

Kullanılan enzim miktarının artması ile tutuklanan enzim miktarı azalabileceği gibi sabit kalması durumu da gözlenebilir. Optimum enzim derişiminin seçilmesi proses maliyetini de olumlu yönde etkileyebilir. Enzim miktarının tutuklama verimi ve tutuklanan protein miktarına olan etkisi Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Enzimin tutuklandığı destek miktarı sabit tutularak enzim miktarının artırılmasıyla zamanla alınan örneklerin tümünde tutuklama veriminde bir düşüş gözlemlenmiştir. 24 saat sonunda 100 µl enzim kullanımında en yüksek tutuklama verimi %93,6 olarak elde edilmiştir. Ortama eklenen enzim miktarının artmasıyla destek başına tutuklanan protein miktarı önce artmış, 300 µl (52,5 mg/ml) enzim eklemesi ile en yüksek değere (29,8mg protein/g destek) ulaşmış, artan enzim miktarı ile bu değer yaklaşık

olarak sabit kalmıştır. Bu sonuçlara göre sonraki tutuklama proses parametrelerinin incelendiği deneylerde 300 µl (52,5 mg/ml) enzim miktarı uygun bulunmuştur.

Literatürde TL 100 L lipazının Fe₃O₄-KTS temelli bir taşıyıcı üzerine tutuklaması incelendiğinde tutuklama veriminin enzim derişimi arttırıldığında belli bir yere kadar arttığı daha sonra düşüş eğiliminde olduğu görülürken, 19,8 mg/g enzim derişimi kullanımı ile en yüksek tutuklama verimi %75, tutuklanan protein miktarı ise 16,8 mg protein/g destek olarak belirlenmiştir [73].

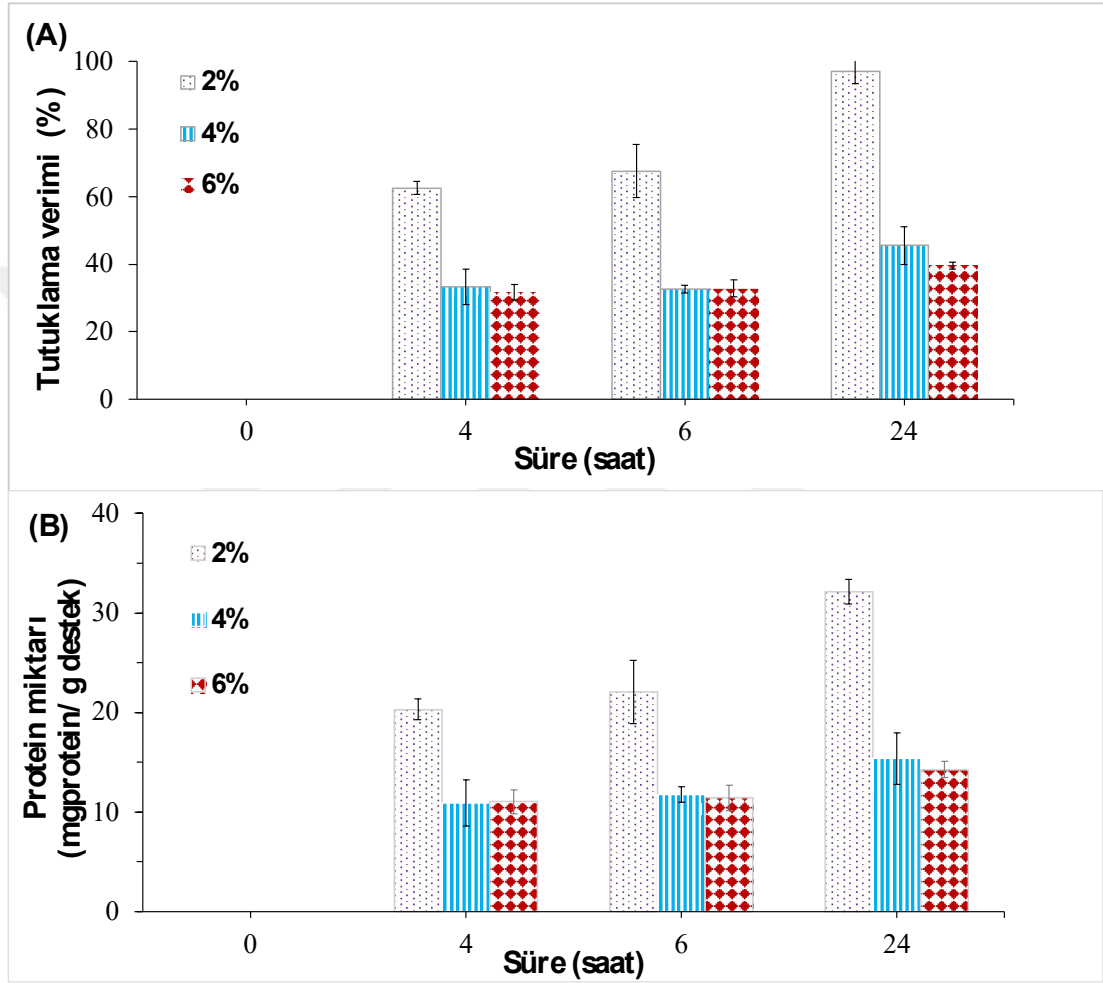


Şekil 4.4. Enzim miktarının tutuklama verimi (A) ve tutuklanan protein miktarına (B) etkisi (Deney koşulları: 6 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 200 rpm, 35°C, 24 h, 0,5 g destek)

4.1.4. Çapraz bağlayıcı derişimi etkisi

GLA derişiminin tutuklama verimi ve tutuklanan protein miktarına etkisi Şekil 4.5'de verilmiştir. Çapraz bağlayıcı kullanılmaması durumunda (%0 GLA) enzimde kümeleşme görüldüğü için bu koşulun tutuklamaya etkisi incelenememiştir. Tutuklama süresi sabit iken GLA derişimi arttıkça hem tutuklama verimi (Şekil 4.5-A) hem de tutuklanan protein miktarının (Şekil 4.5-B) düştüğü söylenebilir.

%2 GLA derişimi kullanımında tutuklama süresinin artmasıyla verim artmış ve 24 saat sonunda maksimum tutuklama verimine (%97) ve maksimum tutuklanan protein miktarına (32,14 mg protein/ g destek) ulaşılmıştır. Daha yüksek GLA deşimlerinde ise verimde ve tutuklanan protein miktarında tutuklama süresinin artmasıyla fazla bir artış olmamıştır.



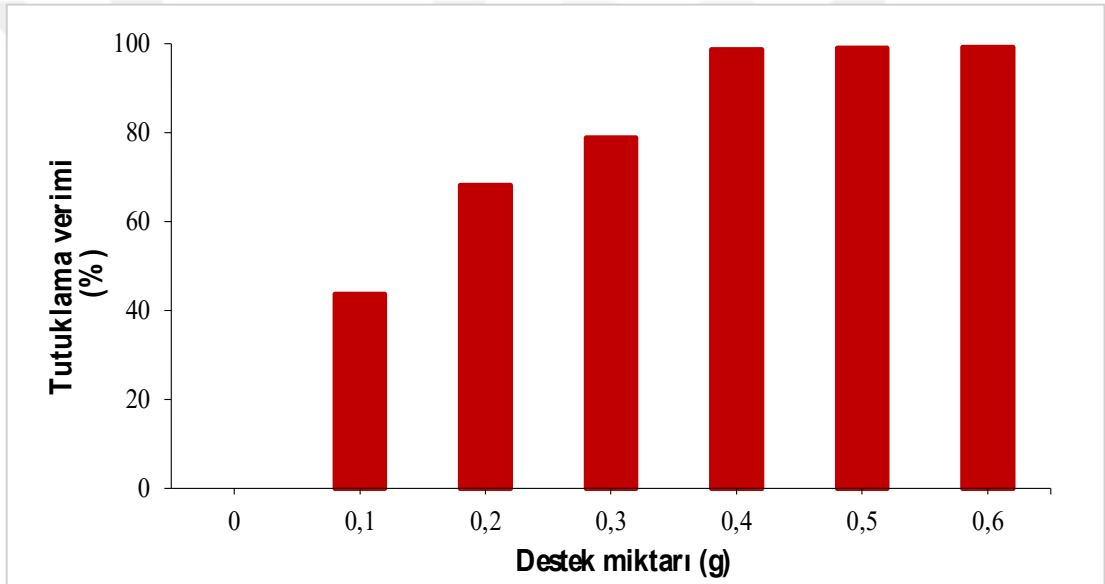
Şekil 4.5. GLA derişiminin tutuklama üzerindeki etkisi, (A) Tutuklama verimi, (B) Tutuklanan protein miktarı (Deney koşulları: 6 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 200 rpm, 35°C, 24 h, 0,5 g destek)

Literatürde KTS üzerine polivinilpirolidon ve karbon nanotüp eklenerek hazırlanan bir destek malzemesi üretimi için için çapraz bağlayıcı GLA oranı % 2 olarak kullanıldığı görülmektedir [74]. Literatürde yapılan başka bir çalışmada ise, KTS-karbonanotüp destek malzemesi, epiklorohidrin ile çapraz bağlanarak oluşturulmuş, pankreatik kaynaklı lipaz enzimi %64,3 verimle tutuklanmış, 1,16 mg protein/g destek miktarı bulunurken tutuklanan enzimin aktivitesi 0,174 U/g bulunmuştur [103].

Yapılan bu tez çalışmasıyla KTS/f- ÇDKNT ile polivinilpirolidon kullanılmadan üretilen biyonanokompozit taşıyıcı destek için uygun GLA oranının %2 (v/v) olduğuna ve sonraki deneylerde de bu derişimin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.5. Destek miktarı etkisi

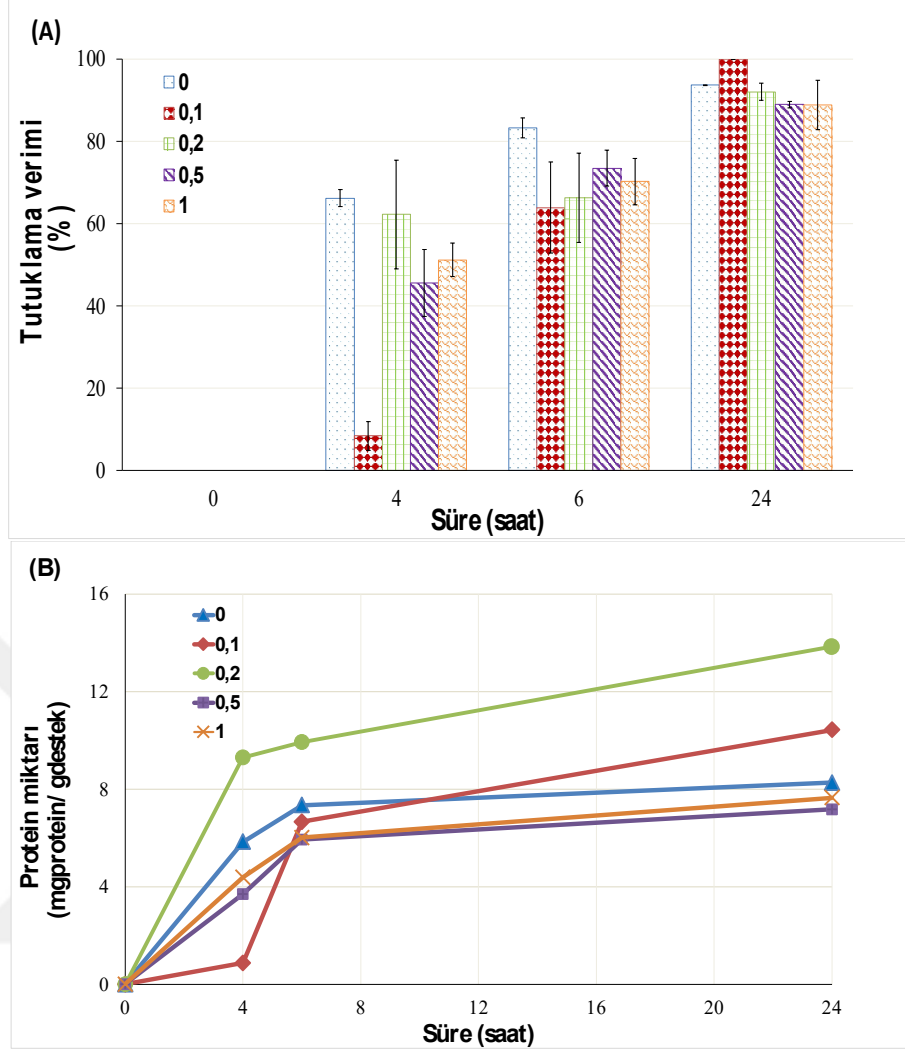
Tutuklanmış enzim içeren biyonanokompozit destek miktarının tutuklama verimi üzerindeki etkisi Şekil 4.6'da verilmiştir. Destek miktarının 0,5 g değerine kadar artırılması ile tutuklama veriminin artarak en yüksek değere (%99) ulaştığı, bu değer üzerinde ise sabit kaldığı söylenebilir. Bu nedenle sonraki deneylere 0,5 g biyonanokompozit destek ile devam edilmiştir.



Şekil 4.6. Destek miktarının tutuklama verimi üzerindeki etkisi (Deney koşulları: 3 ml 0,1 M Tris-HCl, 200 rpm, 35°C, 24 h, 100 µl TL 100 L)

4.1.6. ÇDKNT miktarının etkisi

KTS'na eklenen f-ÇDKNT miktarının destek başına tutuklanan protein miktarına ve tutuklama verimine etkisi Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde hem kontrol (%0 f-ÇDKNT) hem de tüm f-ÇDKNT derişimlerinde sürenin artmasıyla verim artmıştır. %0,1 (w/v) f-ÇDKNT miktarı ile 24 saat sonunda en yüksek tutuklama verimi (%100) elde edilmiş, artan f-ÇDKNT değerleri ile verimde düşme gözlenmiştir (Şekil 4.7-A). f-ÇDKNT derişiminin artmasıyla tutuklanan protein miktarı önce artmış, %0,2 (w/v) derişiminde en yüksek değere (13,84 mg protein/g destek) ulaşmış ve bu derişimin üzerinde ise azalış göstermiştir (Şekil 4.7-B).



Şekil 4.7. f-ÇDKNT'nin tutuklama verimi (A) ve tutuklanan protein miktarı (B) üzerindeki etkisi (Deney koşulları: 6 ml 0,1 M Tris-HCl, 200 rpm, 35°C, 24 h, 100 µl TL 100 L)

Tutuklanmış olan enzimin hidroliz aktiviteleri incelendiğinde %0, %0,1, %0,2, %0,5 ve %1 (w/v) derişimlerinde f-ÇDKNT kullanımı için aktivite değerleri sırasıyla, 12,3 U/mg, 14,6 U/mg, 44,9 U/mg, 18,2 U/mg, 11,6, U/mg olarak hesaplanmıştır. Enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında %0,2 f-ÇDKNT içeren biyonanokompozit destek ile en iyi enzim aktivite değeri elde edilmesi nedeniyle sonraki deneyler için bu derişim kullanılmıştır. Literatürde yapılan benzer bir çalışmada, f-ÇDKNT eklenerek enzim tutuklanma işleminde geniş yüzey alanı sağlanması nedeniyle tutuklama veriminde önce bir artış ve daha sonra artan f-ÇDKNT miktarı ile azalış gösterdiği bilinmektedir [72]. Kitosana f-ÇDKNT eklenmesiyle tutuklanma veriminin ve tutuklanan protein miktarının artırılması öngörülmekteydi. Yapılan bu çalışmayla bu durumun kanıtlandığı söylenebilir.

4.2. YYY ile Deneyin Optimizasyonu

Biyonanokompozit kürelere enzim tutuklama işleminde, tutuklanma verimi ve tutuklanan enzim miktarı bağımlı değişkenler olarak belirlenmiş ve YYY ile tutuklama prosesi optimize edilmiştir. TL 100 L lipazının üretilen desteğe tutuklanması pek çok parametreye bağlıdır. Tutuklama işlemi için ön denemelerin yapılması YYY için önemlidir. YYY yönteminin kullanılabilmesi için Bölüm 4.1’de gerçekleştirilen tutuklama ön denemeleri sonucunda program üzerinde modelin çalıştırılması amacıyla optimizasyon sağlanmıştır. Design Expert programında modelin oluşturulmasını sağlamak için öncelikle ön denemelerle belirlenmiş olan en etkili bağımsız değişkenlerin (sıcaklık, pH ve enzim miktarı) aralık değerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tablo 4.1. Bağımsız değişkenleri içeren deney koşulları için yanıtlar

RUN	Sıcaklık (°C)	pH	Enzim (µl)	Tutuklama verimi (%)	Tutuklanan protein miktarı (mg/ gdestek)
1	40	7,25	400	87,34	41,33
2	40	7,25	200	94,43	19,94
3	35	7,50	300	98,07	32,15
4	30	7,25	400	86,34	37,76
5	40	7,75	200	98,7	24,6
6	45	7,50	300	93	30
7	35	7,50	100	93,6	8,28
8	35	7,50	300	99,73	32,55
9	35	7,00	300	78,79	23,74
10	30	7,75	200	92,39	19,92
11	40	7,75	400	97,84	44,89
12	30	7,25	200	94,85	23,13
13	35	7,50	300	98,77	32,21
14	30	7,75	400	92,4	40,37
15	25	7,50	300	95,93	38,42
16	35	7,50	300	98,68	31,01
17	35	7,50	300	98,5	32,07
18	35	7,50	500	87,78	50,55
19	35	8,00	300	99,57	30,7

Yapılan ön deneyler sonucunda, orta değerlerin sıcaklık için 35°C, pH için 7,5 Tris-HCl tamponu ve enzim miktarının 300 µl olarak belirlendi. Bu değerlere göre bağımsız faktörlerin alt ve üst aralık değerlerine karar verildi. Daha sonra bu değerler merkezi bileşik tasarımı (Central Composite Design), (CCD)) kullanıldı. Yapılan optimizasyon deneyleri için parametreler ve aralıkları 3. Bölüm Tablo 3.2’de ve desen tablosu Tablo 3.4’de verilmiştir. Önerilen modelin yeterliliği, varyans analizi (ANOVA) ile sağlanan doğrulama deneyleri kullanılarak ortaya çıkarıldığında Tablo 4.1’deki model tarafından verilen 19 tane yanıt meydana geldi.

