MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROLİZ VE SENTEZ REAKSİYONLARINDA BİYOKATALİZÖR OLARAK MOF TABANLI POLİMERİK FİLMLERE LİPAZ İMMOBİLİZASYONU

MERVE BETÜL ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Serap DEMİR

EŞ-DANIŞMAN
Doç. Dr. Burcu OKTAY

İSTANBUL, 2025

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROLİZ VE SENTEZ REAKSİYONLARINDA BİYOKATALİZÖR OLARAK MOF TABANLI POLİMERİK FİLMLERE LİPAZ İMMOBİLİZASYONU

MERVE BETÜL ARSLAN

(520621002)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Serap DEMİR

EŞ-DANIŞMAN
Doç. Dr. Burcu OKTAY

İSTANBUL, 2025

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca hiçbir yardımını esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Serap Demir'e,

Sorularımı yanıtlayan ve desteklerini sunan sayın eş danışman hocam Doç. Dr. Burcu Oktay'a,

Eğitim hayatıma katkıda bulunan tüm hocalarıma,

FYL-2023-10978 numaralı bu çalışmayı destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu'na

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili anne ve babama, ayrıca beni her zaman güldüren sevgili kardeşime teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2025 Merve Betül ARSLAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**

İÇİNDEKİLER ..... **ii**

ÖZET ..... **v**

ABSTRACT ..... **vi**

SEMBOLLER ..... **vii**

KISALTMALAR ..... **viii**

ŞEKİLLER ..... **ix**

TABLOLAR ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Enzimler 2

1.2. Enzim Kinetiği 4

1.3. Enzimatik Aktivite 6

1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması 7

1.5. Lipazlar 8

1.6. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar 8

1.6.1. Hidroliz Reaksiyonları 8

1.6.2. Sentez Reaksiyonları 9

1.7. Lipazın Yapısı 10

1.7.1. Katalitik Üçlü 11

1.7.2. Oksianyon Deliği 11

1.7.3. “Lid” / “Kapak” 12

1.8. Lipaz Kaynakları 14

1.8.1. Hayvansal Kaynaklar 14

1.8.2. Bitkisel Kaynaklar 14

1.8.3. Mikrobiyal Kaynaklar 14
1.9. Lipazların Spesifikliği 15
1.9.1. Tür Seçiciliği 15
1.9.2. Alan Seçiciliği 15
1.9.3. Enantiyoseçicilik 15
1.10. Lipazların Kullanım Alanları 16
1.11 Enzim İmmobilizasyonu 17
1.12. Literatürde Lipaz Çalışmaları 20
2. MATERYAL VE METOT 21
2.1. Çalışmada Kullanılan Araçlar 21
2.2. Kimyasallar 21
2.3. Deneysel Yöntemler 21
2.3.1. Amin Modifiye Zeolitik İmidazolat Çerçeve Sentezi 21
2.3.2. UV ile Kürlenebilen Polimerik Film Sentezi 22
2.3.3. Enzim İmmobilizasyonu 23
2.3.4. Hidrolitik Aktivite Tayini 23
2.3.5. Hidrolitik Aktivite Kinetik Parametrelerin Hesaplanması 24
2.3.6. Hidrolitik Aktivite Yeniden Kullanılabilirlik 24
2.3.7. Hidrolitik Aktivite Depolama Süresi 24
2.3.8. Sentetik Aktivite Tayini 24
2.3.9. Sentetik Aktivite Kinetik Parametrelerin Hesaplanması 24
2.3.10. Sentetik Aktivite Yeniden Kullanılabilirlik 25
2.3.11. Sentetik Aktivite Depolama Süresi 25
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 26
3.1. Filmler 26
3.2. Lipazın Polimerik Filme İmmobilizasyonu 26
3.3. Hidrolitik Aktivite 27

3.3.1. pH Etkisi 27
3.3.2. Sıcaklık Etkisi 28
3.3.3. Kinetik Parametreler 29
3.3.4. Yeniden Kullanılabilirlik 31
3.3.5. Depolama Süresi 31
3.4. Sentetik Aktivite 32
3.4.1. Sıcaklık Etkisi 32
3.4.2. Kinetik Parametreler 33
3.4.3. Yeniden Kullanılabilirlik 34
3.4.4. Depolama Süresi 35
4. SONUÇLAR 36
KAYNAKLAR 38
ÖZGEÇMİŞ 45

ÖZET

HİDROLİZ VE SENTEZ REAKSİYONLARINDA BİYOKATALİZÖR OLARAK MOF TABANLI POLİMERİK FİLMLERE LİPAZ İMMOBİLİZASYONU

Enzimler reaksiyon hızını arttıran doğal biyokatalizörlerdir. Bununla birlikte enzimler yeniden kullanım zorluğu ve maliyetli üretim süreci gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajların giderilmesi için enzim immobilizasyonu sıklıkla kullanılan tekniklerden biridir. Enzim katı bir destek yüzeyine sabitlenerek yeniden kullanımları sağlanmakta ayrıca enzimlerin çeşitli koşullara dayanımı arttırılabilmektedir. Serin hidrolaz sınıfından olan lipazlar hem hidroliz hem de sentez reaksiyonlarını katalizleyebilen çok yönlü enzimlerdir. Hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilirler. Stabilitesi yüksek olan ve farklı konsantrasyonlarda çalışabilen lipazlar endüstride önemli bir konumdadır. Gıda, ilaç, tekstil, kozmetik, biyodizel üretimi gibi pek çok farklı alanda değerlendirilirler.

Bu çalışmada *Candida rugosa* lipazı, amin modifiye ZIF8 (ZIF8-NH_2) içeren ve içermeyen UV ile kürlenebilen polimerik destek materyaline immobilize edildi. 1 g polimere bağlanan enzim miktarı ZIF8-NH_2 içermeyen film ve %1, %3 ve %5 oranında ZIF8-NH_2 içeren filmlere sırayla 2,34 mg, 3,12 mg, 3,20 mg ve 3,59 mg olarak bulundu. İmmobilize ve serbest enzimlerin su ortamında p-nitrofenil palmitatın hidrolizi ve n-heksan ortamında p-nitrofenil palmitatın sentezi (p-nitrofenol ve palmitik asit) olmak üzere iki farklı reaksiyon ortamında aktivite tayinleri incelendi. Serbest enzime kıyasla, immobilize enzimin yükselen pH ve sıcaklık değerlerinde aktivitesini daha iyi koruduğu gözlemlendi. Hidrolitik ve sentetik aktivite tayin yöntemine göre ZIF8-NH_2 içermeyen film ve %1, %3 ve %5 oranında ZIF8-NH_2 içeren filmlerde 6 tekrar kullanımdan sonra sırayla yaklaşık yüzde %67-70 ve %83-87 oranında aktivitelerini korudukları tayin edildi. Doğal enzimin 30 gün sonunda %60 oranında aktivitesini kaybettiği, aynı depolama süresi altında hidrolitik ve sentetik aktiviteleri için immobilize enzimlerin sırasıyla yaklaşık %72-77 ve %74-80 oranında aktivitesini koruduğu tayin edildi.

Ocak, 2025 **Merve Betül ARSLAN**

ABSTRACT

LIPASE IMMOBILIZATION TO MOF-BASED POLYMERIC FILMS AS A BIOCATALYST IN HYDROLYSIS AND SYNTHESIS REACTIONS

Enzymes are natural biocatalysts that increase reaction rates. However, enzymes have some disadvantages such as difficulty in reuse and the costly production process. Enzyme immobilization is one of the frequently used techniques to overcome these disadvantages. Enzymes are fixed to a solid support surface and their reuse is ensured, and their resistance to various conditions can be increased. Lipases, which belong to the serine hydrolase class, are versatile enzymes that can catalyze both hydrolysis and synthesis reactions. They can be obtained from animal, plant and microbial sources. Lipases with high stability and that can work at different concentrations are in an important position in the industry. They are evaluated in many different areas such as food, medicine, textile, cosmetics, and biodiesel production.

In this study, *Candida rugosa* lipase was immobilized on UV-curable polymeric support material containing and not containing amine modified ZIF8 (ZIF8-NH_2). The amount of enzyme bound to 1 g of polymer was found to be 2.34 mg for the film without ZIF8-NH_2, and 3.12 mg, 3.20 mg, and 3.59 mg for the films containing 1%, 3%, and 5% ZIF8-NH_2, respectively. The activities of immobilized and free enzymes were investigated in two different reaction systems: hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in aqueous medium and synthesis of p-nitrophenyl palmitate (from p-nitrophenol and palmitic acid) in n-hexane medium. It was observed that the immobilized enzyme maintained its activity better at increasing pH and temperature values compared to the free enzyme. According to the hydrolytic and synthetic activity determination method, it was determined that the films without ZIF8-NH_2 and the films containing 1%, 3% and 5% ZIF8-NH_2 retained their activities by approximately 67-70% and 83-87% after 6 reuses, respectively. It was determined that the free enzyme lost 60% of its activity after 30 days, and the immobilized enzymes retained their activities by approximately 72-77% and 74-80%, respectively, for hydrolytic and synthetic activities under the same storage period.