4.2.1. Tutuklama veriminin YYY ile optimizasyonu

YYY’nde yanıtların sisteme girilmesi ile tutuklama verimi için en uygun model olarak Tablo 4.2’deki kuadratik model program tarafından önerilmiştir. Bunun nedeni, önerilen modelin uyumsuzluk p değerinin 0,0024 olması (<0,05) en etkileşimli sonucu vermesidir. P değerinin istatistiksel anlamlılığının kabul edilebilmesi için <0,05 olması gerekmektedir [105]. Böylece çalışmada kuadratik model seçilerek, etkileşim için toplu denklem Denklem (4.1)’de verilmiştir.

$$Y = 98,55 + 1,10 \times A + 2,04 \times B - 1,76 \times C + 1,40 \times A \times B + 0,0688 \times A \times C + 1,84 \times B \times C - 0,4505 \times A^2 - 2,47 \times B^2 - 2,09 \times C^2 \quad (4.1)$$

Tablo 4.2. Tutuklama verimi için YYY ile önerilen model tablosu

Kaynak	Ardışık p-değeri	Uyumsuzluğun p-değeri	Düzeltilmiş R ²	Tahmini R ²
Lineer	0,0173	0,0005	0,3778	0,1632
2FI	0,5688	0,0003	0,3383	-0,0382
Kuadratik	0,0048	0,0024	0,7765	0,0780
Kübik	0,0003	0,7269	0,9902	0,9769

Her katsayının önemi p değerlerine (p<0,05) göre değerlendirilmektedir. Test değişkenleri arasındaki karşılıklı etkileşim modelini anlamak için gerekli olan katsayıların her birinin önemi, p değeri azaldıkça artar.

Tablo 4.3 incelendiğinde, modelin F oranının 12,25, p değerinin ise 0,0005 olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.3. Tutuklama verimi için kuadratik modele ait ANOVA sonucu

Kaynak	Katsayı tahmini	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	98,55	539,92	9	59,99	12,25	0,0005
A-sıcaklık	1,10	19,38	1	19,38	3,96	0,0778
B-pH	2,04	224,48	1	224,48	45,85	<0,0001
C-enzim m.	-1,76	49,32	1	49,32	10,07	0,0113
AB	1,40	15,60	1	15,60	3,19	0,1079
AC	0,0688	0,0378	1	0,0378	0,0077	0,9319
BC	1,84	27,20	1	27,20	5,56	0,0428
A ²	-0,4505	4,81	1	4,81	0,9817	0,3477
B ²	-2,47	144,24	1	29,46	29,46	0,0004
C ²	-2,09	103,49	1	21,14	21,14	0,0013

Std. Sap. = 2,21, R² = 0,9246, Düzeltilmiş R² = 0,7765, Tahmini R² = 0,0780, C.V.= 2,35, Sinyal gürültü oranı (Adeq precision)=11,6832

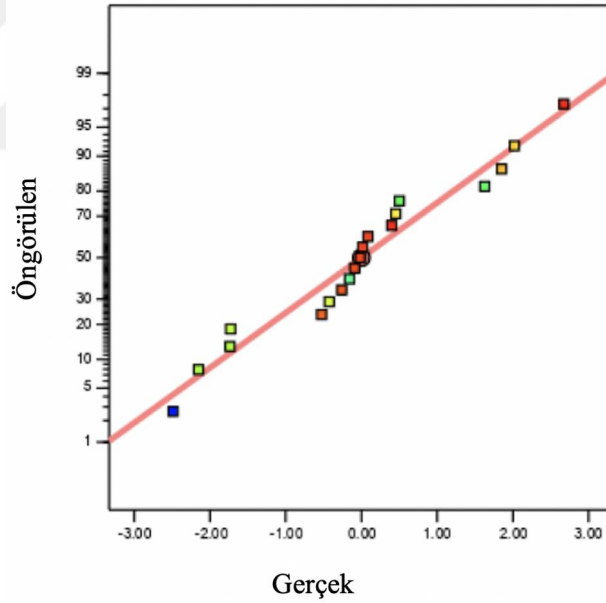
Tutuklama verimi için kuadratik modele ait ANOVA sonucu Tablo 4.3’de verilmiştir. Her katsayının önemi p değerlerine (p<0,05) göre değerlendirilmektedir. Test değişkenleri arasındaki karşılıklı etkileşim modelini anlamak için gerekli olan katsayıların her birinin önemi, p değeri azaldıkça artar. Tablo 4.3 incelendiğinde, modelin F oranının 12,25, p değerinin ise 0,0005 olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada parametreler tek tek değerlendirildiğinde pH, enzim miktarının anlamlı olduğu, ikili etkileşimlerde ise pH - enzim miktarı etkileşimi önemli olmuş, ayrıca pH ve enzim miktarı için ikinci mertrebe katsayıların anlamlı olduğu, p değerlerinin <0,05 den küçük olması ile belirlenmiştir. Bu terimler, oluşturulacak kuadratik modelde yer alacak en etkili terimler olarak değerlendirilmiş ve Denklem (4.1) gerekli sadeleştirmeler yapılarak Denklem (4.2) ile verilmiştir.

$$Y = 98,55 + 2,04 \times B - 1,76 \times C + 1,84 \times B \times C - 2,47 \times B^2 - 2,09 \times C^2 \quad (4.2)$$

Oluşturulan kuadratik modelin hata dağılımları incelendiğinde sabit varyansla dağıldığı görülebilir. Bu durum oluşturulan modelin güvenilirliğini gösterdiği söylenebilir. Ayrıca modelin regresyon katsayısı R² değerinin 0,9246 ve modeldeki değişim miktarı ölçümünü belirten düzeltilmiş regresyon katsayısı R² adj değerinin

ise 0,7765 olduğu görülebilir. Tahmini R^2 değeri ise 0,0780 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.3).

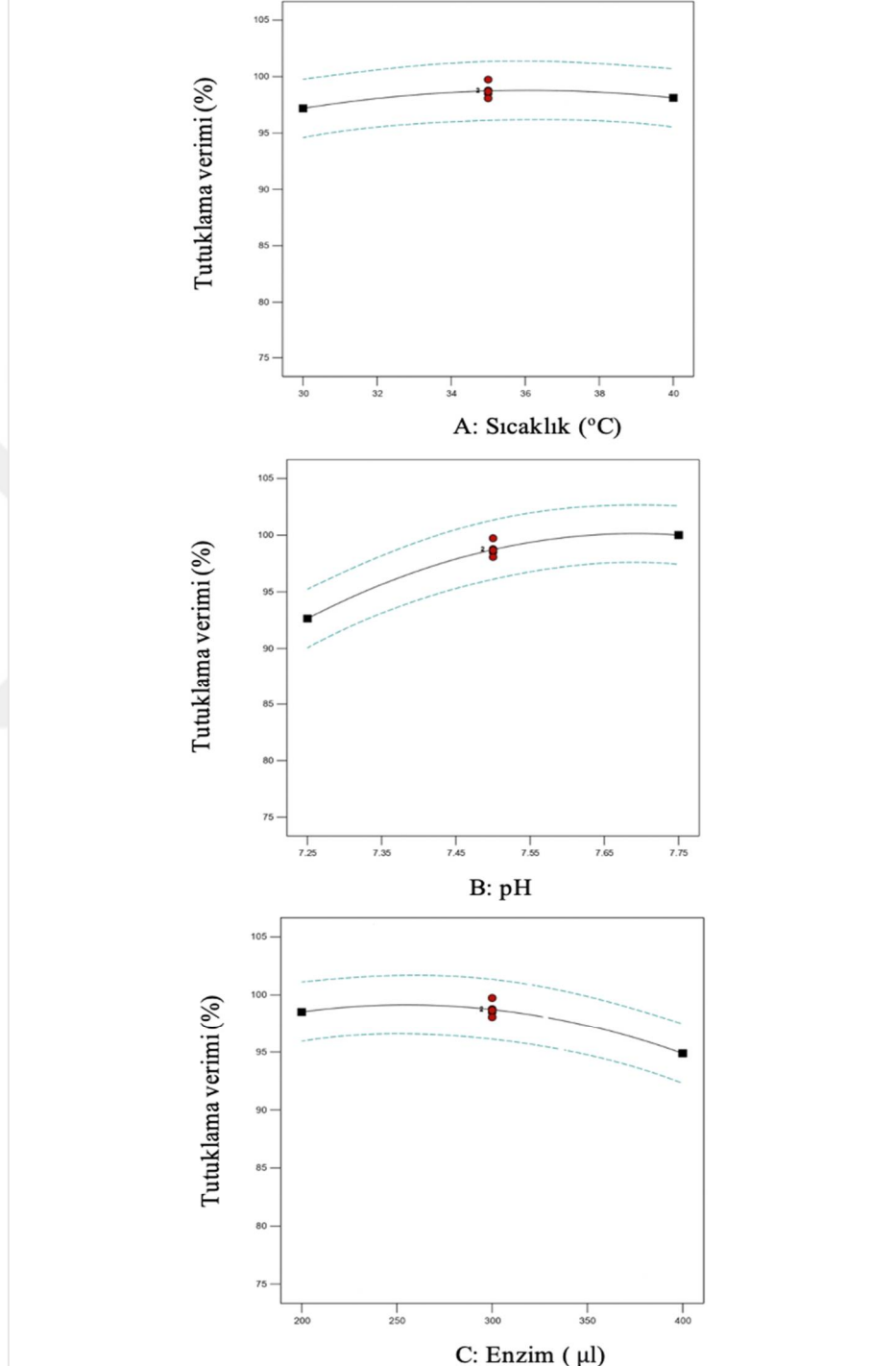
Tahmini değer ve öngörülen değer arasındaki fark birbirine yakın değerler çıkmamıştır. Tahmini ve düzeltilmiş R^2 değerleri arasındaki fark ($\sim 0,4$) 0,2'den büyük çıkmıştır. Bu durumda oluşan hata Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu durumun kontrolü doğrulama deneyleri ile sağlanabilir. Gürültü oranının sinyal ölçümünün yapılabilmesi için yeterli hassasiyeti (Adeq precision) değerinin 4'den büyük olması gerekmektedir, deneysel çalışmada bu değer için Tablo 4.3'de görüldüğü gibi 11,6832 yeterli bir sinyal değeridir. pH, sıcaklık ve enzim miktarı parametrelerinin tutuklama verimi üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için model denklemden faydalanılarak hazırlanan grafikler Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu grafikler hazırlanırken incelenen parametrenin alt ve üst sınır değerleri arasındaki fark esas alınırken diğer iki parametrenin merkez nokta seviyesi sabit olarak alındı.



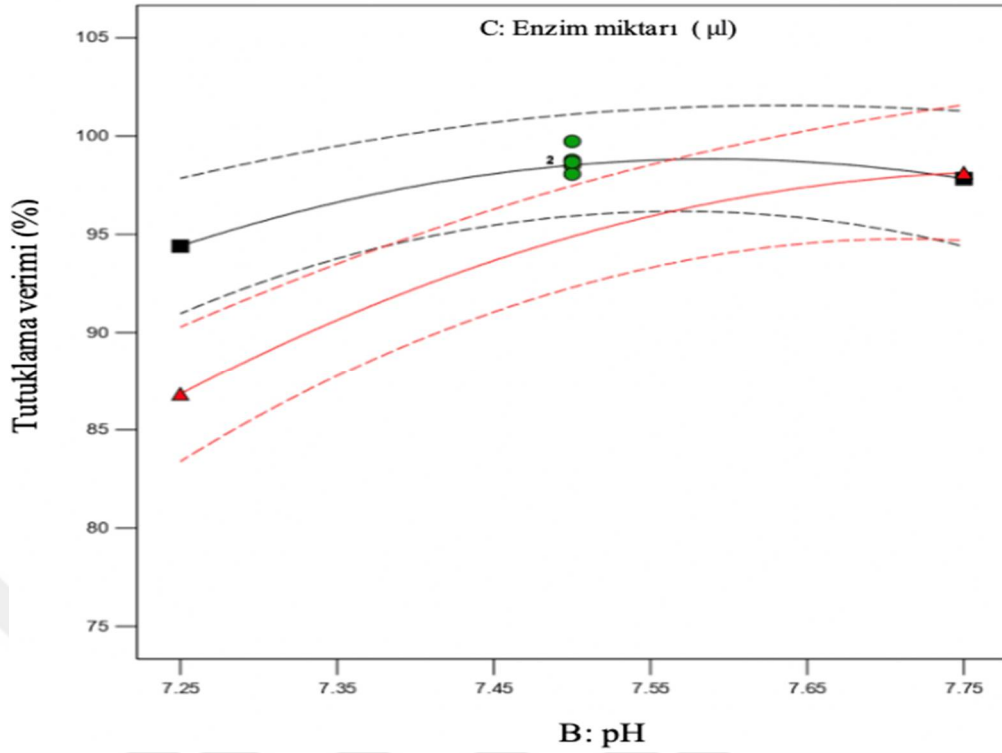
Şekil 4.8. Tutuklama verimi için hataların dağılım eğrisi

Tutuklama verimine en çok etki eden parametrelerin Şekil 4.9 incelendiğinde pH ve enzim miktarı olduğu söylenebilmektedir. pH değeri arttıkça tutuklama verimi artarken, enzim miktarı ise belirli bir noktaya kadar artış göstermiş daha sonra azalma göstermiştir.

Bu yüzden çok fazla miktarda enzim miktarı ile çalışılmamalıdır. Çalışılan değer aralıklarında sıcaklık parametresinin tutuklama verimi üzerine anlamlı bir etkisinin olduğu söylenemez.



Şekil 4.9 Parametrelerin tutuklama verimi üzerindeki etkisi (A):Sıcaklık etkisi (Diğer iki parametre orta değerde, pH:7,5; enzim:300 µl); (B): pH etkisi (Diğer iki parametre orta değerde, sıcaklık: 35°C ; enzim :300 µl);(C) Enzim miktarı etkisi (Diğer iki parametre orta değerde, pH:7.5; sıcaklık: 35°C)

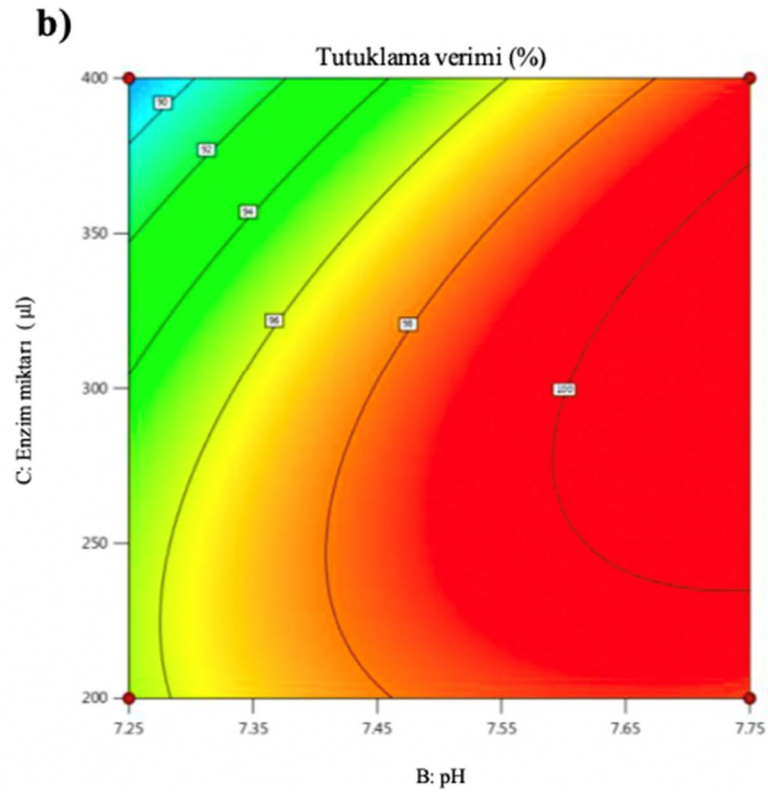
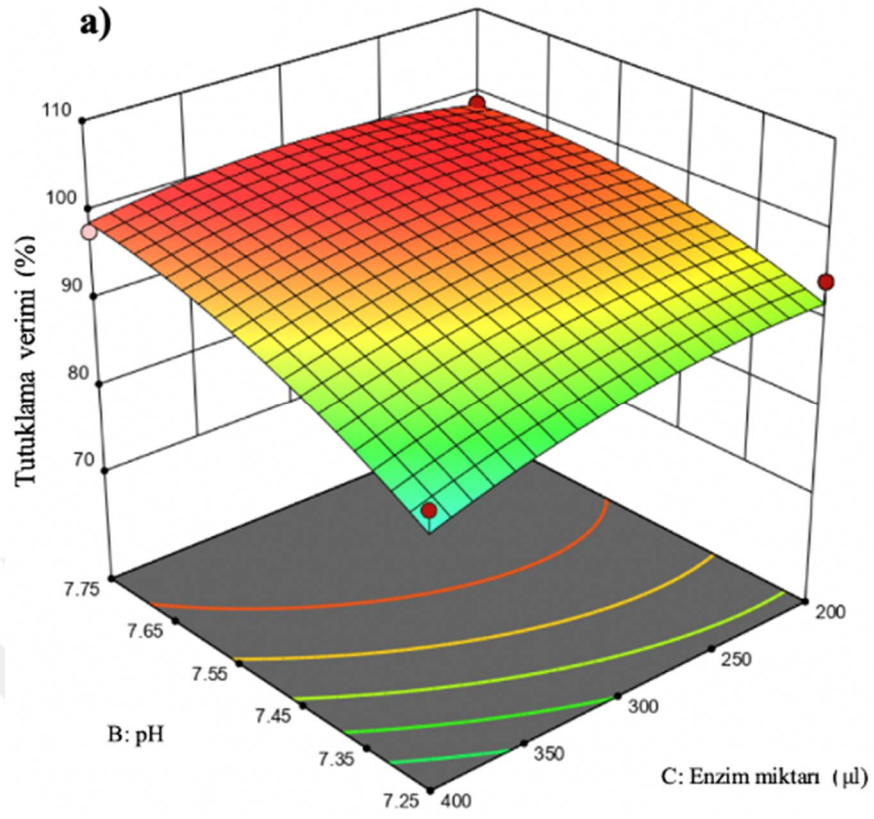


Şekil 4.10 pH ile enzim miktarının tutuklama verimindeki iç etkileşimi

Şekil 4.10'da sıcaklık 35 °C'de sabit tutulduğunda pH ve enzim miktarı etkisinin tutuklama verimine olan iç etkileşimi incelenmiştir. Enzim miktarı 400 μ l ve üzerinde tutulduğu zaman pH'ın da artmasıyla tutuklama verimi artmaktadır.

Ancak pH değeri düşürülür enzim miktarıda arttırılırsa tutuklama veriminde düşüş gözlemlenmektedir. Enzim miktarı 200 μ l iken pH artması tutuklama verimi üzerine çok fazla etki ettiği söylenemez. Tutuklama verimine pH ve enzim miktarının etkisi üç boyutlu ve iki boyutlu çizimler halinde Şekil 4.11'de verilmiştir.

Grafik incelendiğinde enzim miktarı ve pH arasında ters ilişki görülmüştür. Enzim miktarı sabit tutulurken pH değeri arttıkça tutuklama verimi de artar. Fakat pH sabit tutulurken enzim miktarı artarsa tutuklama verimi azalmaktadır. Böylece enzim miktarı artışı tutuklama verimi üzerinde olumsuz etki oluştururken pH artışı olumlu etki yaptığı görülmüştür. Tutuklama verimine diğer ikili etkileşimlerin (enzim-pH ve pH- sıcaklık) etkisi üç boyutlu grafikler halinde EK-C'de verilmiştir.



Şekil 4.11 Tutuklama verimine pH ve enzim miktarının etkisi (sıcaklık orta değerde, 35°C) (a) Üç boyutlu gösterim, (b) İki boyutlu gösterim

4.2.2. Tutuklanan protein miktarının YYY ile optimizasyonu

Destek başına tutuklanan protein miktarının YYY ile modellenmesi Tablo 3.3'deki deney deseni esas alınarak yapıldı. YYY'nde yanıtların sisteme girilmesi ile tutuklanan protein miktarı için en uygun model olarak Tablo 4.4'de kuadratik model program tarafından önerilmiştir.

Bu deney deseni baz alınarak verilen yanıtlar programa girildiğinde, modelin regresyon katsayısı R^2 değerinin 0,9753, tahmini R^2 değeri 0,8021, düzeltilmiş R^2 değeri ise 0,9506 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.5).

Tahmini ve gerçek R^2 değerleri arasındaki fark $<0,2$ 'den küçüktür. Sonuçlar bize modelin uygun olduğunu göstermektedir. Gürültü oranının ölçülebilmesi için gerekli olan sinyal (Adeq precision) değerinin 4'den büyük olması gerektiği bilindiğine göre, tutuklanan protein miktarı için bu değer 29,278 olması sinyal için yeterli sayılabilir ve bu model tasarım alanında kullanılabilir.

Tahmin edilen ve düzeltilmiş R^2 değerleri arasındaki fark lineer modelde $<0,2$ 'den küçük olsa bile düzeltilmiş R^2 değerinin kuadratik modelde daha yüksek olmasından dolayı bu çalışmada kuadratik model üzerinden denklem (4.3)'deki şekilde kurulmuştur.

$$Y = 98,25 - 0.2114 \times A + 0.8063 \times B + 10.08 \times C + 1.10 \times A \times B + 0.8251 \times A \times C + 0.5895 \times B \times C + 0.7933 \times A^2 - 0.6561 \times B^2 - 0.6499 \times C^2 \quad (4.3)$$

ANOVA tablosundaki faktör veya etkileşimin tepki üzerindeki etkisi p değerine bakılarak anlaşılmaktadır. %95 güven aralığında ($p < 0,05$) iken faktör veya etkileşimin tepki üzerinde anlamlı olduğu sonucuna ulaşılır. Tutuklanan protein miktarı için kuadratik modele ait ANOVA sonuçlarını gösteren Tablo 4.5 incelendiğinde p değerlerine göre en etkili parametrenin enzim miktarı olduğu söylenebilir ($p < 0,0001$). Parametrelerin ikili etkileşimleri ve 2. mertebe katsayıları yüksek p değerleri ile modelde önemsiz terimler olarak ifade edilebilir. Yukarıdaki denklemde etkili terimler üzerinden gerekli sadeleştirmeler yapılarak Denklem (4.3), Denklem (4.4)'deki haline dönüşmektedir.

$$Y = 98,25 + 10.08 \times C \quad (4.4)$$

Tablo 4.4. Tutuklanan protein miktarı için YYY ile önerilen model tablosu

Kaynak	Ardışık p-değeri	Uyumsuzluğun p-değeri	Düzeltilmiş R ²	Tahmini R ²
Lineer	< 0,0001	0,0022	0,9264	0,8828
2FI	0,5144	0,0018	0,9234	0,8316
Kuadratik	0,0763	0,0034	0,9506	0,8021
Kübik	0,0005	0,9893	0,9975	0,9989

Tablo 4.5 Tutuklanan protein miktarı için kuadratik modele ait ANOVA sonucu

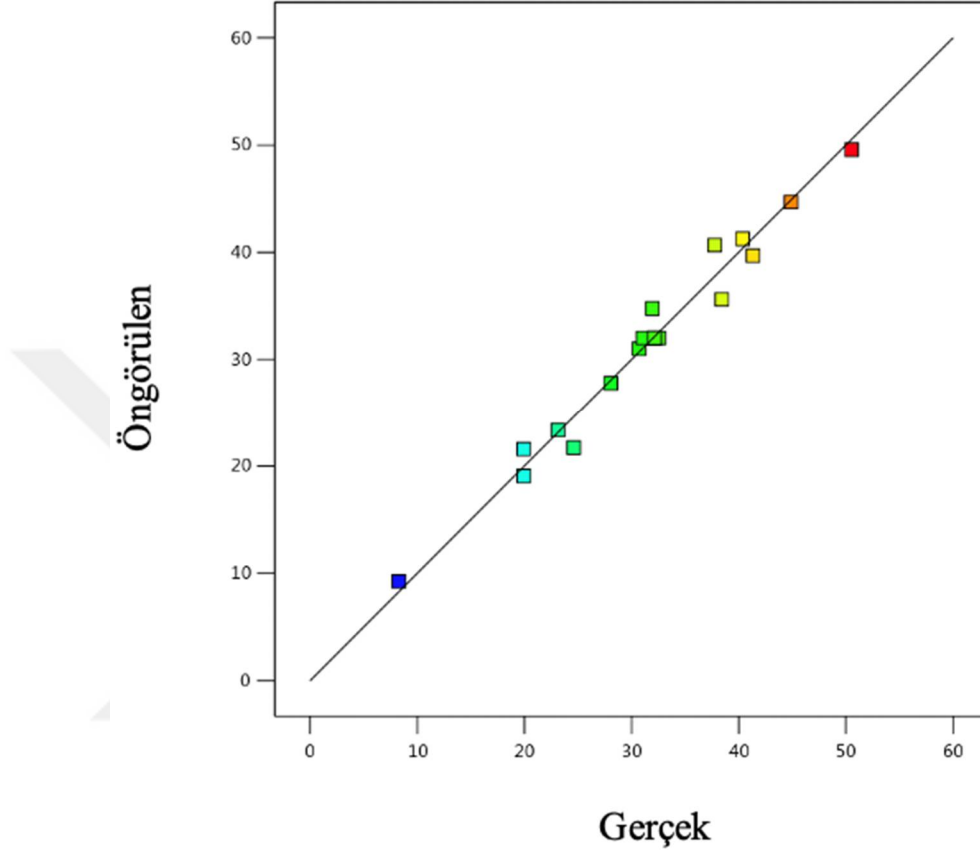
Kaynak	Katsayı tahmini	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	98,25	1700,96	9	189,0	39,51	<0,0001
A-sıcaklık	-0,2114	0,7150	1	0,7150	0,1495	0,7080
B-pH	0,8063	10,40	1	10,40	2,17	0,1744
C-enzim m.	10,08	1625,92	1	1625,92	339,86	<0,0001
AB	1,10	9,71	1	9,71	2,03	0,1879
AC	0,8251	5,45	1	5,45	1,14	0,3138
BC	0,5895	2,78	1	2,78	0,5811	0,4654
A ²	0,7933	14,90	1	14,90	3,11	0,1114
B ²	-0,6561	10,19	1	10,19	2,13	0,1784
C ²	-0,6499	10,0	1	10,0	2,09	0,1821

Std. Sap. = 2,19, R² = 0,9753, Düzeltilmiş R² = 0,9506, Tahmini R² = 0,8021, C.V. = % 6,93, Sinyal gürültü oranı (Adeq precision) : 29,278.

Model F-değerinin 39,51 ve model p-değerinin <0,05'den küçük olması (p < 0,0001) modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Gürültü nedeniyle bu kadar büyük bir F değerinin oluşma ihtimali yalnızca %0,01'dir.

Tutuklanan protein miktarı için oluşturulan kuadratik modelin Şekil 4.12'de verilen hata dağılımları incelendiğinde sabit varyansla dağıldığı görülmektedir. Böylece oluşturulan modelin güvenli olduğu anlaşılabilir.

Tutuklanan protein miktarı için oluşturulan kuadratik modeli Şekil 4.12’de verilen hata dağılımları incelendiğinde sabit varyansla dağıldığı görülmektedir. Böylece oluşturulan modelin güvenli olduğu anlaşılabilir.

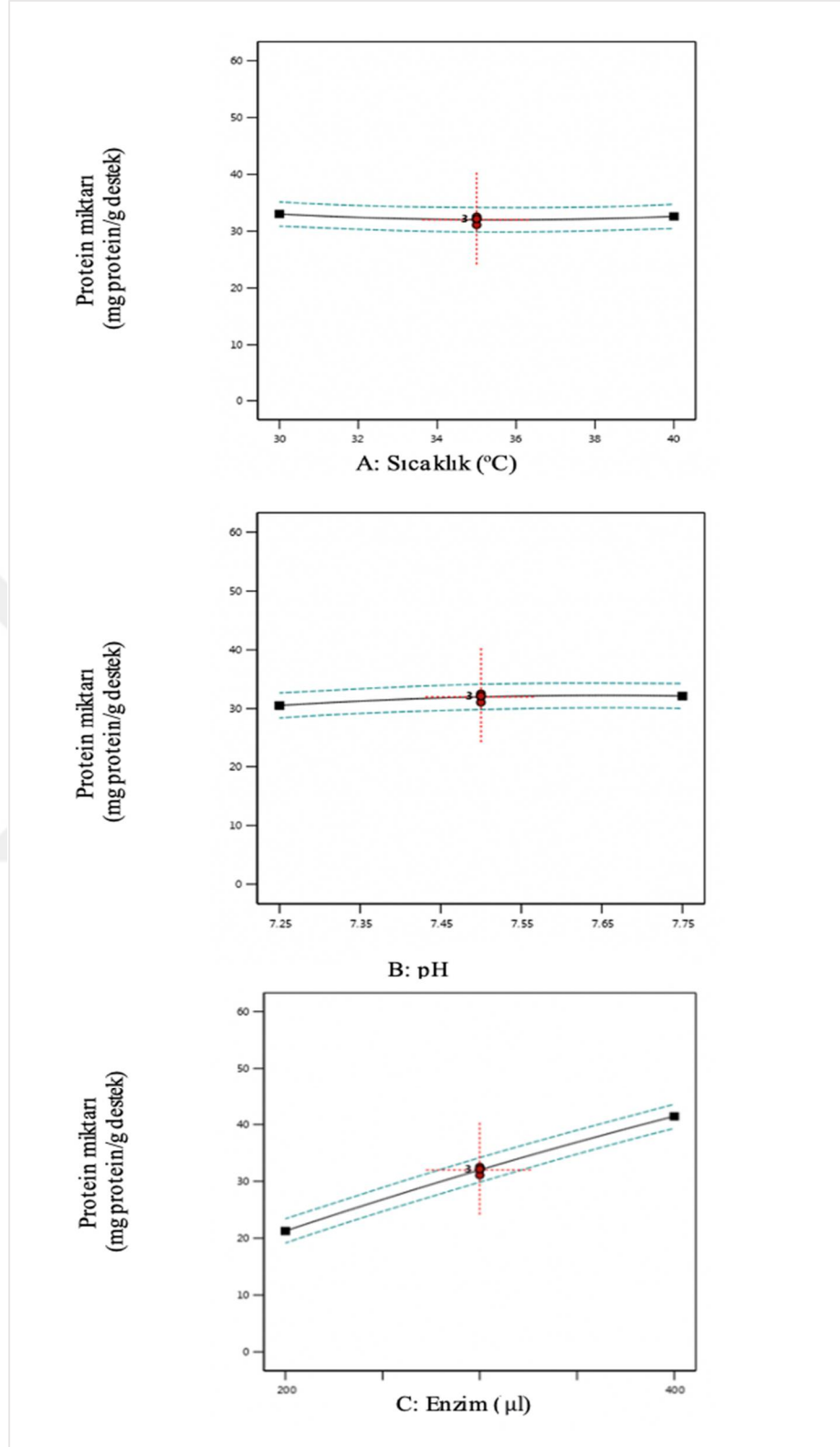


Şekil 4.12 Tutuklanan protein miktarı için hataların dağılım eğrisi

Biyonanokompozit desteğe tutuklanan protein miktarı üzerine sıcaklık, pH ve enzim miktarı parametreleri incelendiğinde aşağıdaki grafikler elde edilmiştir.

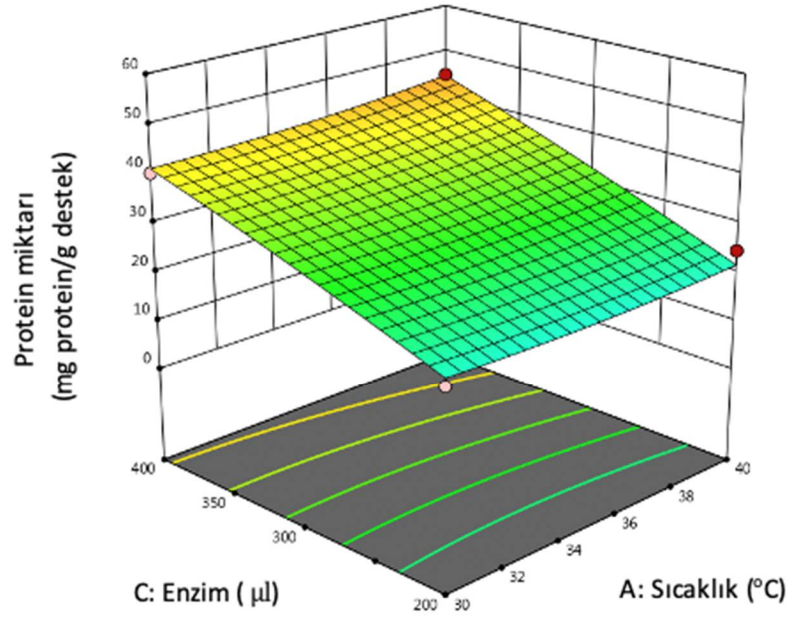
Biyonanokompozit desteğe tutuklanan protein miktarı üzerine sıcaklık, pH ve enzim miktarı parametrelerinin tek tek etkileri incelendiğinde Şekil 4.13 ile verilen grafikler elde edilmiştir.