January, 2025 **Merve Betül ARSLAN**

SEMBOLLER

α: Alfa

β: Beta

°C: Santigrat derece

%: Yüzde

cm: Santimetre

µL: Mikrolitre

mg: Miligram

mL: Mililitre

mM: Milimolar

nm: Nanometre

KISALTMALAR

ATR-FTIR: Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüşümü Kızılötesi

E: Enzim

ES: Enzim-Substrat Kompleksi

Km: Michaelis-Menten Sabiti

MOF: Metal Organik Kafes

P: Ürün

S: Substrat

UV: Ultraviyole

Vmax: Maksimum Hız

ZIF8: Zeolitik İmidazolat Çerçeve 8

ZIF8-NH_2: Amin Modifiye Zeolitik İmidazolat Çerçeve 8

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Enzim katalizli reaksiyon diyagramı

Şekil 1.2: Michaelis-Menten Grafiği

Şekil 1.3: Lineweaver-Burk Grafiği

Şekil 1.4: Lipazın Katalizlediği Hidroliz Reaksiyonu

Şekil 1.5: Lipaz katalizli hidrolizin reaksiyon mekanizması

Şekil 1.6: Lipazın Katalizlediği Sentez Reaksiyonları

Şekil 1.7: α/β Hidrolaz Lipaz Katlaması

Şekil 1.8: Lipazın Katalitik Üçlüsü

Şekil 1.9: *Candida rugosa* lipazının açık ve kapalı formu

Şekil 1.10: "Lid/Kapak" yapısının açık ve kapalı konformasyonu

Şekil 1.11: Enzim immobilizasyonun avantaj ve dezavantajları

Şekil 1.12: Enzim immobilizasyonu yöntemleri

Şekil 2.1: ZIF8-NH_2 Sentezi

Şekil 2.2: ZIF8-NH_2 bazlı polimerik film sentezi

Şekil 2.3: Enzim İmmobilizasyonu

Şekil 3.1: ZIF-8 ve ZIF-NH_2 FTIR Spektrumları

Şekil 3.2: pH'ın Hidrolitik Aktivite Üzerindeki Etkisi

Şekil 3.3: Sıcaklığın Hidrolitik Aktivite Üzerindeki Etkisi

Şekil 3.4: Hidrolitik Aktivite Kinetik

Şekil 3.5: Hidrolitik Aktivite Yeniden Kullanılabilirlik

Şekil 3.6: Hidrolitik Aktivite Depolama Süresi

Şekil 3.7: Sıcaklığın Sentetik Aktivite Üzerindeki Etkisi

Şekil 3.8: Sentetik Aktivite Kinetik

Şekil 3.9: Sentetik Aktivite Yeniden Kullanılabilirlik

Şekil 3.10: Sentetik Aktivite Depolama Süresi

TABLOLAR

Tablo 1.1: Enzimlerin Sınıflandırılması

Tablo 3.1: Enzim İmmobilizasyonu

Tablo 3.2: Hidrolitik Aktivite Kinetik Parametreleri

Tablo 3.3: Sentetik Aktivite Kinetik Parametreleri

1. GİRİŞ

Canlı organizmalarda gerçekleşen reaksiyonların neredeyse tamamında etkili olan ve böylece günlük yaşamımızın en etkili makromoleküllerinden olan enzimler doğal biyokatalizörlerdir. Bu biyolojik moleküller, reaksiyon için gerekli aktivasyon enerji miktarını düşürerek reaksiyon hızını arttırmaktadır. Spesifiklikleri ve efektiflikleriyle inorganik katalizörlerin önüne geçen enzimler pek çok endüstride kullanılmaktadır (Blanco & Blanco, 2022; Renneberg, 2023; Robinson, 2015).

Bunun yanında enzimler tekrar kullanım zorlukları ve saflaştırma maliyetinin fazla olması gibi dezavantajlara da sahiptir. Enzimin stabilitesinin iyileştirilmesi, yeniden kullanımının sağlanması ve reaksiyona kolay müdahalenin sağlanabilir olmasına olanak kılan enzim immobilizasyonu tekniği tekstil, gıda, biyodizel üretimi gibi pek çok farklı alanda kullanılmaktadır (Eş vd., 2015; M. vd., 2020).

Enzim klasmanında serin hidrolaz sınıfında yer alan lipazlar, çoğunluğu mikrobiyal lipazlar olmakla birlikte enzim pazarında geniş bir yer kaplamaktadır. Lipazın pazardaki yerinin 2025 yılına kadar 797,7 milyon ABD dolarını aşacağı tahmin edilmektedir (Ali vd., 2023; Chandra vd., 2020). Lipazlar hem hidrolitik hem de sentez reaksiyonlarını katalizleyebilmektedir. Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilmeleriyle kolay ulaşılabilirler. Reaksiyonu gerçekleştirmek için kofaktöre ihtiyaç duymayan lipazlar, yüksek stabilite ve spesifikliğe sahiptir. Bu gibi özellikler lipazları ilaç, gıda, deterjan, biyodizel üretimi gibi pek çok farklı endüstride önemli yere konumlandırmıştır (Casas-Godoy vd., 2018; Remonatto vd., 2022; Rodrigues vd., 2019).

Metal Organik Kafesler (MOF), organik ve inorganik maddeleri bir araya getiren malzemelerdir. Gözenekli yapıda olan bu malzemeler, bu gözeneklerin boyutlarının ayarlanabilir olması ve yüksek stabiliteleriyle ilgi çekmektedir. Geniş yüzey alanı ve çok yönlü kullanımları gibi özellikleri onları gaz depolama, ilaç taşıma, kataliz ve biyogörüntüleme gibi endüstrilerde kullanılabilir kılmıştır. MOF'ların enzim immobilizasyonunda umut verici malzemeler olduğu düşünülmektedir (Li vd., 2024; Souza vd., 2022).

Bu çalışmada, *Candida rugosa*'dan elde edilmiş lipaz enzimi amin modifiye zeolitik imidazolat çerçeveler (ZIF8-NH_2) içeren destek materyaline immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin pH ve sıcaklık değişimlerindeki aktiviteleri, kinetik parametreler, yeniden kullanılabilirlik ve depolama süreleri de incelenmiştir.

1.1. Enzimler

Enzimler, reaksiyona girerek reaksiyon hızını artıran biyokatalizörlerdir ve reaksiyondan ayrılırken herhangi bir değişime uğramazlar. Enzimlerin çoğu protein yapısına sahipken, bazı enzimler RNA yapısına sahip olmaktadır. Enzimlerin aktivitesini gösterebilmesi için bir substrata bağlanması gerekmektedir (Blanco & Blanco, 2022).

Enzim ve substrat arasındaki bağlanmanın gerçekleştiği belirli noktaya "aktif bölge" adı verilmektedir. Bağlanma bölgesi ve katalitik bölge, enzimin aktif bölgesinin bileşenleridir (Blanco & Blanco, 2022; Roy Choudhury, 2020). Aktif bölgedeki amino asitler, reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan enzim-substrat bağlanmasının gerçekleşmesi için belirli bir sıraya göre düzenlenmiştir. Bu sıralı düzenleme, enzimin belirli substratına bağlanması ve reaksiyona girmesi için gereken şekil ve yük gibi fiziksel ve kimyasal koşulları sağlar (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Selvaraj vd., 2022).

Enzim ile substrat arasında gerçekleşen bu bağlanma kovalent olmayan bağlar aracılığıyla gerçekleşir (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Meisenberg & Simmons, 2012; Selvaraj vd., 2022). İyonik etkileşimler, hidrofobik bağlar, Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları gibi kovalent olmayan bağlar, substratın enzime bağlanmasında rol oynar (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Selvaraj vd., 2022). Aynı zamanda enzim ve substrat arasında koordine kovalent bağ oluşumu da gözlemlenebilmektedir (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017).