Görüldüğü gibi desteğe tutuklanan protein miktarına en çok etki eden parametre enzim miktarıdır (Şekil 4.13-A). Enzim miktarı arttıkça desteğe tutuklanan protein miktarı da artar. Sıcaklık ve pH'ın tutuklama verimi üzerine incelenen aralıkta anlamlı bir etkisi yoktur (Şekil 4.13-B ve C).

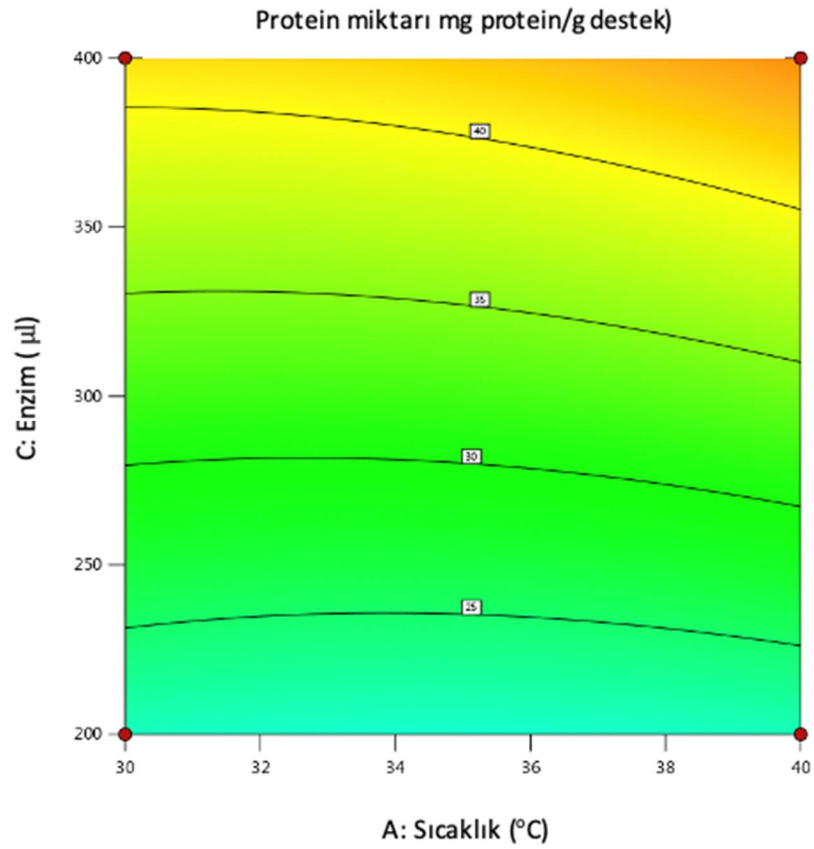


Şekil 4.13 Parametrelerin tutuklanan protein miktarı üzerine etkisi (A):Sıcaklık etkisi (Diğer iki parametre orta değerde, pH:7,5; enzim:300 µl); (B): pH etkisi (Diğer iki parametre orta değerde, sıcaklık: 35°C ; enzim :300 µl);(C) Enzim miktarı etkisi (Diğer iki parametre orta değerde, pH:7.5; sıcaklık: 35°C)

a)



b)



Şekil 4.14 Tutuklanan protein miktarına sıcaklık ve enzim miktarının etkisi (pH 7,5) (a) Üç boyutlu gösterim, (b) İki boyutlu gösterim

Şekil 4.14'de pH orta değer olan 7.5'ta sabit tutulduğunda, düşük enzim miktarında (250 µl ve altında) tutuklanan protein miktarının düşük olduğu ve bu değer in sıcaklık artışından fazla etkilenmediği gözlemlendi. Yüksek enzim miktarında (400 µl) ise tutuklanan protein miktarının arttığı, sıcaklık artışının ise bu değeri biraz düşürdüğü gözlenmiştir. Enzim miktarı ve sıcaklık değeri düştüğünde desteğe tutuklanan protein miktarında azalma görülmektedir. Sıcaklık sabit tutulurken enzim miktarı artarsa desteğe tutuklanan protein miktarı artmaktadır. Böylece enzim miktarı artışı desteğe tutuklanan protein miktarı üzerinde olumlu etki oluştururken sıcaklık artışının önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Tutuklanan protein miktarına sıcaklık-enzim ikili etkileşiminin etkisi üç boyutlu grafik halinde EK-D'de verilmiştir.

Kuo ve arkadaşları, *Candida rugosa* lipazının manyetik Fe₃O₄-KTS nanopartiküllere tutuklanmasına etki eden parametreleri (süre, pH ve enzim/destek oranı) inceledikleri çalışmada, en yüksek enzim aktivitesini 20 U/g Fe₃O₄-KTS olarak bulmuşlardır [93]. *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-100L) ve Novozyme 388 lipazlarının tutuklandığı bir başka çalışmada ise, adsorpsiyon yöntemi kullanılarak maliyetleri düşük olan üç farklı destek malzemesi (celite 545, silika jel ve stiren-divinil benzen kopolimeri) seçilmiş, tutuklama işlemi 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Celite 545 en iyi destek malzemesi olarak seçilmiş ve *Thermomyces lanuginosus* için maksimum tutuklama verimi % 79 olarak bulunmuştur. Kovalent olarak tutuklanan lipazların, tekrarlanan 10 kullanımdan sonra bile kararlı olduğunu kanıtlanmıştır [76].

Shadedi, *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipazını kullanarak silika jel üzerine tutuklama yapmıştır. pH 7, sıcaklık 25 °C'de, 3 saat süre ile 10 mg enzim/g destek koşullarında tutuklamayı gerçekleştirmiş, bu koşullarda tutuklama verimini %100 olarak bulmuştur [77].

YYY'den elde edilen optimizasyon değerleri; sıcaklık için 38.276 °C, pH için 7.75 ve enzim miktarı için 400 µl'dir. Bu koşullar altında modelin önerdiği tutuklama verimi %98,77 ve desteğe tutuklanan protein miktarı 42,377 mg protein /g destek değerlerinde olmuş, bu koşullarda gerçekleştirilen doğrulama deney sonuçları ise, tutuklama verimi için %91,76 ve protein miktarı için 35,7 mg protein/ g destek olarak bulunmuştur.

Tutuklama verimi için standart sapma değeri 4,7 ve desteğe tutuklanan protein miktarı için standart sapma değeri 4,9 olarak hesaplanmıştır. Literatür ile ve yapılan deneyler ile karşılaştırıldığında pH ve enzim miktarları birbirine yakın değerler olduğu söylenebilir.

Deneysel değer ve teorik değer karşılaştırıldığında oluşan farkın deney sırasında oluşturulan biyonanokompozit kürelerin farklı zamanlarda oluşturulan üretimlerden kaynaklanabileceği, tutuklama sırasındaki laboratuvar dış koşullarından kaynaklanabileceği gibi, deney sırasında kişisel kaynaklı yapılan el hatasından dolayı oluşmuş olabileceği yorumu yapılabilir. Fakat deney modelinin %90 üzerinde çıkması yapılan deneyin anlamlı ve güvenilir olduğunu göstermektedir.

4.3. Biyonanokompozit Desteğin Karakterizasyonu

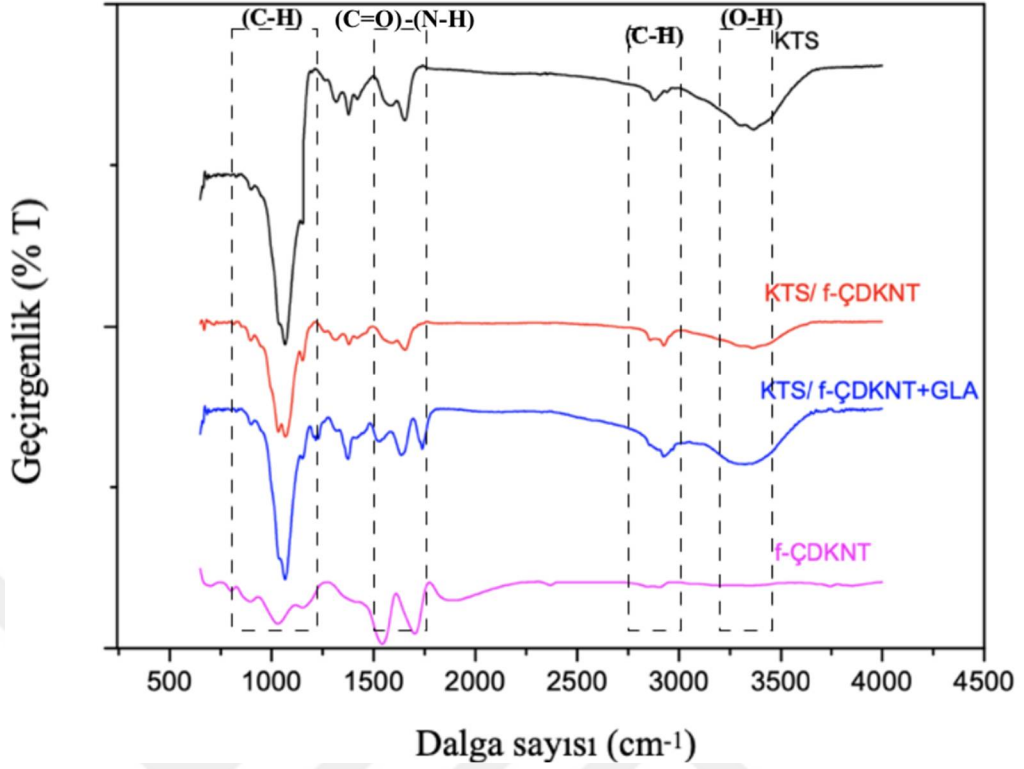
Bu bölümde üretilen yeni ve özgün KTS bazlı f-ÇDKNT ilaveli biyonanokompozit desteğin morfolojik karakterizasyonları bağ yapısının incelenmesi amacıyla FTIR spektroskopisi, termal dayanımının saptanması için TGA yöntemi, yüzey morfolojisi için SEM ve POM kullanılarak sonuçlar incelenmiştir.

4.3.1. FTIR analizi

Biyonanokompozit destek üretilmesi için KTS içerisine eklenen f-ÇDKNT ilavesi ve GLA eklenmesi ile bağ yapısında oluşabilecek değişiklikleri gösteren FTIR spektroskopisi Şekil 4.15’de verilmiştir. FTIR spektrumları incelendiğinde 3354-3279 cm^{-1} aralığında görülen yayvan pikler O-H gruplarına ait frekansa denk gelmektedir.

2923-2854 cm^{-1} aralığında görülen pikler ise C-H gerilmesinin olduğunu göstermektedir. 1643 cm^{-1} ’deki gerilme C=O bağının varlığını gösterirken ve Amid-I bandının oluştuğunu, 1574 cm^{-1} ’de meydana gelen pikler ve N-H bükülmesinden dolayı oluşan Amid-II bandına denk gelmektedir.

1060-1022 cm^{-1} aralığındaki derin pikler ise alifatik C-H düzlem içi eğrilmelerini ifade etmektedir. Biyonanokompozit desteğin O-H pik derinliğinin azalması ile işlemin başarılı olduğu söylenebilir.



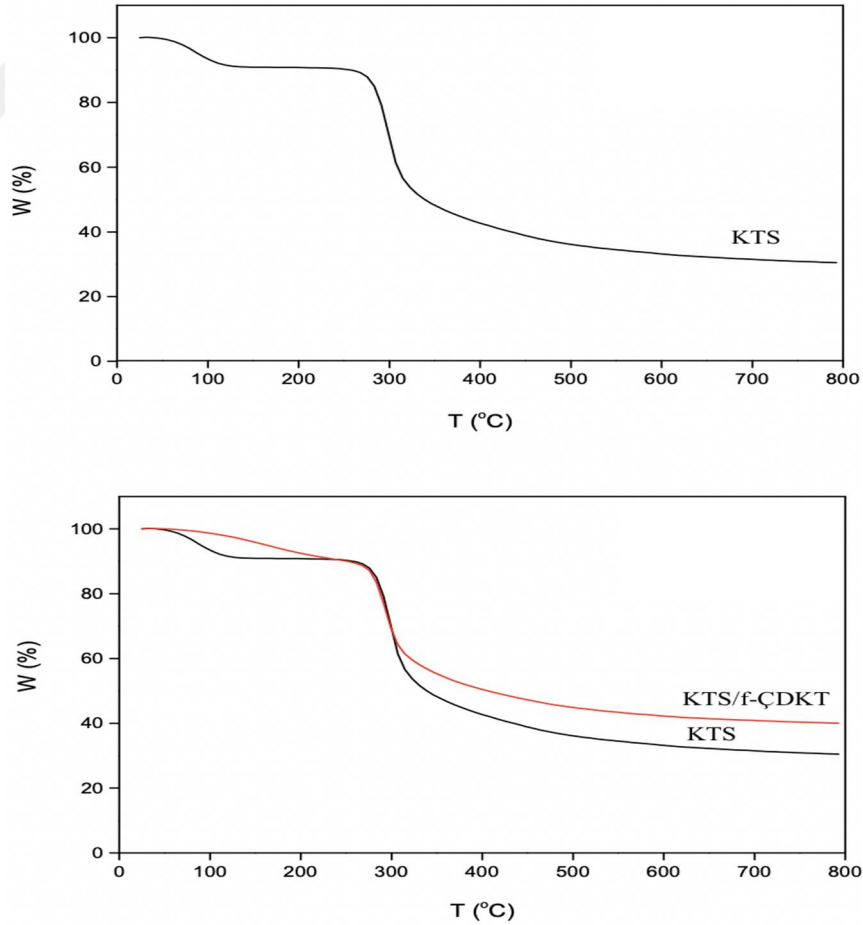
Şekil 4.15. Biyonanokompozit desteğin FTIR spektrumları

Literatürde yapılan bir çalışmada ise KTS, hidroksiapatit ve ÇDKNT kullanılarak oluşturulan kemik doku iskelesi KTS'ye ait karakteristik piklerin 3318 cm^{-1} frekansına karşılık gelen O-H pikleri, 2885 cm^{-1} 'de C-H gerilmelerinin olduğunu, $1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki Amid-I ve C=O bükülmelerinin olduğu, 1533 cm^{-1} N-H dalga sayındaki frekansa denk gelen pikler Amid II'nin varlığını kanıtlamaktadır [74]. Başka bir çalışmada ise, 1648 cm^{-1} 'deki frekansa karşılık gelen minik tepenin hidrojen bağlanmasını içeren karbonil gruplarına karşılık geldiği raporlanmıştır [94]. Üretilen destek için KTS ve f-ÇDKNT'nın başarılı bir biyonanokompozit oluşturduğu, karakteristik özellik taşıyan piklerin varlığı ile gözlemlenmiştir.

4.3.2. TGA analizi

TGA yöntemi ile üretilen biyonanokompozit desteğin ısı bozunma sıcaklıkları 0,5 ve 0,7 mg kuru destek alınarak N_2 ortam şartlarında $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'den başlayarak $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{dk}$ sıcaklık artış hızıyla $600 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar çıkarılarak yapılan ölçüm sonucu elde edilen bozunma grafiği Şekil 4.16'da verilmiştir. Grafiğe bakıldığında yaklaşık olarak iki basamaklı bir termal bozunma gerçekleştiği söylenebilirken, ilk %10'luk bir bozunmanın gerçekleştiği ve tek başına KTS'nin ısı bozunmasına bakıldığında

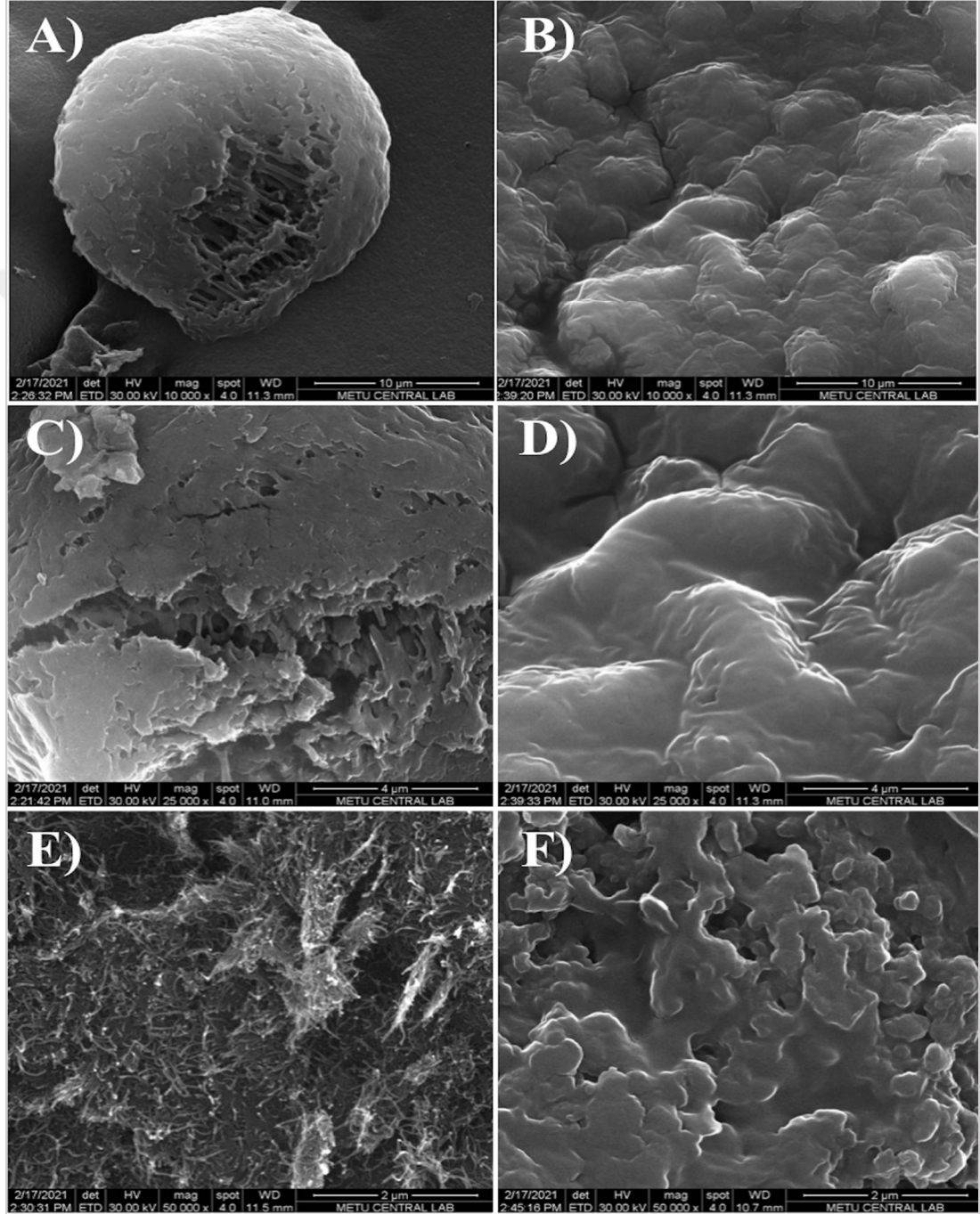
168,5 °C'de ilk bozunmanın gerçekleştiği ve kütle kaybının da % 9,1 olduğu görülmüştür. Oluşturulan biyananokompozit desteğin ilk ayrışma basamağının 231,9 °C'de olduğu söylenebilir. Sonuç olarak f-ÇDKNT eklenerek oluşturulan biyananokompozit desteğin ilk kademedeki bozunmasının 231,9 °C'de gerçekleştiği ve halen başlangıç kütlelerinin %90,8'ini koruduğu görülmüştür. Biyananokompozit destek üretilirken f-ÇDKNT ilavesi ile bozunma sıcaklığının arttırılacağı öngörülmekteydi, sonuçlar yorumlandığında ısıl bozunma sıcaklığının f-ÇDKNT ilavesi ile yaklaşık olarak 63,4 °C artarak daha geç bozunduğu söylenebilir. TGA eğrileri incelendiğinde biyananokompozit desteğin sadece KTS kullanılan desteğe göre ısıl kararlılığının artmış olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan bir çalışmada, KTS'nin ısıl bozunmasının iki basamaklı olduğu ve ilk bozunmanın 30 °C ile 145 °C aralığında içerisindeki nemin giderilmesiyle %5, ikinci basamağın ise KTS'nin parçalanmasından dolayı yaklaşık 150 °C'de %47, 500 °C ise %52 kütle kaybının olduğu raporlanmıştır [95].



Şekil 4.16. Biyananokompozit desteğin ısıl bozunma termogramları (Deney koşulları: 10 °C/dk hızla, N₂, 0,5-0,7 mg destek)

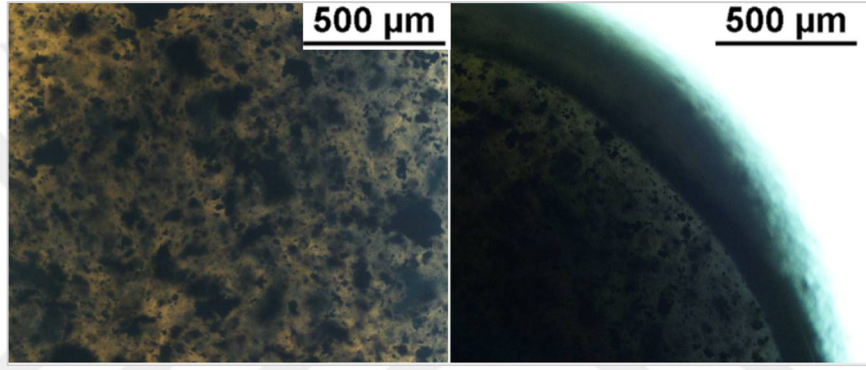
4.3.3. Yüzey analizleri (SEM, POM)

Biyonanokompozit desteğin enzim tutuklanmış ve tutuklanmamış olarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) altında analizi ile x10.000, x25.000 ve x50.000 büyütme oranlarında elde edilen sonuçlar Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

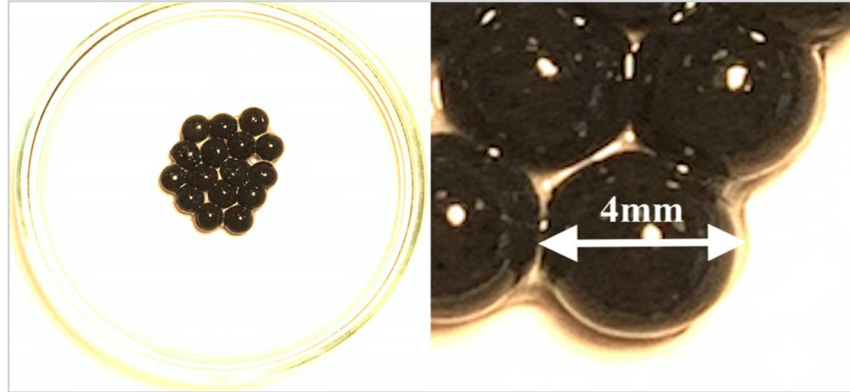


Şekil 4.17. Biyanokompozit desteğin SEM mikrografları ((a),(c) ve (e); enzim tutuklanmamış destek, (b),(d) ve (f) TL 100 L tutuklanmış destek)

SEM görüntüleri incelendiğinde biyonanokompozit desteğin yüzeyinin küresel formda olduğu ve bazı bölümlerinde derin boşluklar olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan çalışmaya bakıldığında glutaraldehit ile çapraz bağlı KTS'nin yüzey morfolojisinin pürüzsüz ve düz bir formda olduğu bilinmektedir [96]. Bu yüzden bu boşlukların içerisine eklenen f-ÇDKNT'lerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Enzim tutuklanan yapıların Şekil 4.17'deki (b,d,f) görsellerinde dağlanmış bir yapı oluşturduğu görülmüştür. Çapraz bağlanmış biyonanokompozit desteğin partiküllerinin mini partiküllerden oluştuğu ve bu yapıların substrat moleküllerinin desteğe tutunmasını kolaylaştıran bir çok küçük boşluklar sunduğu görülmüştür.



Şekil 4.18. Biyonanokompozit desteğin POM görüntüleri



Şekil 4.19. Biyonanokompozit desteğin boyutu

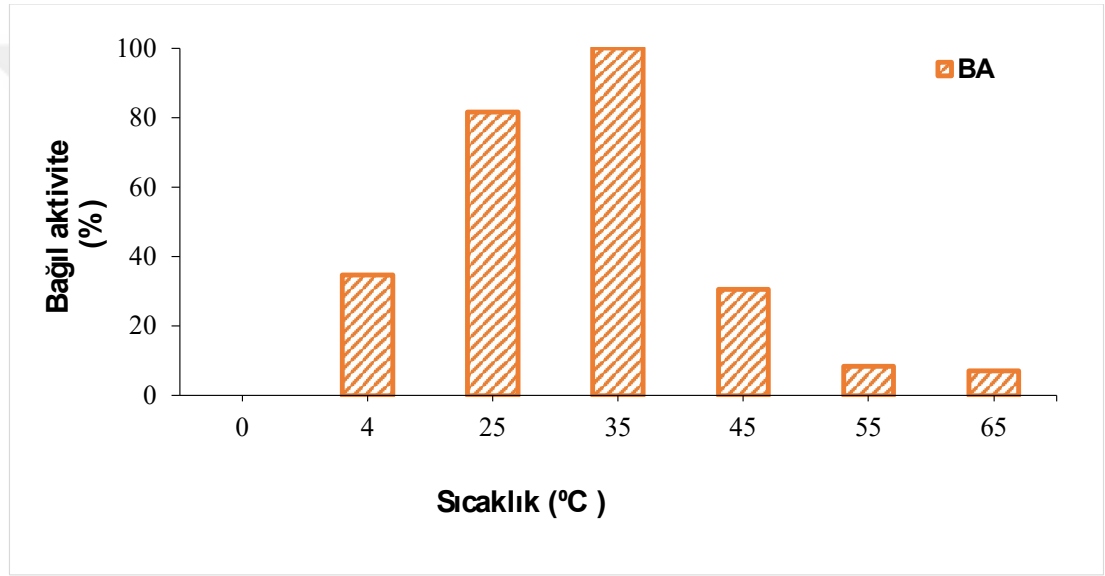
Yüzey özelliklerinin POM ile elde edilen görüntüler Şekil 4.18'da görülen agromerasyonların literatürle karşılaştırıldığında f-ÇDKNT'lerden kaynaklı olduğu, manyetik nanoparçacıklar ile KTS arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklandığı söylenebilir [93]. Kürelerin 12 megapiksel fotoğraf makinesiyle fotoğraflarının çekilmesi ile elde edilen görüntü ise Şekil 4.19'da görüldüğü gibidir. Bir küreciğin ortalama çapı 4 mm olarak ölçülmüştür.

4.4 Enzim Kararlılıkları

Bu başlık altında tutuklanan serbest formdaki TL 100 L lipazının termal, pH, tekrarlı kullanım ve depolama kararlılığı gibi parametreleri incelenmiştir.

4.4.1. Termal kararlılık

Biyonanokompozit desteğe tutuklanmış olan lipazın termal kararlılıklarının incelenmesi için tutuklama sonrasında, 4 - 65 °C sıcaklık aralığında ilgili tamponda 1 saat süre ile inkübe edildikten sonra ölçülen enzim aktiviteleri Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Tutuklanmış enzimin termal kararlılığı (İnkübasyon koşulları: 3ml 0,1 M Tris-HCl, 1h, 0,5 g destek)

Bağlı aktivitenin hesaplanması için maksimum aktivite değeri %100 olarak tanımlanmıştır. Grafik incelendiğinde, sıcaklığın 35 °C'ye artırılmasıyla tutuklanmış enzimin aktivitesinin önce arttığı, bu sıcaklıkta enzimin çalışması için gerekli olan maksimum değere geldikten sonra artan sıcaklıkla aktivitede düşüş yaşandığı görülmektedir. Bu düşüş artan sıcaklıkların tutuklanan enzimin denatürasyonuna neden olmasından dolayıdır.

35 °C'de enzim aktivitesinin %100'ünü korunduğu görülmektedir. Bu sonuca göre 35 °C'nin enzimin çalışması için uygun sıcaklık olduğu söylenebilmektedir. 65 °C'de ise aktivitenin sadece %7'si korunmuştur. Zeytinyağı hidroliz yöntemi kullanıldığı

için serbest enzimin termal kararlılığının ölçülmesi mümkün olmamıştır. Literatürde, TL 100 L enziminin termal kararlılığı ile ilgili çalışmaya pek rastlanılamamıştır.

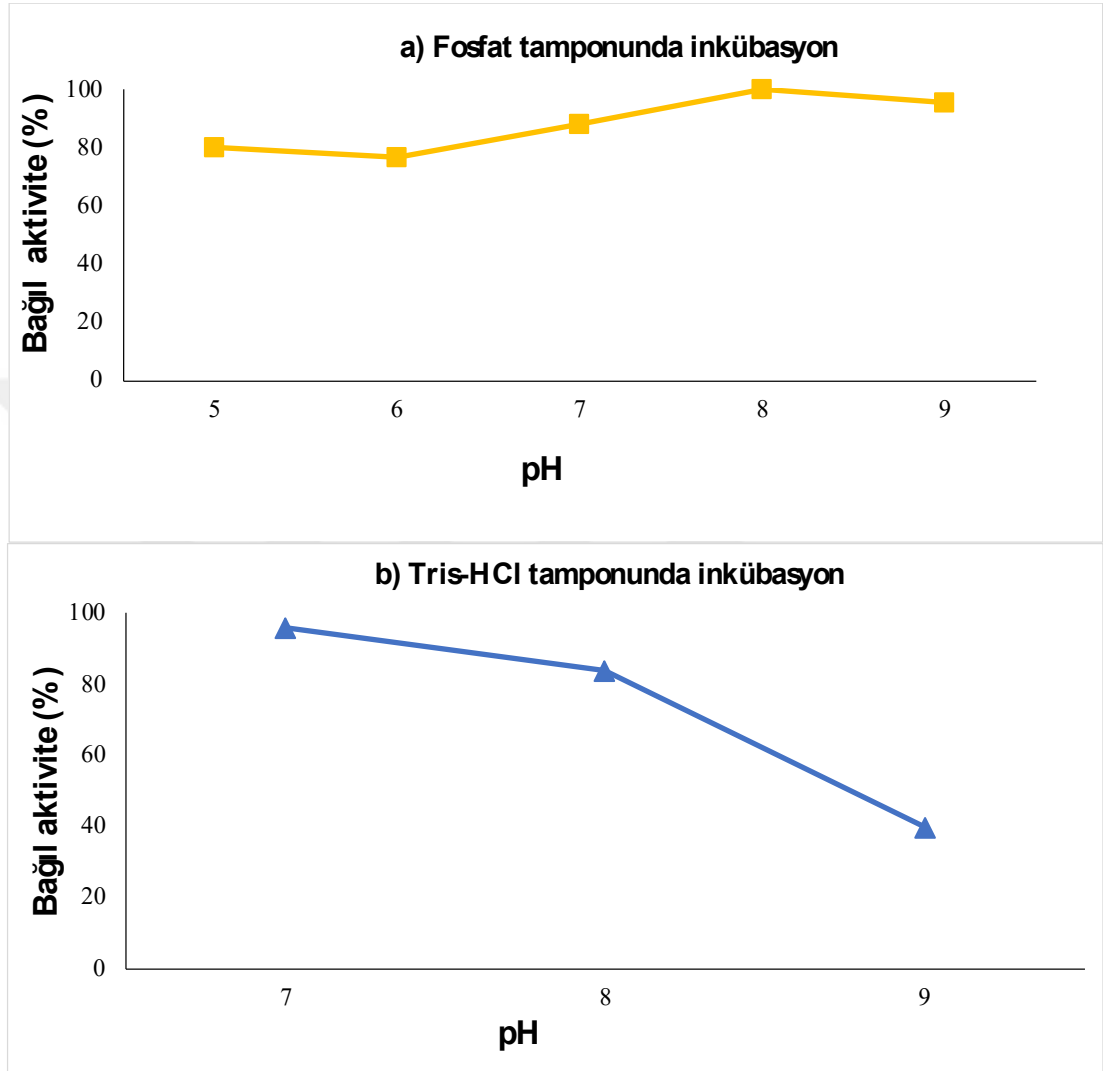
Wang tarafından yapılan bir çalışmada, manyetik partiküller üzerine kovalent bağama ile *Thermomyces lanuginosus* tutuklanmış, serbest ve tutuklanmış enzimlerin termal kararlılıkları karşılaştırılmış, tutuklanmış enzimin daha geniş bir sıcaklık aralığında (30-80 °C) çalışmış ve optimum sıcaklık olan 70 °C'de aktivitesinin %75'ini korurken, serbest enzim ise %30 mertebesinde kalan aktivite değerini koruduğunu söylemiştir [73]. Tutuklanmış enzimin yüksek sıcaklıkta aktivitesini koruması enzimin desteğe kovalent bağlarla bağlanmış olması nedeniyle inaktivasyondan korumuş olabileceği söylenebilir. Schroeck ve diğ. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, çapraz bağlanmış olan TL lipazını transesterleşme tepkimesinde kullanmışlar, balık yağı ve kolza yağı ile biyokatalizör elde edilmesinde, katalitik aktiviteyi 40 - 60 °C arasında incelemişler ve tutuklanan enzimin 50- 55 °C arasında maksimum aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir [97].

Serbest ve tutuklanmış enzimler karşılaştırıldığında genellikle tutuklanmış enzimlerin termal kararlılıkları artmaktadır [98]-[99]. Çapraz bağlama işleminin, tutuklama sırasında enzimin bağlarını güçlendirilmesi nedeniyle TL 100 L enziminin termal kararlılığını artırdığı söylenebilir. Endüstriyel üretimler dikkate alındığında kullanılan lipaz enzimlerinin sıcaklık, pH vb. gibi kararlılıklarının yüksek olması istenmektedir. Kovalent bağlama ile tutuklama işlemi, enzimlerin organik çözücülerler veya zorlayıcı sıcaklık koşulları gibi denatürasyona neden olabilecek ortam koşullarına karşı yüksek kararlılığa sahip olmasını sağlar .