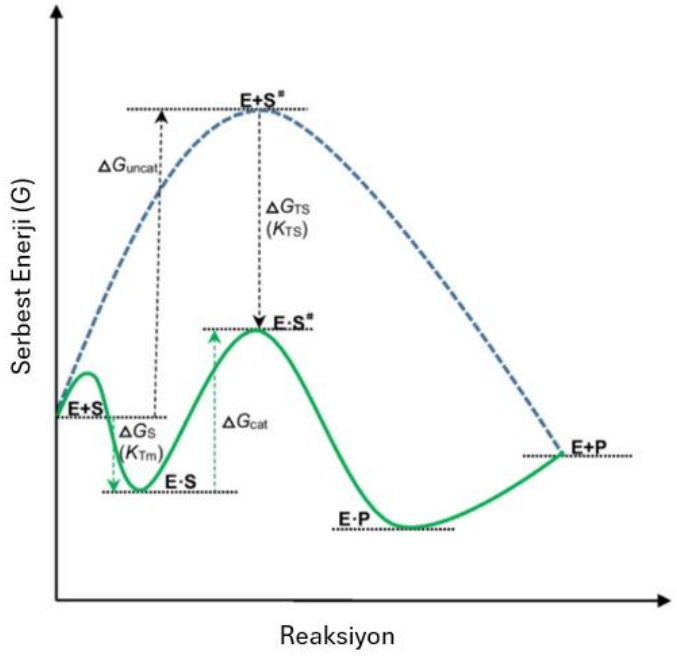
Aşağıda enzim-substrat bağlanmasıyla gerçekleşen, ara ürün olarak enzim-susbtrat kompleksi oluşması ve sonuç olarak ürün ile değişime uğramadan reaksiyondan çıkan enzimin reaksiyonu gösterilmiştir (Blanco & Blanco, 2022; Renneberg, 2023). Enzim ile substratın bağlanmasından sonra substrat ürüne dönüştürülür ve enzimden ayrılır; enzim değişmeden kalır. Bu süreç bir döngüde kendini tekrar eder (Krishnaraj vd., 2017; Robinson, 2015; Roy Choudhury, 2020).

$$\text{Enzim} + \text{Substrat} \leftrightarrow \text{Enzim-Substrat Kompleksi} \leftrightarrow \text{Enzim} + \text{Ürün}$$

Enzim-substrat bağlanmasını tanımlamak için kullanılan "anahtar ve kilit" modeli artık eski bir teoridir. Bu teoriye göre enzim ve substrat herhangi bir değişiklik olmadan örtük olarak birbirine uymaktadır. Ancak, şu anda enzim-substrat bağlanması genellikle "indüklenmiş uyum" teorisiyle açıklanmaktadır. Bu teori, enzimin substratı bağlamak için aktif bölgesinde bir konformasyonel değişim geçirdiğini ve bu ayarlamanın yalnızca belirli substrat tarafından tetiklenebileceğini açıklar (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Selvaraj vd., 2022).

Bazı enzimler katalitik aktivite göstermek için kofaktör adı verilen organik veya inorganik moleküllere ihtiyaç duyarken, bazılarının böyle bir ihtiyacı yoktur. Kofaktör ve enzim arasındaki bağlanma enzimin aktif bölgesinin yakınında gerçekleşir (Robinson, 2015; Roy Choudhury, 2020). Enzimin kofaktöre bağlı olmayan haline apoenzim, kofaktöre bağlanarak oluşan yapıya ise holoenzim denir (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Robinson, 2015).

Daha önce de belirtildiği gibi, enzimler biyokatalizörlerdir ve katalitik aktiviteyi, reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek böylece reaksiyon hızını artırarak gerçekleştirirler (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Robinson, 2015; Roy Choudhury, 2020). Enzimler bunu, reaksiyonun ilerlemesi için daha düşük enerjili alternatif yollar sağlayarak yapar. Gerekli aktivasyon enerjisi, enzim ve substratın bağlanmasıyla serbest bırakılan ve geçiş durumu olarak adlandırılabilen enzim-substrat kompleksinin oluşumuyla azaltılır (Şekil 1.1) (Robinson, 2015; Roy Choudhury, 2020). Burada enzimlerin işlevi bu geçiş durumunu stabilize etmek ve böylece gerekli serbest enerjiyi düşürmektir (D. Chen vd., 2022; Meisenberg & Simmons, 2012).



Şekil 1.1: Enzim katalizli reaksiyon diyagramı (Zhao vd., 2023)

Enzimler, reaksiyonun ilerlemesi için daha düşük serbest enerji gerektiren yollar oluşturarak reaksiyon hızını artıran biyokatalizörlerdir. (**Mavi:** enzimsiz reaksiyon **Yeşil:** enzim tarafından katalize edilen reaksiyon)

1.2. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, enzimin katıldığı reaksiyonların hızını ve mekanizmasını ölçmek için incelenir (Krishnaraj vd., 2017; Robinson, 2015). Sıcaklık, pH ve substrat konsantrasyonu gibi çeşitli çevresel koşullar enzim aktivitesini etkileyen faktörlerdendir (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Robinson, 2015). Michaelis-Menten kinetiği bu faktörler arasında substrat konsantrasyonuyla ilgilenir (Blanco & Blanco, 2022; Choi vd., 2017; Krishnaraj vd., 2017; Robinson, 2015).

Michaelis-Menten kinetiğinde reaksiyon için bazı varsayımlar vardır. Bunlardan biri, reaksiyondaki substrat konsantrasyonunun [S], enzim konsantrasyonundan belirgin şekilde daha fazla olmasıdır (Krishnaraj vd., 2017; Meisenberg & Simmons, 2012; Robinson, 2015). Diğer varsayımlar, başlangıçta ürün oluşumunun olmadığı ve enzim-substrat kompleksinin bir ürüne dönüştüğü zaman hız sınırlayıcı adımın (k_2) meydana geldiğidir. (Meisenberg & Simmons, 2012; Robinson, 2015). Ayrıca, reaksiyondaki toplam enzim konsantrasyonu, substrata bağlı ve bağlı olmayan enzim konsantrasyonlarının toplamına eşittir (Robinson, 2015).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \xrightarrow{k_2} \mathrm{E} + \mathrm{P}$$

Burada, Michaelis-Menten denkleminde, v başlangıç hızını ifade ederken, $Vmax$ reaksiyonun ulaşabileceği maksimum hızı ifade eder. Km, Michaelis-Menten sabiti, reaksiyonun maksimum hızın ($Vmax$) yarısına ulaştığı substrat konsantrasyonudur (Buxbaum, 2015a; Krishnaraj vd., 2017; Meisenberg & Simmons, 2012; Piumetti & Illanes, 2022; Robinson, 2015).

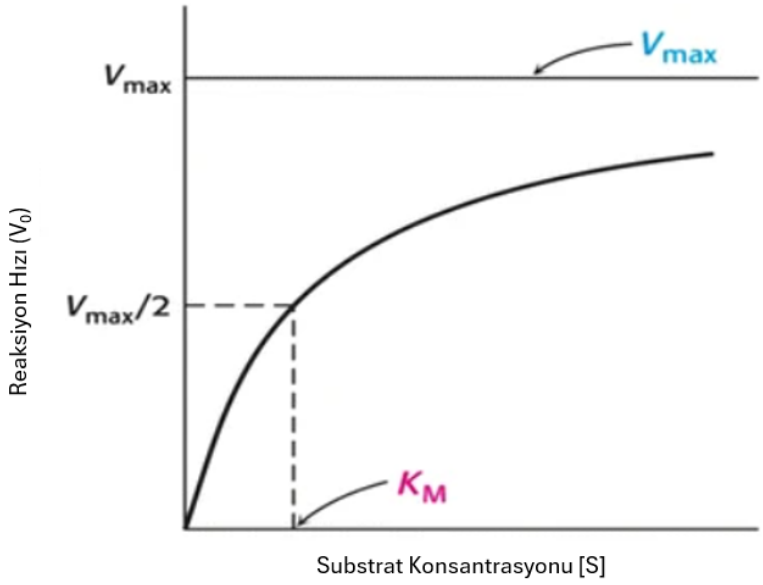
$$v = \frac{Vmax\,.\,[S]}{Km + [S]}$$

Kararlı durum kinetiğinde, reaksiyonda enzim-substrat kompleksinin oluşumu ve bu kompleksin ürüne dönüşme hızı dengede olacağından, aşağıdaki hız denklemleri oluşturulabilir (Buxbaum, 2015a; Krishnaraj vd., 2017; Meisenberg & Simmons, 2012; Robinson, 2015).

$$[\mathrm{ES}] = \frac{k_1[\mathrm{E}][S]}{k_{-1} + k_2}$$

$$k_1[\mathrm{E}][\mathrm{S}] = k_{-1} + k_2[\mathrm{ES}] \qquad K_\mathrm{m} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Daha önce belirtildiği gibi, Km, reaksiyon maksimum hızın 1/2'sine ulaştığındaki substrat konsantrasyonudur. Bu, enzimin substrata olan afinitesi hakkında bilgi verir. Km değeri ne kadar düşükse, enzimin maksimum hıza ulaşması için gereken substrat miktarı o kadar düşüktür. Bu, enzimin belirli substratı için yüksek afiniteye sahip olduğunu gösterir (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Meisenberg & Simmons, 2012; Piumetti & Illanes, 2022; Robinson, 2015). Şekil 1.2, tipik bir Michaelis-Menten grafiğini göstermektedir (Krishnaraj vd., 2017).