4.4.2. pH kararlılığı

Tutuklanmış TL 100 L enziminin farklı pH'larda gösterdiği kararlılığı incelemek amacıyla iki farklı tampon ortamında deneyler gerçekleştirilmiş ve pH'a karşı enzimin göstermiş olduğu kalan aktivitesi bağıl olarak incelenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 4.21'de verilmiştir. Bağıl değeri hesaplamak için en yüksek değerdeki aktivite %100 olarak kabul edilmiştir. Fosfat tamponunda gerçekleştirilen deneyde, biyonanokompozit desteğe tutuklanan enzimin kalan aktivitesinde pH 7 ve pH 8 aralığında artış gözlemlenmiştir. Fosfat tamponunda pH 8'de aktivitesinin tamamını koruduğu söylenebilirken pH 7 de aktivitesinin %88'ini koruduğu

söylenbilir. Bu durumda tutuklanan enzimin çalışma aralığı için en uygun pH'ların pH 7 ve pH 8 aralığı olduğu söylenbilir. Literatürdeki yapılan diğer çalışmalarda da bu çalışmayı destekleyen pH 8 ve pH 8,5 gibi sonuçlar elde etmişlerdir [79-103].



Şekil 4.21. Tutuklanmış enzimin fosfat (a), Tris-HCl (b) tamponlarındaki pH kararlılığı (İnkübasyon koşulları: 3ml 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M fosfat, 1h, 0,5 g destek)

Tris-HCl tamponunda inkübe edilen tutuklanmış küreler için ise pH değeri arttıkça kalan aktivite değerinde düşüş gözlemlendi. pH 7 değerinde enzim aktivitesini %96'sının halen korunurken, pH 8 değerinde %83'lük ve pH 9 değerinde %40 kalan aktivitesinin korunduğu görüldü. Tris-HCl tamponunda daha düşük pH değerlerinin denenmemesinin nedeni biyonanokompozit destek için uygun pH değerlerinin incelenen değerler olduğudur.

Yapılan bir çalışmada, manyetik partiküllere *Thermomyces lanuginosus* lipazının ECH ile tutuklanmış, p-NPP yöntemiyle pH kararlılığı ölçülmüş; tutuklanmış olan lipazın serbest enzime göre pH 7 - 11 aralığında % 50 daha fazla aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir [73].

4.4.3. Tekrarlı kullanım

Tutuklanmış enzimlerin tekrarlı kullanım gibi mükemmel bir avantaj sağlaması, endüstride kullanımının daha cazip hale gelmesini sağlar. Doğru bir taşıyıcıya tutuklanan serbest formdaki enzimler sürekli üretimlerde veya çeşitli reaktörlerde enzimatik aktivitelerini tekrarlı kullanım için korumaktadırlar [100].

Tekrarlı kullanım sayısını ölçme koşulları ilk alınan hidrolitik aktivitesi t=0 olarak tanımlanmış olup daha sonra n-heptan, n-propanol, n-bütanol gibi çözücüler ile yıkama işlemi yapılarak hidroliz aktiviteleri belirlenmiş ve kalan aktivite değerleri Şekil 4.22’de ifade edilmiştir.

N-heptan, n-bütanol ve n-propanol gibi organik çözücüler yardımı ile yıkama işlemleri yapıldığında sırasıyla başlangıç aktivitelerinin 7 kez kullanımda (%72,4), 9 kez kullanımda (55,4), 9 kez kullanımda (%70,8) koruduğu söylenebilir. Kullanım sayısı arttıkça aktivitede sabit kalış ve daha sonrasında düşüş gözlemlenmektedir. Aktivitenin azalmasının nedeni biyanokompozit destekte kullanım sayısı arttıkça yıkama işleminden ve enzim sızıntısından kaynaklı oluşmuş olabileceği öne sürülebilir.

Çözücü kullanılmasının nedeni enzim aktivitesinin ölçülmesi için zeytinyağı hidroliz yönteminin kullanılması her hidroliz işleminden sonra ortamdaki serbest yağ asitlerinin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Çözücü kullanımının lipaza ve üretilen biyanokompozit taşıyıcı üzerinde olumsuz olarak etki yaratabileceği ve proses maliyetini arttıracığı göz önünde bulundurulmalıdır. Bu yüzden en uygun çözücünün seçilmesi gerekmektedir.

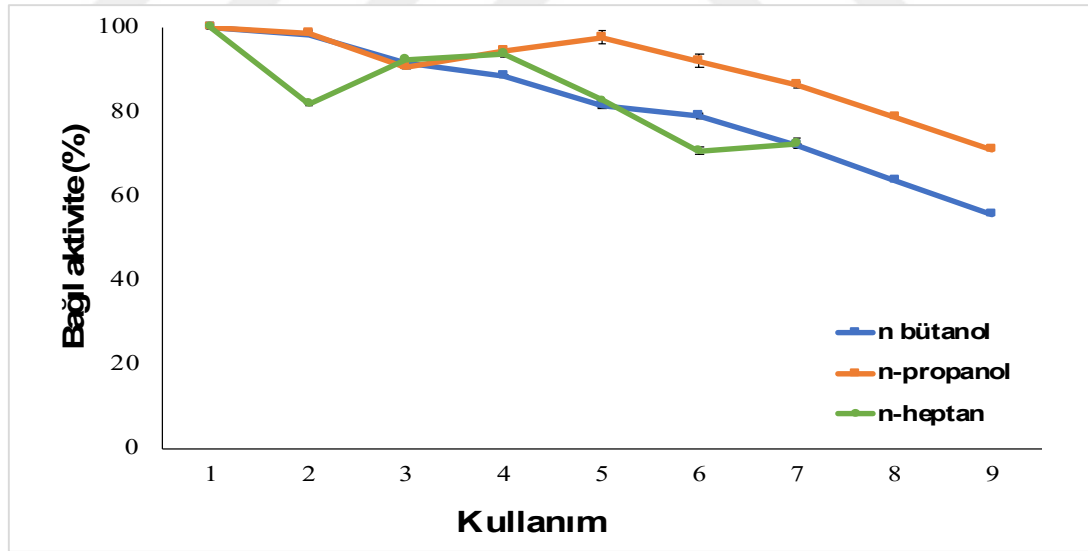
Literatürde yapılan bir çalışmada *Thermomyces lanuginosus* lipazının immobead 150-A desteğine tutuklandıktan sonra ayçiçek yağının hidroliz edilmesi sonucu %1 v/v) n-heptan kullanılmasıyla aktiviteyi %5,6 arttırdığı rapor edilmiştir [101]. Yapılan bir diğer çalışma PEI-oktil-gliksil üzerine tutuklanmış *Thermomyces*

lanuginosus lipazının galaktoksidaz desorpsiyonunda biyokatalizör olarak 3 kez kullanılması sonucunda başlangıç aktivitesinin %80'inini koruduğu saptanmıştır [102].

Wang ve diğ. yaptıkları çalışmada, KTS-manyetik partiküllere çapraz bağlanan TL enziminin p-NPP hidroliz yöntemiyle 10 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin hala %70'ini koruduğunu gözlemlemişlerdir [73].

Kutluk tarafından yapılan bir çalışmada ise atık kıyartma yağından biyodizel yağından üretimi için hidrotalsite tutuklanmış olan *Thermomyces lanuginosus* lipazının 4 kez kullanımı sonucunda yağ asidi metil esterleri içeriğinin yaklaşık olarak %50 oranında olduğu rapor edilmiştir [79].

Literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu tez çalışmasının, KTS/f-ÇDKNT ilavesi ile üretilen biyanokompozit desteğin 9 kez tekrarlı kullanım sonrasında % 70'in üzerinde aktivitesini korumasıyla, literature önemli katkı sağladığı söylenebilir.

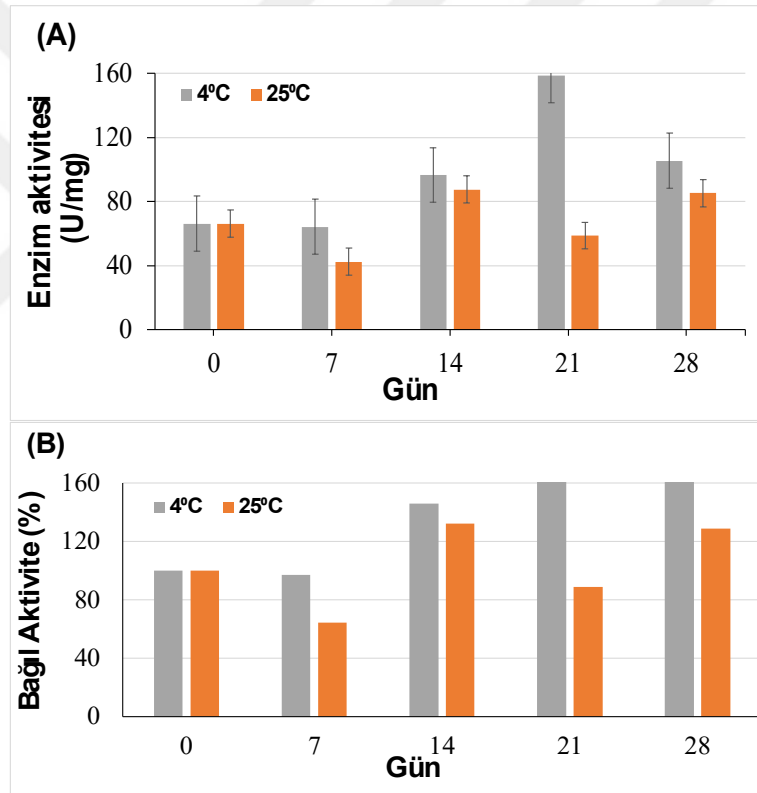


Şekil 4.22. Tutuklanmış enzimin tekrarlı kullanımı (Tutuklama koşulları: 35°C, 300 µl TL 100 L, 24 h, 200rpm, 0,5 g destek)

4.4.4. Depolama

Raf ömrünün incelenmesi, daha sonraki üretim proseslerinde kullanılması amacıyla, kurutularak +4°C' ve 25°C'de saklanan biyanokompozit desteklerin 28 gün boyunca depolama sonrası enzim aktivitesinin ne kadarını koruduğu Şekil 4.23 'de

belirtildiği gibidir. 28 gün boyunca haftada bir örnekler alınarak ölçümler yapılmıştır. Fakat burada çıkan ölçümlerden kararlı sonuçlar alınmadığı için işlem boncukların ilk olarak kurutulup daha sonra ilgili tamponda yaş haline getirildikten sonra hidroliz aktivitesinin ölçülmesi yolu izlenerek devam edilmiştir. İlk günkü aktivitesi %100 olarak tanımlanan desteğin 28 gün sonunda değişken aktivite değerlerine sahip olduğu söylenebilir. Aktivite kayıpları karşılaştırıldığında oda sıcaklığında depolanan örneklerin buzdolabına göre daha hızlı bir şekilde aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. Bu durumun her kürenin aktif merkez sayısının farklı olmasından veya kovalent bağlı olmasından dolayı farklı konformasyonlarının olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.23. Tutuklanmış enzimin raf ömrünün incelenmesi
a) enzim aktivitesi, b) Bağlı aktivite

Kovalent bağlı tutuklama yapılan lipazlarda, enzim aktivitesinin genel olarak artış gösterdiği bilinmektedir [103]. Literatürde yapılan bir çalışmada, iplikli destek materyaline *Thermomyces lanuginosus* lipazının tutuklanması sonucunda +4°C'de depolanan tutuklanmış enzimin 10. gün sonunda aktivitesinde artış gözlemlenirken, 25°C'de 18.günden sonra artış ve daha sonra düşüş gözlemlenmiştir [104].

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde ve yakın gelecekte enzimlerin özellikle lipazların endüstriyel alanda kullanımlarının giderek arttığı bilinmektedir. Fakat bu artışta ticari olarak kullanılan serbest enzimlerin en büyük dezavantajları tekrarlı kullanımlarının olmaması ve proses maliyetini olumsuz etkilemeleridir. Bu olumsuz durumun, bilim dünyasında yapılan enzim- taşıyıcı destek materyal çalışmaları ile giderilmesi hedeflenmektedir. Çevresel farkındalığın artması ve kimya sektöründe daha yeşil bir kimya anlayışının ilerlemesi gibi durumlar esas alındığında enzim taşıyıcı destek malzemesinin biyobozunur olması, toksik madde içermemesi ve güvenilir olması gibi önemli özellikleri göz önüne alınmaktadır.

Bu tez çalışmasında, yukarıda bahsedilenler doğrultusunda *Thermomyces lanuginosus* (TL 100 L) enzimin tutuklanması taşıyıcı bir destek materyal olan KTS bazlı yeşil çevreye ideolojisine uyumlu bir biyonanokompozit desteğe tutuklanarak biyokatalizör oluşturulması amaçlandı. Tutuklama işlemi için KTS esaslı bir malzeme seçilmesinin nedeni, KTS'nin doğada bolca bulunan çevre dostu ve kolay ulaşılabilen biyo kökenli bir polisakkarit olmasıdır. Desteğin nanoboyutta bir partikül taşıyarak az sarfiyat ile yüksek verim elde edilebilmesi için geniş yüzey alanı sağlaması ve mekanik dayanım gibi fiziksel özelliklerinin yüksek olmasından dolayı f-ÇDKNT tercih edilmiştir. Oluşturulan biyonanokompozit desteğin tutuklama prosesi sırasında kimyasal bağ yapısının daha kuvvetli olması amacıyla çapraz bağlı tutuklama proseslerinde sıklıkla kullanımına başvurulmuş olan GLA kullanılmıştır.

Thermomyces lanuginosus (TL 100 L) lipaz enzimin tutukladığı protein miktarının en iyi (14,2 mg protein/ g destek) pH 7,5 değeri 0,1 M Tris-HCl tamponu olarak belirlenmiştir. Tutuklama prosesinin gerçekleşeceği sıcaklık koşulu 24 saat tutuklanma süresi boyunca ise %100 tutuklama verime ve 19,8 U/mg hidroliz aktivitesine ulaştığı 35 °C sıcaklık değeri seçildi.

Enzim derişiminin tutuklama üzerindeki etkisinin önemli bir parametre olduğu göz önüne alındığı için 52,5 mg/ml (300 µl) enzim derişimi ile tutuklanan protein miktarı

29,8 mg protein/g destek olarak hesaplandı. Çapraz bağlayıcı ajan olan %2 (v/v) GLA eklenmesi ile %90'lık tutuklama verimine ulaşılırken protein miktarı ise 14 mg protein/ g destek olarak kaydedildi.

Biyonanokompozit desteğin 0,5 g kullanılması ile desteğe adsoplanan protein miktarı artmıştır. Tutuklama verimini ve protein miktarını arttırmasına paralel olarak enzim aktivitesini arttırması amacıyla eklenen nano boyuttaki f-ÇDKNT'ün %0,2 (w/v) ilavesi ile enzim aktivitesi 44,9 U/mg olarak ölçülmüştür.

Tutuklama ön denemeleri sonucunda belirlenen uygun parametreler (35°C, 7,5 Tris-HCl, 200 rpm, 24 h, 52,5 mg/ml enzim derişimi) altında gerçekleştirilen deneylerde, tutuklanma veriminin maksimum %99,7 ve destek başına tutuklanan protein miktarı ise 33,5 mgprotein/g destek olarak raporlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında, üretilen biyanokompozit desteğin lipaz tutuklama verimi, ve tutuklanan protein miktarı üzerine pH, sıcaklık, zaman, enzim miktarı, çapraz bağlayıcı etkisi, f-ÇDKNT etkisi gibi parametreler incelenmiştir. Yapılan ön denemeler sonucunda, parametrelerin (sıcaklık, pH ve enzim miktarı) yanıtlara olan etkileri YYY ile merkezi bileşik tasarımı kullanılarak değerlendirilmiş ve deney koşullarının optimizasyonu sağlanmıştır.

Modelin önermiş olduğu koşullarda (38.276 °C , pH 7,75 ve 70 mg/ml enzim derişimi) elde edilen teorik tutuklama verimi %98,77, tutuklanan protein miktarı ise 42,38 mg protein/g destek değerinde olmuş, bu koşullarda doğrulama deneyleri yapıldığında ise bu değerler sırasıyla %91,76 verim ve 35,69 mg protein/g destek protein olarak bulunmuştur.

Deneysel verilerin, YYY ile verdiği yanıtlar doğrultusunda, tutuklama verimi üzerinde en etkili olan parametrelerin pH ve enzim miktarı, desteğe tutuklanan protein miktarı üzerinde ise en etkili olan parametrenin yalnız enzim miktarı olduğu gözlenmiştir. Orta değer olarak belirlenen değerlere yakın olan sıcaklık değerlerinin tutuklama verimi ve tutuklanan protein miktarında etkisinin pek fazla etkisi görülmemiştir.

Yapılan varyans analizi (ANOVA) sonucunda, sistem tarafından önerilen kuadratik modelin F oranlarının yüksek olması ve p değerinin düşük seviyede olması oluşturulan kuadratik denklemin anlamlı olduğunu ve R² değerlerinin %90'nın üzerinde olması modelin güvenilir olduğunu açıklamaktadır. YYY'de, merkezi kompozit tasarımı kullanılarak daha az deneysel veri ile sonuca ulaşılmasının mümkün olduğu bu çalışma ile kanıtlanmıştır.

Biyonanokompozit desteğin karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi için kullanılan FTIR spektroskopisinde KTS ve f-ÇDKNT'e ait olan karakteristik piklerin spektrumları görülmüştür. TGA yapılan desteğin sadece KTS kullanılan desteğe göre f-ÇDKNT ilavesi ile termal kararlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Yüzey özelliklerinin mikro boyutlarda incelenmesi amacıyla SEM görüntüleri alınan destek malzeme ve tutuklanmış enzim içeren desteğin SEM mikrografları incelendiğinde enzim tutuklama işleminin başarılı olduğu görülmüştür.

TL 100 L lipaz enzimin pH, sıcaklık, depolama ve tekrarlı kullanım kararlılıklarının tutuklanma işlemi ile daha kararlı hale gelerek arttırdığı belirlenmiştir. Endüstriyel kullanımları açısından tutuklanmış olan enzimin özellikle tekrarlı ve paralel olarak dokuz kez kullanımında bile başlangıç aktivitesinin %70'ini koruduğu göz önüne alındığında proses maliyetlerine olumlu etki yapabileceği öne sürülmektedir.

Thermomyces lanuginosus TL 100 L lipazının biyobozunur çevre dostu olan KTS bazlı biyanokompozit desteğe tutuklanması amacıyla gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve teorik analizler sonucunda çevresel yarar sağladığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Moustafa, H., Youssef, A. M., Darwish, N. A. ve Abou-Kandil, A. I., Eco-friendly polymer composites for green packaging: Future vision and challenges, *Compos. Part B Eng.*,2019,**172**(11),16-25. DOI: 10.1016/j.compositesb.2019.05.048.
- [2] Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., ve Davidson, S., Microbial lipases: production and applications., *Sci. Prog.*,1996, **79**(2),119–157.
- [3] Du, Y., vd., Enzymatic Synthesis of Glycerol Carbonate Using a Lipase Immobilized on Magnetic Organosilica Nanoflowers as a Catalyst, *ACS Omega*, 2018, **3**(6), 6642-6650, DOI: 10.1021/acsomega.8b00746.
- [4] Fernandez-Lafuente,R., Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **62**(3-4),197-212, 2010,DOI:10.1016/j.molcatb.2009.11.010.
- [5] Manoel, E. A. , Dos Santos, J.C.S., Freire, D.M.G., Rueda, N. ve Fernandez-Lafuente, R., Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme, *Enzyme Microb. Technol.*, 2015,**71**(53), DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.02.001.
- [6] Abreu Silveira, E. vd., Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the Ethanolysis of oil in fully anhydrous medium, *BMC Biotechnol.*, 2017, **17**(88), DOI: 10.1186/s12896-017-0407-9.
- [7] Hayta, E., Polikaprolakton- polietilen glikol- kitosan bazlı mikrokürecik üretimi ve kontrollü ilaç salınımında kullanılması için ön çalışma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014, 349714.
- [8] Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., ve Wahab, R.A., An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2015, **29**(2), 225-227, DOI:10.1080/13102818.2015.1008192.
- [9] Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*, Springer, Chile, 2008.
- [10] Wong, K.M.K., ve Chi-Huey, Enzymes for chemical synthesis, *Nature*, 2001, **409**(6817), 232–240.

- [11] Aghababaie, M., Beheshti, M., Razmjou, A. ve Bordbar, A.K., Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on a novel functionalized Fe₃O₄@SiO₂ dip-coated nanocomposite membrane, *Food Bioprod. Process.*, 2016, **100**(part A), 351-360, DOI: 10.1016/j.fbp.2016.07.016.
- [12] Bayramoğlu, G., Akbulut, A., Özalp, V.C. ve Arıca, M.Y., Immobilized lipase on micro-porous biosilica for enzymatic transesterification of algal oil, *Chem. Eng. Res. Des.*, 2015, **95**(3),12-21, DOI: 10.1016/j.cherd.2014.12.011.
- [13] Preczeski, K.P. vd., Efficient and low-cost alternative of lipase concentration aiming at the application in the treatment of waste cooking oils, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2018, **41**(6),851-857, DOI: 10.1007/s00449-018-1919-y.
- [14] Noinville, S., vd., Conformational changes and orientation of *Humicola lanuginosa* lipase on a solid hydrophobic surface: An in situ interface Fourier transform infrared-attenuated total reflection study, *Biophys. J.*, 2002, **82**(5), 2709–2719.
- [15] Mulinari, J., Oliveira, J.V., Hotza, D., Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials, *Biotechnol. Adv.*, 2020, **42**(3),107-581.
- [16] Sharma,R., Chisti,Y., Banerjee, U.C., Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnol. Adv.*, 2001, **19**(8),627–662.
- [17] Wiermann, F., Alves, G., Plant lipases from latex: properties and industrial applications, *Quim. Nova*, 2006, **29**(1), 93–99.
- [18] Schmid, R.D., Verger, R., Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, *Analysis*, 1998, **37**(12), 1608–1633.
- [19] Cooney D.G., Emerson, R., Thermophilic Fungi: An Account of their Biology, Activities and Classification, *Thermophilic Fungi*, Freeman, San Francisco, 1964.
- [20] Deacon, J., *Environmental conditions for growth, and tolerance of extremes.*, 3rd ed., Blackwell Science, Oxford, 1997.
- [21] Novozymes Biopharma DK A/S, *Lipases for biocatalysis*, Denmark, 2016.
- [22] Bilal, M., Rasheed, T., Zhao, Y., Iqbal, H.M.N., Cui, J., Smart chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, **119**, 278–290.
- [23] Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I., Studies on continuous enzyme reactions, *Enzymologia*,1966, **31**(4),214–224.
- [24] Facin, B.R., Melchiors, M.S., Valério, A., Oliveira, J.V., De Oliveira, D., Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2019, **58**(14), 5358–5378.

- [25] Gupta, S., Bhattacharya, A., Murthy, C.N., Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2013, **2**(3), 171–190, DOI: 10.1016/j.bcab.2013.04.006.
- [26] Barbosa, O., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts, *Biotechnol. Adv.*, 2015, **33**(5), 435–456, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.006.
- [27] Bezerra, R.M., *vd.*, A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*, *Enzyme Microb. Technol.*, c. 2020, **138** (4), 109–560.
- [28] Bilal, M., *vd.*, Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review, *Sci. Total Environ.*, 2017, **576**, 646–659.
- [29] Filho, D.G., Silva, A.G., Guidini, C.Z., Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, **103**(18), 7399–7423.
- [30] Shuai, W., Das, R.K., Naghdi, M., Brar, S.K., Verma, M., A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2017, **64**(4), 496–508.
- [31] Liu, D.M., Chen, J., Shi, Y.P., Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2018, **102**, 332–342.
- [32] Caruso, F., Yang, W., Trau, D., Renneberg, R., Microencapsulation of uncharged low molecular weight organic materials by polyelectrolyte multilayer self-assembly, 2000, **16**, 1485–1488.
- [33] Reis, P., Witula, T., Holmberg, K., Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2008, **110**(2–3), 355–362.
- [34] Cirillo, G., Nicoletta, F.P., Curcio, M., Spizzirri, U.G., Picci, N., Iemma, F., Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand, *React. Funct. Polym.*, 2014, **83**, 62–69.
- [35] D'Souza, S.F., Immobilized enzymes in bioprocess, *Curr. Sci.*, 1999, **77**(1), 69–79.
- [36] Telefoncu, A., *Temel ve uygulamalı enzimoloji*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1999.
- [37] Yılmaz, M., Aspergillus oryzae lipazının ipliksi destek materyaline tutuklanması, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017, 482603.

- [38] Aydın, G. Alg yağından lipaz katalizli biyodizel üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014,354566
- [39] Liese, A., Hilterhaus, L., Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications, *Chem. Soc. Rev.*,2013, **42**(15), 6236–6249.
- [40] Gül, Ü.D., Fungal Lipases and Use in Industrial Areas, *Afyon Kocatepe Univ. J. Sci. Eng.*, **13**(1), 2013, 1–8.
- [41] Microbial Lipase Market by Application- Global Forecast to 2023, *Lipase Market*,2015,<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/microbial-lipase-market-248464055.html>. (Ziyaret tarihi: 15.03.2021).
- [42] Enzymes market size, share & trends analysis report by application (industrial enzymes, specialty enzymes), by product (carbohydrase, proteases, lipases), by source,by region, and segment forecasts, 2020 - 2027, *Grand View Research*, 2020, <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>,(Ziyaret tarihi: 15.03.2021).
- [43] Li, S., Hu, J., Liu, B., Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization, *BioSystems*, 2004, **77**(1–3), 25–32.
- [44] Karaca, N., Poli(n,n-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) ve poli(n-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/k-karragenan polimerleri kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
- [45] Guisan, J.M., Immobilization of enzymes and cells in series editor, *Immobil. Enzym. Cells*, 2013, DOI: 10.1007/978-1-62703-550-7.
- [46] Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T., Pinelo, M., A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility, *Catalysts*, 2018,DOI: 10.3390/catal8020092.
- [47] Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., Understanding enzyme immobilisation, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**(2), 453–468.
- [48] Dyartanti, E.R., Margono, S., Pranolo, H., Setiani, B. ve Nurhayati, A., Bioethanol from sorghum grain (*Sorghum bicolor*) with SSF reaction using biocatalyst co-immobilization method of glucoamylase and yeast, *Energy Procedia*, 2015, DOI: 10.1016/j.egypro.2015.03.241.
- [49] Krajewska, B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review, *Enzyme Microb. Technol.*,2004, **35**(2–3), 126–139.
- [50] Yeşiloğlu, Y., Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Process Biochem.*, 2005, **40**(6), 2155–2159.
- [51] Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimani, S.,Sedaghat, M.E., Enzyme immobilization. Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Appl. Clay Sci.*,2009, **43**(3–4), 289.

- [52] Jesionowski, T., Krysztalkiewicz, A., Preparation of the hydrophilic/hydrophobic silica particles”, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2002, **207**(1–3), 49–58.
- [53] Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsa, R.R., Rousset, A., Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes, *Carbon N. Y.*, 2001, **39**(4), 507–514.
- [54] Hou, T.Y., Wu, X.H., A multiscale finite element method for elliptic problems in composite materials and porous media, *J. Comput. Phys.*, 1997, **134**(1), 169–189.
- [55] Ansari, S.A., Husain, Q., Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review, *Biotechnol. Adv.*, 2012, **30**(3), 512–523.
- [56] Yim, T.J., Kim, D.Y., Karajanagi, S.S., Lu, T.M., Kane, R., Dordick, J.S., Silicon nanocolumns as novel nanostructured supports for enzyme immobilization, *Nanosci Nanotechnology*, 2003, **3**, 479–482.
- [57] Kim, J., Grate, J.W., Wang, P., Nanobiocatalysis and its potential applications, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**(11), 639–646.
- [58] Feng, W., Ji, P., Enzymes immobilized on carbon nanotubes, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29** (6), 889–895.
- [59] Şen, F., Palancıoğlu, H., Aldaş, K., Polimerik nanokompozitler ve kullanım alanları, *Makine Teknol. Elektron. Derg.*, 2010, **7**(17), 111–118.
- [60] Gebelein, C.G., Dunn R.L., *Progress in biomedical polymers*, Plenum press, New York, 1990.
- [61] Landriscina, A., Rosen, J., Friedman, A.J., Biodegradable chitosan nanoparticles in drug delivery for infectieous disease, *Nanomedicine*, 2015, **10**(10), 1609–1619.
- [62] Huang, M., Khor, E., Lim, L.Y., Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation, *Pharm. Res.*, 2004, **21**(2), 344–353.
- [63] Shukla, S.K., Mishra, A.K., Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043.
- [64] Rafiee, F., Rezaee, M., Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198.
- [65] Montazer, M., Afjeh, M.G., Simultaneous x-linking and antimicrobial finishing of cotton fabric, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2007, **103**(1), 178–185.

- [66] Filiz, S., Atık liflerden hazırlanan biyokompozitlerin karakterizasyonu ve ilaç difüzyon davranışının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2018.
- [67] Krishna Rao, K.S.V., Vijaya Kumar Naidu, B., Subha, M.C.S., Sairam, M., Aminabhavi, T.M., Novel chitosan-based pH-sensitive interpenetrating network microgels for the controlled release of cefadroxil, *Carbohydr. Polym.*, 2006, **66**(3), 333–344.
- [68] Iijima, S., Ichihashi, T., Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter, *Nature*, 1993, **363**, 603–605.
- [69] He, H., Pham-Huy, L.A., Dramou, P., Xiao, D., Zuo, P., Pham-Huy, C., Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine, *Biomed Res. Int.*, 2013, DOI: 10.1155/2013/578290.
- [70] Baxendale, M., Amaratunga, G.A.J., Metallic conductivity in bundles of intercalated multiwall carbon nanotubes, *Synth. Met.*, 1999, **103**(1–3), 2496–2497.
- [71] Ünsal, Y. E., Altının karbon nanotüp üzerinde zenginleştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
- [72] Lee, S.H., Doan, T.T.N., Won, K., Ha, S.H., Koo, Y.M., Immobilization of lipase within carbon nanotube-silica composites for non-aqueous reaction systems, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2010, **62**(2), 69–172.
- [73] Wang, X.Y., Jiang, X.P., Li, Y., Zeng, S., Zhang, Y.W., Preparation Fe₃O₄@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.020.
- [74] Aisverya, S., Sudha, P.N., F-Multiwalled carbon nanotube-grafted Chitosan/Polyvinylpyrrolidone blends: Preparation and characterization, *Der Pharm. Lett.*, 2014, **6**(3), 9–14.
- [75] Yücel, Y., Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2012, **1**(1), 39–44.
- [76] Yücel, Y., Demir, C., Dizge, N., Keskinler, B., Methods for lipase immobilization and their use for biodiesel production from vegetable oil, *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.*, 2014, **36**(11), 1203–1211.
- [77] Shahedi, M., Habibi, Z., Yousefi, M., Brask, J., Mohammadi, M., Improvement of biodiesel production from palm oil by co-immobilization of *Thermomyces lanuginosa* lipase and *Candida antarctica* lipase B: Optimization using response surface methodology, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.181.

- [78] Aybastier,Ö., Demir, C., Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology, *J. Mol. Catal. B Enzym.*,2010, **63**(3–4), 170–178.
- [79] Kutluk, T., Bitkisel atık yağlardan tutuklanmış lipaz katalizli biyodizel üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013, 342546.
- [80] Ashjari, M., *vd.*, Application of multi-component reaction for covalent immobilization of two lipases on aldehyde-functionalized magnetic nanoparticles; production of biodiesel from waste cooking oil , *Process Biochem.*, 2020, DOI: 10.1016/j.procbio.2019.11.002.
- [81] Kwon, S.S., Jeon, S.H., Shon, J.K., Kim, D.H., Chang, I.S., Kim, J.M., Preparation and stabilization of chitosan-lipase composite within mesoporous silica material, *Solid State Phenom.*, 2015, DOI: 10.4028/www.scientific.net/ssp.124-126.1717.
- [82] Okura, N.S., Sabi, G.J., Crivellenti, M.C., Gomes, R.A.B., Fernandez-Lafuente, R, Mendes, A.A., Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: mixed ion exchange plus hydrophobic interactions, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021.
- [83] Srivastava, G., Roy, S., Kayastha, A.M., Immobilisation of Fenugreek β -amylase on chitosan/PVP blend and chitosan coated PVC beads: A comparative study, *Food Chem.*, 2015, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.145.
- [84] Montgomery, C.D., *Design and Analysis of Experiments*, 8th Edition, John Wiley & Sons, Inc., Arizona, 2017.
- [85] Tekindal, M.A., Yanıt Yüzey Metodu ve Bir Uygulama, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
- [86] Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Hashemi, M., Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak , *Crop J.*, 2017, **5**(5), 407–415.
- [87] Özgen, M, “Halofilik arkeal kaynaklı lipaz üretim koşullarının optimizasyonu ve aktif lipazın saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012, 425714.
- [88] Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y., Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus*, *J. Biochem.*, 1991, **109**(2), 211–216.
- [89] Stoytcheva, M., Montero, G., Zlatev, R., Leon, J.A., Gochev, V., Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review, *Curr. Anal. Chem.*,2012, **8**(3), 400–407.