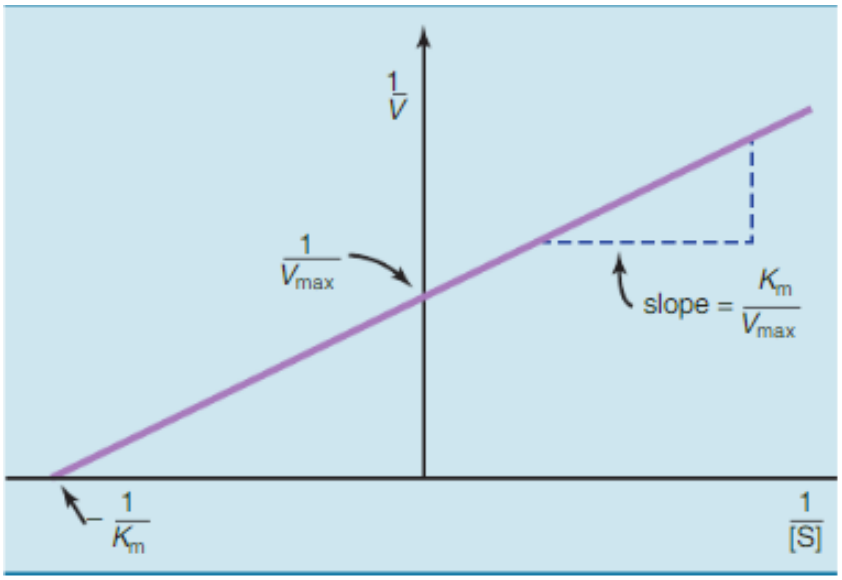


Şekil 1.2: Michaelis-Menten Grafiği (Krishnaraj vd., 2017)

Michaelis-Menten reaksiyon kinetiği grafiği. Substrat konsantrasyonu x ekseninde ve reaksiyon hızı y eksenindedir. Reaksiyonun ulaşabileceği maksimum hız $Vmax$ olarak belirtilir. Reaksiyon hızı maksimum hızın yarısına ulaştığındaki substrat konsantrasyonu Km olarak gösterilir.

Doğrusal bir grafik elde etmek için Lineweaver-Burk denklemi kullanılır. Michaelis-Menten grafiğinin (Şekil 1.3) ters çevrilmesiyle elde edilen formül ve grafik aşağıda gösterilmiştir (Blanco & Blanco, 2022; Buxbaum, 2015a; Krishnaraj vd., 2017; Meisenberg & Simmons, 2012; Robinson, 2015).

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_{\mathrm{m}} + [S]} \qquad \Rightarrow \qquad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_{\mathrm{m}}}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]}$$



Şekil 1.3: Lineweaver-Burk Grafiği (Meisenberg & Simmons, 2012)

Michaelis-Menten denkleminin tersine çevrilmesiyle elde edilen Lineweaver-Burk grafiği. x ekseninde $1/[S]$ ve y ekseninde $1/[V]$ vardır. Eğrinin x eksenini kestiği yer $1/Vmax$ 'tır; y eksenini kestiği nokta $-1/Km$ olarak ifade edilir.

1.3. Enzimatik Aktivite

Enzimin belirli bir zamanda ne kadar substratı ürüne dönüştürdüğünü belirlemek, enzimin aktivitesi hakkında bilgi sağlar. Enzim aktivitesini belirtmek için çeşitli birimler kullanılabilir. Kullanılabilecek birimlerden biri Uluslararası Birimlerdir (IU). Normal koşullar altında 1 mikromolar substratın ürüne dönüştürülmesi için gereken enzim miktarı olarak ifade edilebilir (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Punekar, 2018b). Enzim aktivitesini belirtmek için kullanılan bir diğer birim ise kataldır. Katal, 1 saniyede 1 mol ürün elde etmek için gereken enzim miktarını ifade eder (Krishnaraj vd., 2017; Punekar, 2018b).

Enzim aktivitesi hakkında bir diğer önemli terim ise enzimin saflığını ifade eden "spesifik aktivite"dir. (Blanco & Blanco, 2022; Punekar, 2018b). Spesifik aktivite, 1 mg proteinde bulunan enzim birimi olarak tanımlanabilir (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Punekar, 2018b). Bu, enzimin saflığı arttıkça spesifik aktivitesinin de artacağı anlamına gelir (Punekar, 2018b).

Enzimlerin aktivitesi çeşitli parametrelerden etkilenebilir. Bunlara örnek olarak ortam sıcaklığı, pH ve substrat konsantrasyonu verilebilir (Blanco & Blanco, 2022; Krishnaraj vd., 2017; Meisenberg & Simmons, 2012; Piumetti & Illanes, 2022; Robinson, 2015; Selvaraj vd., 2022).

1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, katalize ettikleri reaksiyonlara göre 7 farklı sınıfa ayrılır. The International Commission of Enzymes (EC) tarafından verilen numaralandırmaya göre, enzimler sırasıyla Oksidoredüktazlar, Transferazlar, Hidrolazlar, Liyazlar, İzomerazlar, Ligazlar ve Translokazlar olarak adlandırılır (Tablo 1.1). Bir enzimin EC numaralandırması, enzimin grubunu ve alt gruplarını belirten 4 numara içerir (Ahluwalia vd., 2022; Blanco & Blanco, 2022; Buxbaum, 2015b; Krishnaraj vd., 2017; McDonald & Tipton, 2023; Punekar, 2018a; Robinson, 2015; Roy Choudhury, 2020).

Tablo 1.1: Enzimlerin Sınıflandırılması (McDonald & Tipton, 2023; Roy Choudhury, 2020)

Sınıf	Enzim Adı	Reaksiyon Türü
EC 1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarını katalize eder
EC 2	Transferazlar	Bir fonksiyonel grubu (örneğin, bir metil veya fosfat grubu) aktarır
EC 3	Hidrolazlar	Çeşitli bağların hidrolizini katalize eder
EC 4	Liyazlar	Hidroliz ve oksidasyon dışındaki yollarla çeşitli bağları koparır
EC 5	İzomerazlar	Tek bir molekül içindeki izomerizasyon değişikliklerini katalize eder
EC 6	Ligazlar	Genellikle bir enerji kaynağı (genellikle ATP) pahasına iki molekülü kovalent bağlarla birleştirir
EC 7	Translokazlar	Molekül ya da iyonların zarlar arası hareketlerini katalize eder

Oksidoredüktazlar: Oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları bu enzimler tarafından katalizlenir.

Transferazlar: Bu grubun üyeleri, donörden akseptöre fonksiyonel grup transferinde rol oynar.

Hidrolazlar: Kimyasal bağların su eklenerek kırıldığı reaksiyonların katalizi, hidroliz.

Liyazlar: C-O, C-S, C-N gibi bağları kırarak çifte bağların veya halka yapıların oluşumunu katalize eden enzimler bu gruptadır.

İzomerazlar: İzomerizasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.

Ligazlar: İki molekülün birbirine bağlanma reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir; bunun için genellikle ATP enerjisi kullanılır.

Translokazlar: İyon ve moleküllerin membranlar arası hareketlerini katalize eden enzimlerdir. Ayrıca iyon ve moleküllerin membranlar içinde parçalanmalarında da görev alırlar (Ahluwalia vd., 2022; Blanco & Blanco, 2022; Buxbaum, 2015b; Krishnaraj vd., 2017; McDonald & Tipton, 2023; Robinson, 2015; Roy Choudhury, 2020)

1.5. Lipazlar

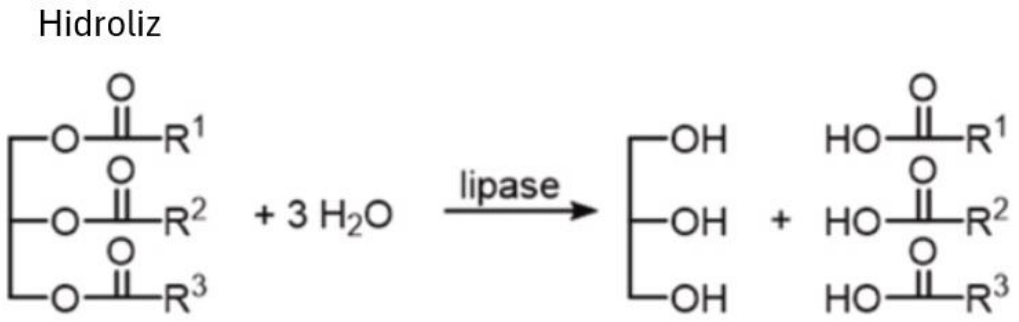
Lipazlar (E.C. 3.1.1.3), özellikleri nedeniyle birçok farklı endüstride kullanılabilen serin hidrolaz sınıfı enzimlerdendir (triaçilgliserol açil hidrolazlar olarak da bilinir). Bu son derece seçici enzim, katalitik aktivite göstermek için bir kofaktöre de ihtiyaç duymaz. Kolay erişilebilirliğinin yanı sıra, yalnızca sulu çözeltilerle değil aynı zamanda organik çözücülerle de çalışabilme yeteneği, lipazları enzim pazarında önemli bir konuma getirmiştir. Yüksek stabilite ve yüksek substrat konsantrasyonlarında çalışabilme yeteneği, lipazların farklı endüstriyel alanlar için önemli özellikleridir (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Chandra vd., 2020; Ismail & Baek, 2020; Remonatto vd., 2022; Rodrigues vd., 2019; Salgado vd., 2022; Sampaio vd., 2022).

1.6. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

Enzim sektöründe önemli bir yere sahip olan lipazlar, birden fazla reaksiyonun katalizinde rol oynar. Lipazlar hem hidroliz hem de sentez reaksiyonlarının katalizine katılırlar (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Chandra vd., 2020; Remonatto vd., 2022; Salgado vd., 2022; Sampaio vd., 2022).

1.6.1. Hidroliz Reaksiyonları

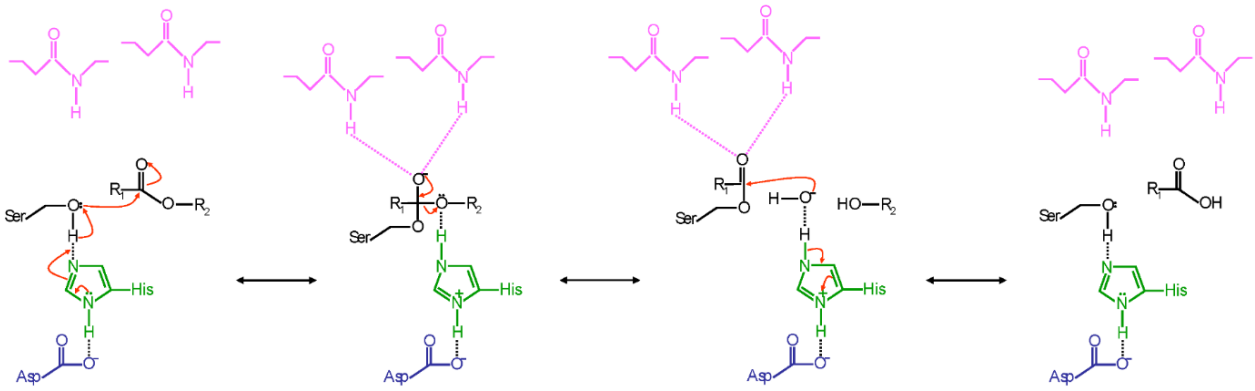
Lipazların katalize ettiği reaksiyonlardan biri hidroliz reaksiyonlarıdır. Lipazların bu özelliğiyle, mono-, di- ve trigliseritlerin ester bağları hidroliz yoluyla parçalanır (Şekil 1.4). Bu reaksiyon sonucunda serbest yağ asitleri ve gliserol (ayrıca diaçilgliserol ve monoaçilgliserol) serbest kalır (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Chandra vd., 2020; Remonatto vd., 2022; Salgado vd., 2022; Sampaio vd., 2022).



Şekil 1.4: Lipazın Katalizlediği Hidroliz Reaksiyonu (Salgado vd., 2022)

Lipazın katalizlediği hidroliz reaksiyonu sonucunda ester bağı kırılır ve serbest yağ asidi ve gliserol oluşur.

Proton transferi lipazın katalitik üçlüsü arasında gerçekleşir ve aktive edilmiş serin karbonil oksijeni nükleofilik substratın karbonil karbonuna saldırır. Karbonil oksijeni negatif yüklü hale gelir ve tetrahedral bir ara ürün oluşur. Oksianyon deliğinin amino asitleri iki hidrojen bağı oluşturur ve ara madde stabilize edilir. Daha sonra bir proton transferi gerçekleşir, ester bağı kırılır ve alkol serbest bırakılır. Daha sonra kovalent bağ su ile kırılır, ürün serbest bırakılır ve enzim eski haline döner (Şekil 1.5)(Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018).



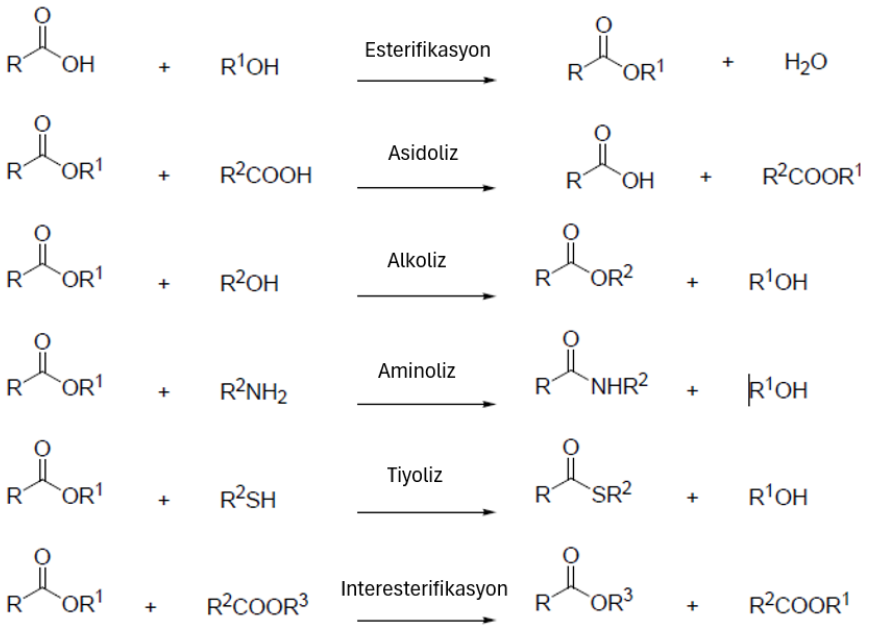
Şekil 1.5: Lipaz katalizli hidrolizin reaksiyon mekanizması (Borrelli & Trono, 2015)

Lipaz ve substrat arasındaki etkileşim, bağlarla stabilize edilen bir tetrahedral ara ürün üretir. Daha sonra proton transferi gerçekleşir ve alkol serbest bırakılır. Son aşamada, kovalent bağ su tarafından hidrolize edilir ve ardından enzim tekrar aktif hale gelir. **Mavi:** Aspartat; **Yeşil:** Histidin; **Siyah:** Serin, substrat, su; **Macenta:** Oksianyon deliği kalıntıları

1.6.2. Sentez Reaksiyonları

Lipazlar sadece hidroliz reaksiyonlarını değil aynı zamanda birçok farklı sentez reaksiyonlarını da katalize eder. Su aktivitesinin düşük olduğu ortamlarda lipazlar çeşitli sentetik reaksiyonlarda da yer alır. Lipaz tarafından katalize edilen bu reaksiyonların sonucunda farklı ürünler elde edilebilir.

Esterleşme, asidoliz, alkoliz, aminoliz, tiyoliz ve interesterifikasyon reaksiyonları lipazların katalizlerine katıldığı reaksiyonlardır (Şekil 1.6). Çeşitli reaksiyonları katalize etme ve farklı ürünler sağlama yetenekleriyle lipazlar enzim pazarında ve farklı endüstrilerde önemli bir yere sahiptir. (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Chandra vd., 2020; Ramos Sanchez, 2015; Remonatto vd., 2022; Rodrigues vd., 2019; Salgado vd., 2022; Sampaio vd., 2022).