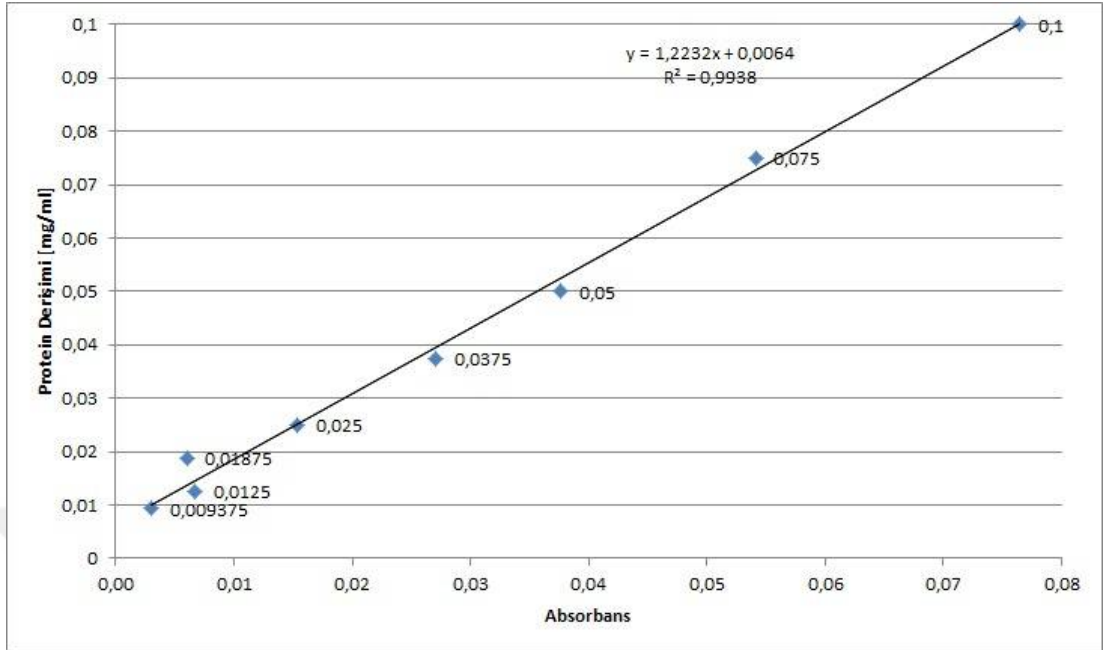
- [90] Dettinger, U., Egelhaaf, H.J., Brabec, C.J., Latteyer, F., Peisert, H., Chassé, T., FTIR study of the impact of PC[60]BM on the photodegradation of the low band gap polymer PCPDTBT under O₂ environment, *Chem. Mater.*, 2015, **27**(7), 2299–2308.
- [91] Nirmal Ghosh, J., Sudhakara, O.S., Jayaramudu, P., *Rubber Nano Blends: Preparation, Characterization and Applications, Springer Series on Polymer and Composite Materials*, Springer, 2017.
- [92] Raghunadh Acharyulu, S., Gomathi, T., Sudha, P.N., Physico-chemical characterization of cross linked chitosan-polyacrylonitrile polymer blends, *Der Pharm. Lett.*, 2013, **5**(2), 354–363.
- [93] Kuo, C.H., Liu, Y.C., Chang, C.M.J., Chen, J.H., Chang, C., Shieh, C.J., “ptimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe 3O₄ nanoparticles, *Carbohydr. Polym.*, 2012, **87**(4), 2538–254.
- [94] Türk, S., Altınoy, I., Çelebi Efe, G., İpek, M., Özacar, M., Bindal, C., 3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*, 2018, DOI: 10.1
- [95] El-Hefian, E.A., Elgannoudi, E.S., Mainal, A., Yahaya, A.H., Characterization of chitosan in acetic acid: rheological and thermal studies, *Turkish J. Chem.*, 2010, **34**(1), 47–56.
- [96] Li, B., *vd.*, Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde, *Mar. Drugs*, 2013, **11**(5), 1534–1552.
- [97] Schroeck, A.M., Schober, S., Mittelbach, M., Highly active biocatalyst for transesterification: cross linked enzyme aggregates of thermomyces lanuginosus and Candida antarctica B, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2013, **115**(10), 1164–1172.
- [98] Kurtovic, I., Nalder, T.D., Cleaver, H., Marshall, S.N., Immobilisation of candida rugosa lipase on a highly hydrophobic support: a stable immobilised lipase suitable for non-aqueous synthesis, *Biotechnol. Reports*, 2020, DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00535.
- [99] Ye, P., Xu, Z.K., Che, A.F., Wu, J., Seta, P., Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization, *Biomaterials*, 2015, **26**(32), 6394–6403.
- [100] Chen, H.C., *vd.*, Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: optimization and enzyme reuse study, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, DOI: 10.1155/2011/950725.
- [101] Gürbüz, A., *Thermomyces lanuginosa* lipazının immobead üzerine immobilizasyonu ve değişik bitkisel yağların hidrolizinde kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015.

- [102] Zaak, H., *vd.*, Coimmobilization of enzymes in bilayers using pei as a glue to reuse the most stable enzyme: preventing pei release during inactivated enzyme desorption, *Process Biochem.*, 2017, DOI: 10.1016/j.procbio.2017.06.014.
- [103] Günel, D., Pankreatik lipaz enziminin kompozit taşıyıcılarda immobilizasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- [104] Öndül, E., Tutuklanmış lipaz geliştirilmesi ve biyodizel üretiminde kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
- [105] Kul, S., İstatistik sonuçlarının yorumu: p değeri ve güven aralığı nedir?, Türk Toraks Derneği, 2014, **8**(1), 11-13, Gaziantep Üniversitesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, DOI:10.5152/pb.2012.003.

EKLER

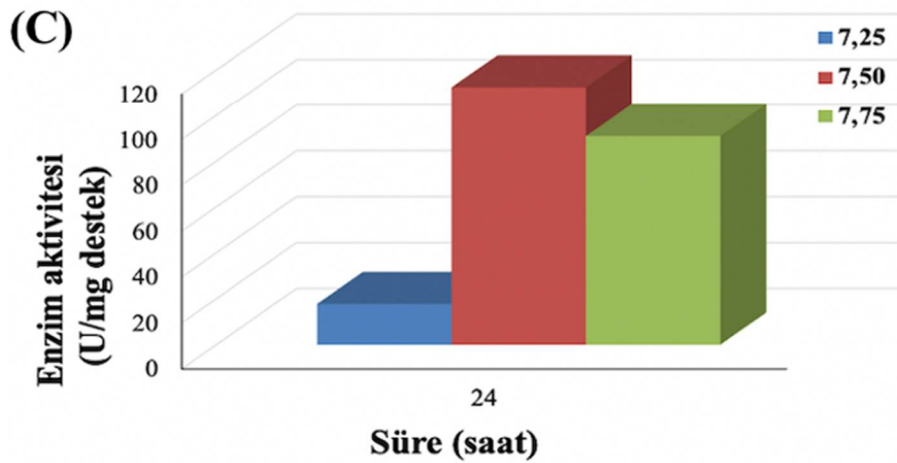
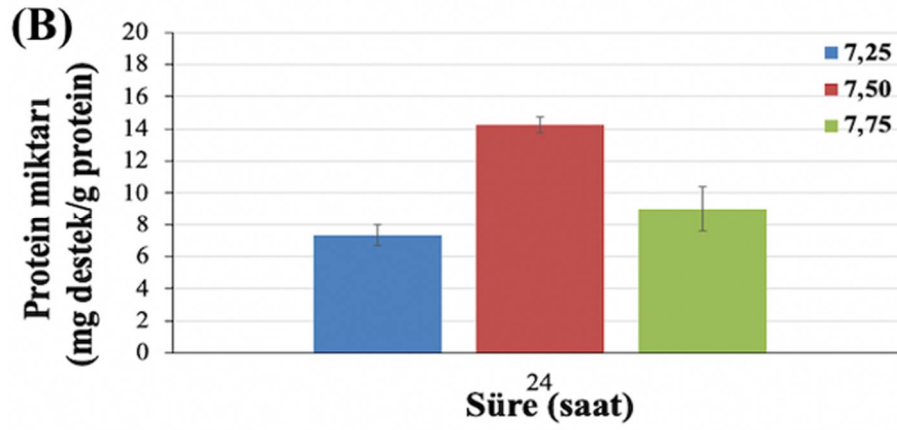
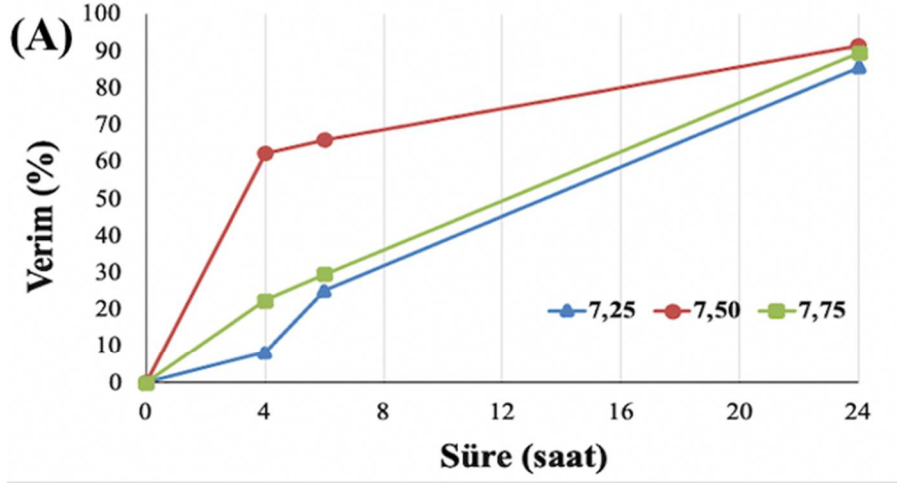


EK-A: Protein tayini için kalibrasyon eğrisi



Şekil EK-A.1. Protein tayini için referans alınan kalibrasyon grafiği

EK-B: YYY için kullanılan pH etkisi grafiği

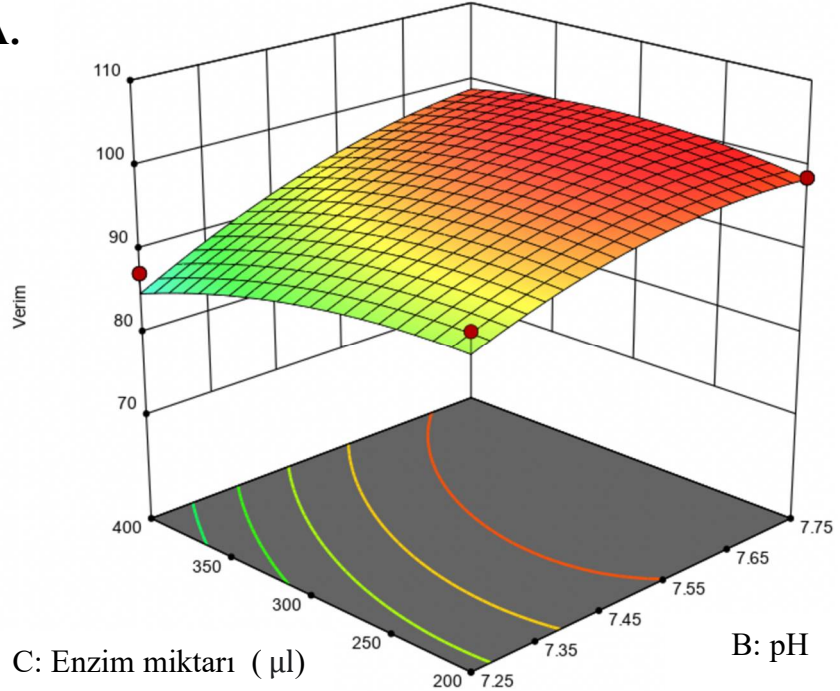


Şekil EK-B.1. YYY için tampon pH değeriinin tutuklamaya etkisi (A) Tutuklama verimi, (B) Tutuklanan protein miktarı, (C) Tutuklanan enzim aktivitesi (Deney koşulları: 100 µl TL 100 L, 6 ml tampon, 0,1 M Tris-HCl, 200 rpm, 24 h, 0,5 g destek)

EK-C: YYY’de kullanılan 3 boyutlu etkileşim verim miktarı grafikleri

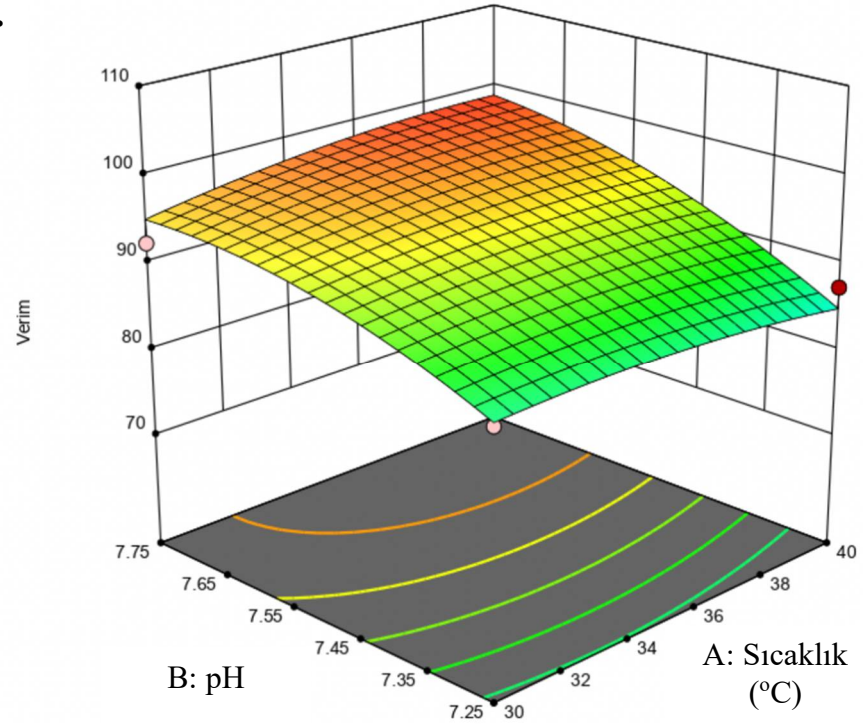
X1 = B
X2 = C
Actual Factor
A = 40

A.



X1 = A
X2 = B
Actual Factor
C = 400

B.

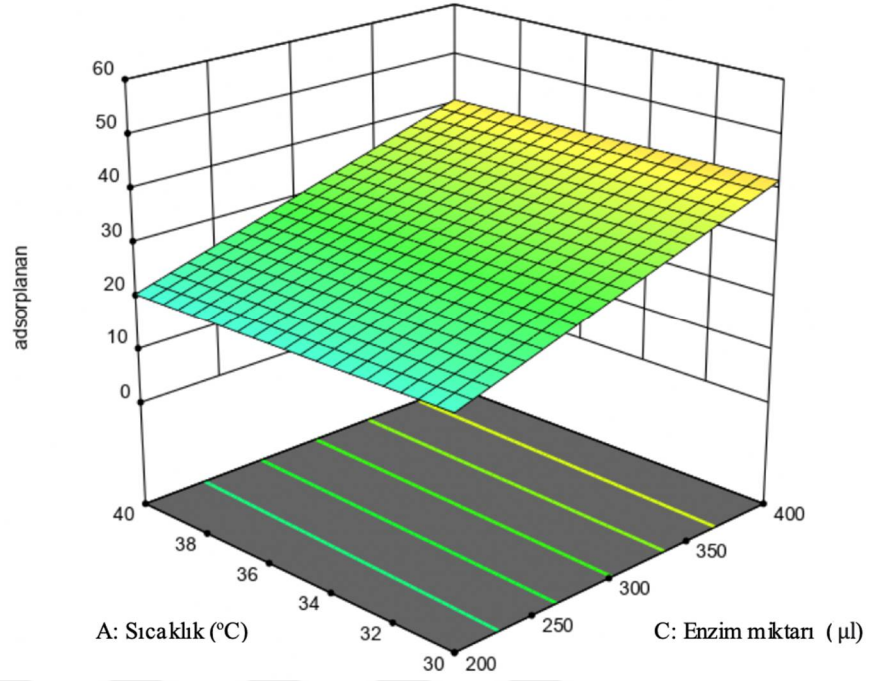


Şekil EK-C.1. Tutuklama verimine ikili etkileşimlerin etkisi, (üç boyutlu grafikleri) (A) enzim- pH etkileşimi (sıcaklık 40°C), (B) pH- sıcaklık etkileşimi (Enzim:400 µl)

EK-D: YYY'de kullanılan 3 boyutlu etkileşim adsorplanan protein miktarı grafiği

X1 = C
X2 = A

Actual Factor
B = 7.51



Şekil EK-D.1. Tutuklanan protein miktarına sıcaklık-enzim ikili etkileşiminin etkisi (üç boyutlu grafik) (pH=7.51)

EK-E: Deneş desen parametrelerinin kodlanmış ve gerçek değerleri

Tablo EK-E.1. Deneş desen parametrelerinin kodlanmış ve gerçek değerleri

RUN	A	B	C	Sıcaklık (°C)	pH	Enzim (µl)
1	0	0	0	35	7,5	300
2	0	0	-2	35	7,5	100
3	-1	1	1	30	7,75	400
4	-1	-1	-1	30	7,25	200
5	1	1	-1	40	7,75	200
6	2	0	0	45	7,5	300
7	-1	-1	1	30	7,25	400
8	0	0	0	35	7,5	300
9	1	-1	1	40	7,25	400
10	0	0	0	35	7,5	300
11	-2	0	0	25	7,5	300
12	0	-2	0	35	7	300
13	1	-1	-1	40	7,25	200
14	0	0	0	35	7,5	300
15	-1	1	-1	30	7,75	200
16	0	2	0	35	8	300
17	0	0	0	35	7,5	300
18	1	1	1	40	7,75	400
19	0	0	2	35	7,5	500

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Öğretmen A., Aydoğdu S., Kapucu N., Immobilization of lipase on bionanocomposite support as a green sustainable material, *International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry*, Ankara/Turkey, December 16-18, 2020.



ÖZGEÇMİŞ

Ayşenur ÖĞRETMEN, Lise öğrenimini Atılım Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2012 yılında girdiği Yalova Üniversitesi Kimya ve Süreç Mühendisliği Bölümü'nde Erasmus sınavını başarılı ile geçerek % 100 burslu olarak Litvanya'da bir güz dönemi boyunca okuyarak lisans öğrenimini 2018 yılında tamamlamıştır. Aynı yıl içinde Kocaeli Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Aynı zamanda kamu sektöründe; çevre koruma kontrol müdürlüğüne bağlı olarak teknik saha mühendisi, özel sektörde; arge, üretim ve ihracat satış süreçleri gibi iş deneyimlerine sahip olmuştur.