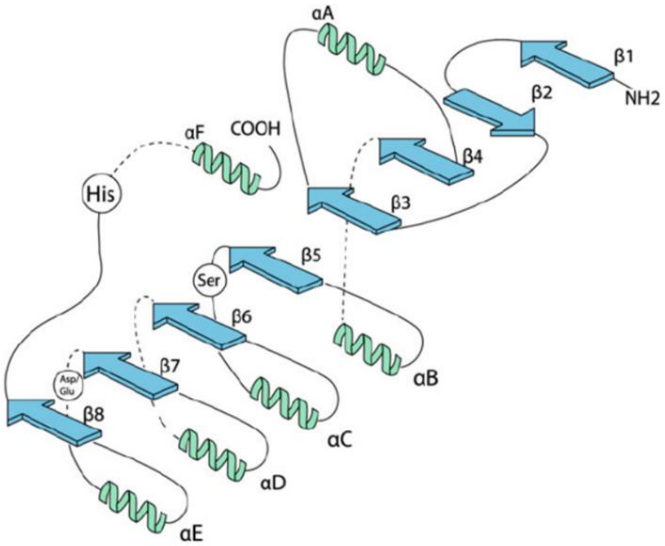


Şekil 1.6: Lipazın Katalizlediği Sentez Reaksiyonları (Ramos Sanchez, 2015)

Lipazlar hidroliz reaksiyonlarının yanı sıra bazı sentetik reaksiyonların katalizinde de görev alırlar.

1.7. Lipazın Yapısı

Lipazlar, diğer birçok hidrolaz enzim sınıfı gibi, alfa-beta kıvrımına sahiptir. Bu α/β hidrolaz kıvrımı genellikle 1 antiparalel ve 7 paralel olmak üzere 8 β iplikçikten oluşan β kıvrımlı bir tabaka içerir. Gösterildiği gibi, β2 iplikçik antiparalel bir yönelimdedir (Şekil 1.7). α-heliks yapıları β3 ve β8 iplikçikleri arasında yer alır (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Lotti & Alberghina, 2007).



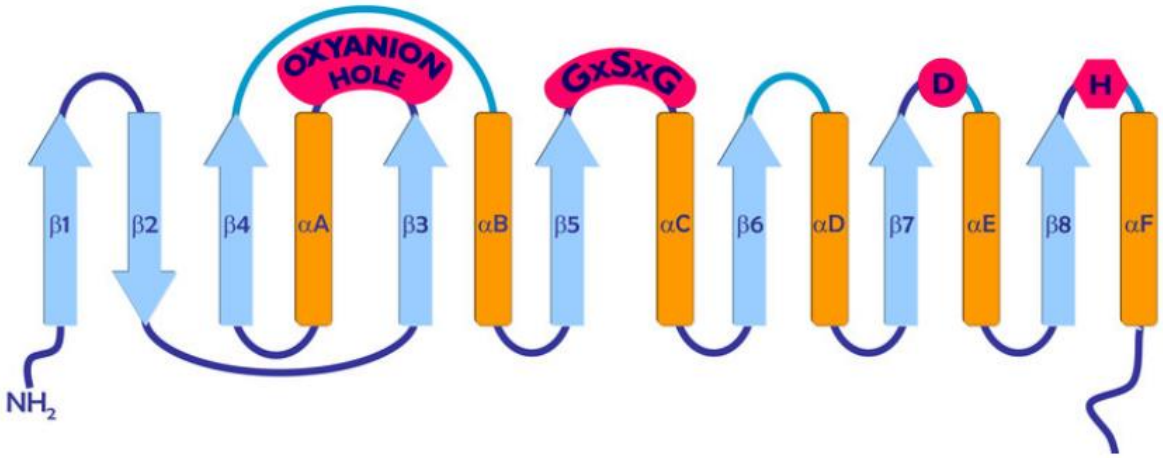
Şekil 1.7: α/β Hidrolaz Lipaz Katlaması (Casas-Godoy vd., 2018)

Lipazlar genellikle 8 β iplikçik ve 6 α-heliksten oluşan bir α/β kıvrımına sahiptir.

1.7.1. Katalitik Üçlü

Lipazların aktif bölgesi, katalitik üçlü adı verilen üç amino asit kalıntısından oluşan özel bir bölge içerir. Katalitik üçlüyü oluşturan bu amino asit kalıntılarından biri nükleofilik bir kalıntıdır, yani sistein, serin veya aspartat olabilir, ancak lipazlarda yalnızca serin olarak düzenlenir. Diğer kalıntılar, doğal olarak bir asit katalitik kalıntısı olan aspartat veya glutamattır. Bu katalitik üçlünün son kalıntısı bir histidindir (Şekil 1.8) (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Lotti & Alberghina, 2007; Remonatto vd., 2022; Sampaio vd., 2022).

Katalitik üçlüden gelen serin, β5 ile onu takip eden alfa heliks arasında yer alır. Bu bölge, nükleofilik dirsek adı verilen beş üyeli bir motif içerir. Bu motif, GX1SX2G, serine ek olarak iki glisin ve iki amino asit kalıntısı daha içerir. Asidik kalıntı ve histidin kalıntısı genellikle sırasıyla β6/β7 ve β8'den sonra gelir ve bir hidrojen bağıyla bağlanır (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018).



Şekil 1.8: Lipazın Katalitik Üçlüsü (Borrelli & Trono, 2015)

Lipazların katalitik üçlüsü olarak adlandırılan üç amino asit kalıntısının nükleofilik kalıntısı GX1SX2G motifinde bulunan serin iken, diğer iki amino asit kalıntısından biri histidindir. Diğer üçüncü amino asit kalıntısı asidik katalitik kalıntılar olan aspartat veya glutamattır.

1.7.2. Oksianyon Deliği

Ek olarak, lipazlar oksianyon deliği adı verilen bir "cep" içerir. Bu oksianyon deliği iki amino asitten oluşur ve hidrojen bağları aracılığıyla kataliz sırasında oluşan ara ürünün stabilizasyonunda rol oynar (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Lotti & Alberghina, 2007; Ma'ruf vd., 2021).

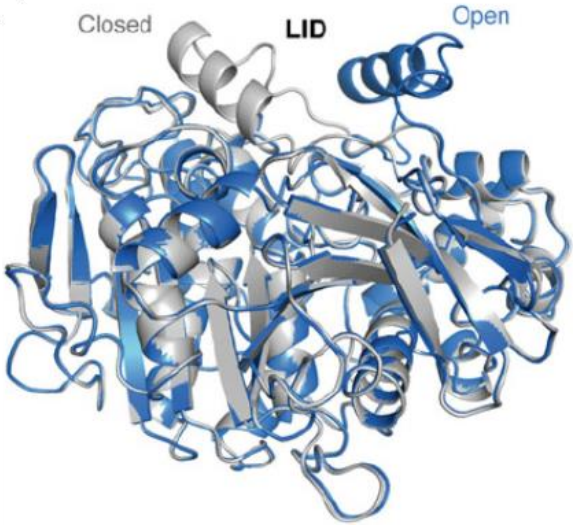
Oksianyon deliğinin kalıntılarından biri β3 ile onu takip eden α-heliks arasında yer alır (Albayati vd., 2020; Casas-Godoy vd., 2018; Ma'ruf vd., 2021). Daha önce bahsedilen

nükleofilik dirseğin GX1SX2G motifindeki nükleofilik serinin yanında bulunan X2, bu oksianyon deliğinin bir diğer amino asit kalıntısıdır (Albayati vd., 2020; Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018).

Lipazları oksianyon deliği tiplerine göre sınıflandırmak mümkündür. Bu bağlamda lipazlar 3 farklı gruba ayrılabilir: GX, GGGX ve Y sınıfı. GX tipi oksianyon deliği olan lipazlar genellikle orta veya uzun karbon zincirli substratları hidrolize eder. Bu tipte G, korunan bir glisindir, X hidrofilik veya hidrofobik bir amino asit kalıntısı olabilir ve oksianyon deliğinin ilk kısmı X kalıntısının NH omurgasıdır. GGGX tipinde oksianyon deliği kalıntısı glisindir ve bunu hidrofobik bir X kalıntısı izler. Burada üçüncü sıra glisinin NH omurgası oksianyon deliğinin ilk kısmını oluşturur. Bu tipteki lipazlar daha kısa zincirli substratları hidrolize eder. Son olarak daha sonra keşfedilen Y tipi lipazlarda tirozin yan zincirinin hidroksil grubu oksianyon deliğini oluşturur (Albayati vd., 2020; Bauer vd., 2020; Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Hlima vd., 2021; Kumar vd., 2023).

1.7.3. “Lid” / “Kapak”

Genel olarak lipazlar, aktif bölgelerini açıp kapatma yeteneğine sahip alfa heliks polipeptit zinciri adı verilen hareketli bir yapı içerir. Bu amfipatik yapıya “lid/kapak” (ayrıca flap olarak da bilinir) denir. Esnek ve hareketli alan “lid”, enzimin aktif bölgesinin açık-kapalı durumunu çevresel koşullara göre düzenler. Şekil 1.9, *Candida rugosa*'dan izole edilen lipazın “lid” yapısının, açık ve kapalı konformasyonunu göstermektedir.

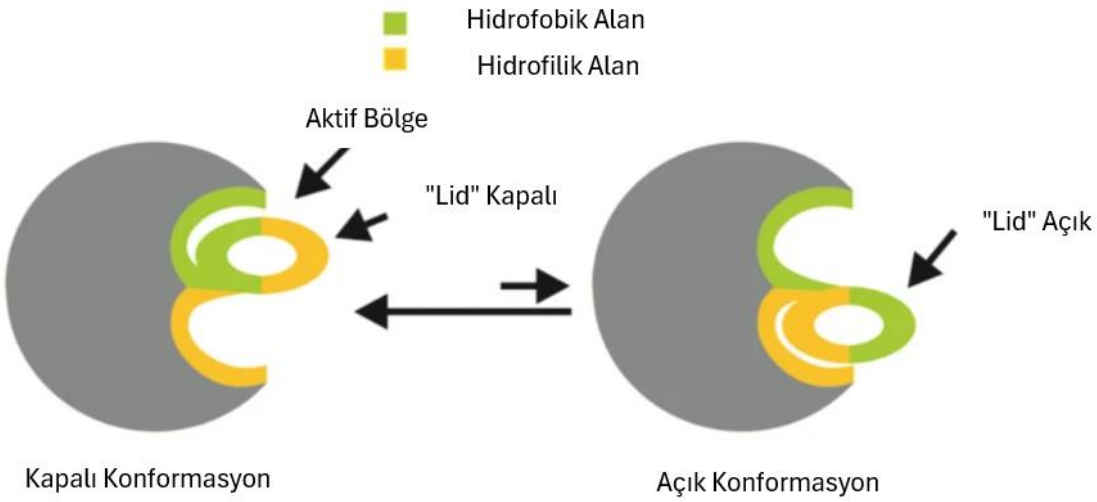


Şekil 1.9: *Candida rugosa* lipazının açık ve kapalı formu *(Casas-Godoy vd., 2018)*

Candida rugosa lipaz “lid” yapısının açık formu mavi, kapalı formu ise gri renkle gösterilmiştir.

Bir lipit-su arayüzünün yokluğunda, “lid/kapak” enzimin aktif bölgesini substrat tarafından erişilemez şekilde “kapalı” durumda tutar. Bu pozisyonda, “kapağın” hidrofobik kısmı aktif bölgeye bakarken, hidrofilik kısmı çözücüye doğru yönelir (Şekil 1.10). Ancak, bir lipit-su arayüzünün varlığında, hareketli “lid/kapak” enzimin aktif bölgesini “açık” hale getirir. Açık konformasyonda, hidrofobik bölge açığa çıkar ve lipazın aktif bölgesi substratla etkileşime girmek için aktif konumdadır (Albayati vd., 2020; Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Godoy vd., 2022; Hlima vd., 2021; Kourist vd., 2017; Lotti & Alberghina, 2007; Martínez Pérez vd., 2019; Ma’ruf vd., 2021; Remonatto vd., 2022; Rodrigues vd., 2019; Sampaio vd., 2022).

Sulu ortamlarda lipazlar genellikle kapalı bir konumdadır ve katalitik aktivitesi düşüktür. Ancak lipit-su ortamında bu yapı konformasyonel bir değişime uğrar ve enzimin aktif bölgesini substrata açık hale getirir. Bu durumda enzimin aktivitesi artar. Bu mekanizmaya “arayüz aktivasyonu” denir (Albayati vd., 2020; Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Kourist vd., 2017; Lotti & Alberghina, 2007; Martínez Pérez vd., 2019; Rodrigues vd., 2019).



Şekil 1.10: “Lid/Kapak” yapısının açık ve kapalı konformasyonu(Martínez Pérez vd., 2019)

Kapalı konformasyonda, kapağın hidrofobik yüzeyi aktif bölgeye, hidrofilik yüzeyi ise çözücüye bakmaktadır.

Lipazların “lid/kapak” alanı, üretim kaynağına ve koşullara bağlı olarak değişebilir. Bazı lipazların “lid/kapakları” tek veya iki heliks içerebilirken, bazı lipazlar bu yapıya ve arayüz aktivasyonuna ihtiyaç duymayabilir (Albayati vd., 2020; Borrelli & Trono, 2015; Godoy vd., 2022; Hlima vd., 2021; Kourist vd., 2017; Lotti & Alberghina, 2007; Remonatto vd., 2022; Rodrigues vd., 2019; Sampaio vd., 2022).

1.8. Lipaz Kaynakları

Lipazlar pek çok farklı kaynaktan elde edilebilmektedir. Bu kaynakların içinde hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar bulunur. Bakteriler, mantarlar ve mayalar olmak üzere mikrobiyal kaynaklar lipazların eldesinde çok önemli bir konumdadır. Mikrobiyal kaynaklar daha hızlı ve verimli büyümeleri, daha kararlı enzim üretebilmeleri ve düşük maliyetli ortamlarda olan iyi büyüme özellikleri nedeniyle en fazla kullanılan kaynaklardır (Angelotti vd., 2022; Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Chandra vd., 2020; Eskandari vd., 2024; Lotti & Alberghina, 2007; Martínez Pérez vd., 2019; Remonatto vd., 2022; Salgado vd., 2022; Sampaio vd., 2022).

1.8.1. Hayvansal Kaynaklar

Üretimlerindeki zorluklar nedeniyle sık kullanılan kaynaklar olmasa da hayvansal kaynaklardan lipaz üretmek mümkündür. Pankreatik, lipoprotein, pregastrik lipazlar hayvansal kaynaklardan elde edilen lipazlardandır. Domuz, koyun, kuzu gibi hayvanlar lipaz eldesi için kullanılabilir ancak hayvansal kaynaklar saflaştırmanın zor olması gibi önemli nedenlerle ticari olarak sık tercih edilmezler (Angelotti vd., 2022; Borrelli & Trono, 2015; Fahim vd., 2024; Lotti & Alberghina, 2007; Sarmah vd., 2018).

1.8.2. Bitkisel Kaynaklar

Bir diğer lipaz kaynağı ise bitkilerdir. Tohumlar, tahıllar, meyveler gibi çeşitli kaynaklardan lipaz eldesi mümkündür ancak bunlar arasında en fazla tohumlar tercih edilir. Üretimi düşük maliyetli olan bitkisel kaynaklardan elde edilen lipazlar ilaç ve gıda endüstrilerinde kullanılmaktadır.

1.8.3. Mikrobiyal Kaynaklar

Lipazlar ayrıca bakteri, maya ve mantarlardan elde edilebilmektedir. Mikrobiyal lipazların pek çok avantajı vardır. Yüksek verimle stabil enzimler elde etmek için mikrobiyal kaynaklar iyi bir seçimdir. Hızlı ve ucuz üretimleri de bu avantajların arasındadır. *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* gibi mantar türleri; *Candida* ve *Yarrowia* gibi maya ve *Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces* gibi bakteriyal kaynaklardan elde edilebilirler (Albayati vd., 2020; Angelotti vd., 2022; Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Chandra vd., 2020; Fahim vd., 2024; Godoy vd., 2022; Hlima vd., 2021; Kumar vd., 2023; Lotti & Alberghina, 2007; Martínez Pérez vd., 2019; Ramos Sanchez, 2015; Salgado vd., 2022; Sarmah vd., 2018). Bu çalışmada *Candida rugosa*'dan izole edilmiş olan lipaz kullanılmıştır.

1.9. Lipazların Spesifikliği

Lipazlar elde edildikleri kaynaklara göre sınıflandırılabildikleri gibi seçiciliklerine göre de sınıflandırılabilirler. Bu sınıflandırma farklı şekillerde yapılabilir.

1.9.1. Tür Seçiciliği

Substrat türleri arasında seçicilik gösterebilen lipazlar, reaksiyona girmek için mono-, di- ve trigliseritler arasında tercihte bulunabilirler (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Godoy vd., 2022; Park & Park, 2022; Szymczak vd., 2021).

1.9.2. Alan Seçiciliği

Bu kapsamda lipazlar spesifik olmayan lipazlar, 1,3 spesifik lipazlar ve yağ asidi spesifik lipazlar olarak üçe ayrılabilir.

Spesifik Olmayan Lipazlar: Bu tür lipazlar, hidrolize edeceği trigliseritte bulunan gliserol zincirindeki yağ asitlerinin konumunu ayırt etmeden reaksiyona girerler. Spesifik olmayan lipazlar final ürün olarak serbest yağ asidi ve gliserol üretirken ara ürün olarak mono- ve diaçilgliserol üretirler.

1,3 Spesifik Lipazlar: Bu türdeki lipazlar trigliseritlerin ester bağını sadece sn-1 ve sn-3 pozisyonunda hidrolize eder. En yaygın bulunan bu lipazlar, reaksiyon sonucunda serbest yağ asitlerinin yanında 1,2 ve 2,3 diaçilgliserol ile 2 monoaçilgliserol üretirler. Kararlı halde olmayan 2,3 diaçilgliserol ve 2 monoaçilgliseroller, açil göçüyle birlikte 1,3 diaçilgliserol ve 1 ile 3 monoaçilgliserole dönüşürler. Bazı lipazlar sn-2 pozisyonunda da ester bağını hidrolize edebilirler.

Yağ Asidi Spesifik Lipazlar: Bazı lipazlar yağ asidi zincirinin uzunluk ve çifte bağ içermesi durumuna göre spesifiklikte bulunabilir (Albayati vd., 2020; Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Godoy vd., 2022; Lotti & Alberghina, 2007; Park & Park, 2022; Remonatto vd., 2022; Sarmah vd., 2018; Szymczak vd., 2021).

1.9.3. Enantiyoseçicilik

Bu tür lipazlar, rasemik bir karışımda bulunan enantiyomerleri ayırt edebilir ve bu moleküle karşı seçicilik gösterebilir. Bu özellik lipazları ilaç ve tarım kimyasalı endüstrilerinde önemli bir konuma getirir (Albayati vd., 2020; Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Eskandari vd., 2024; Godoy vd., 2022; Park & Park, 2022; Sarmah vd., 2018; Szymczak vd., 2021).

1.10. Lipazların Kullanım Alanları

Farklı ortamlarda kataliz reaksiyonlarına katılabilme, seçicilik özellikleri, hem hidroliz hem de sentez reaksiyonlarını katalizleyebilme yetenekleriyle lipazlar pek çok endüstride önemli kullanımları olan enzimlerdendir. Gıda, ilaç, kozmetik gibi birçok farklı sektörde kullanımı olan lipazlar enzim pazarında önemli bir yer tutmaktadır.

Gıda Endüstrisi: Yoğurt ve peynir gibi süt ürünlerinde aroma arttırıcı olarak kullanılması, süt yağını hidrolize etmesi, ekmek endüstrisinde hamur hacmini arttırması ve daha farklı rollerle lipazlar gıda endüstrisinde aktif olarak kullanılmaktadır.

İlaç Endüstrisi: Substrata karşı seçicilik özellikleri sebebiyle lipazlar ilaç endüstrisi ve tanı teknolojilerinde kullanılabilmektedir. Lipazlar farmasötik alanda saf enantiyomer üretmek için kullanılır. Çeşitli ilaçların sentezinde farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar rol almaktadır. Kan serumunda bulunan lipazın seviyesinin belirlenmesi bazı hastalıkların tanısında yardımcı olmaktadır.

Kozmetik Endüstrisi: Kişisel bakım ürünlerinde lipazlar biyokatalizör olarak kozmetik maddelerinin üretimine katılabileceği gibi bazı durumlarda ana bileşen olarak da kullanılmaktadır. Aroma ve koku verici maddelerin sentezine de katılırlar.

Deterjan Endüstrisi: Diğer enzimlerle birlikte lipazlar da temizlik ürünlerinde özellikle yağ lekelerinin çıkarılması için kullanılmaktadır. Biyobozunur olmaları ile birlikte çevreye zararları yoktur ve yıkama sıcaklığının azalmasında rol oynayabilirler.

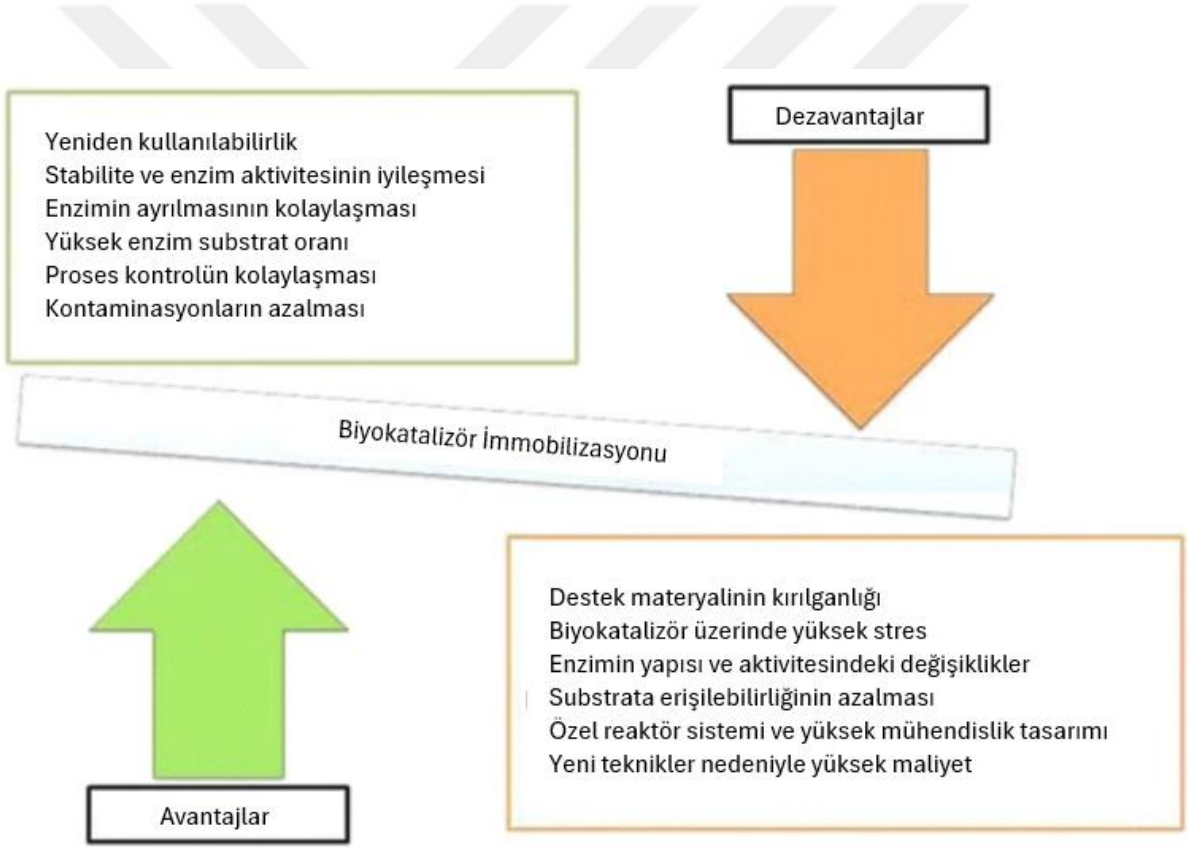
Tekstil Endüstrisi: Lipazlar yün, ipek, polyester gibi çeşitli kumaşların dayanımını arttırmak amacıyla kullanılabilmektedir. Kumaşların boyanma kapasitesi ve yumuşaklığına da olumlu etkileri olan lipazlar tekstil endüstrisinde yeri olan enzimlerdendir.

Biyodizel Endüstrisi: Atık yağların biyodizele dönüştürülmesinde lipaz enziminden faydalanılmaktadır. Yan ürün oluşumunun az olması, reaksiyon şartlarının ekstrem olmaması ve serbest yağ asitlerinin yanında trigliseritleri de biyodizele dönüştürebilme yetenekleriyle lipazlar bu pazarda önemli bir konumdadır.

Bunlar dışında lipazlar biyosensör teknolojilerinde, kağıt endüstrisinde, çay işlemesinde, atık su arıtımında ve pek çok farklı endüstride kullanılabilmektedir (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy vd., 2018; Chandra vd., 2020; Eskandari vd., 2024; Fahim vd., 2024; Ismail & Baek, 2020; Kumar vd., 2023; Martínez Pérez vd., 2019; Salgado vd., 2022; Sarmah vd., 2018; Szymczak vd., 2021).

1.11 Enzim İmmobilizasyonu

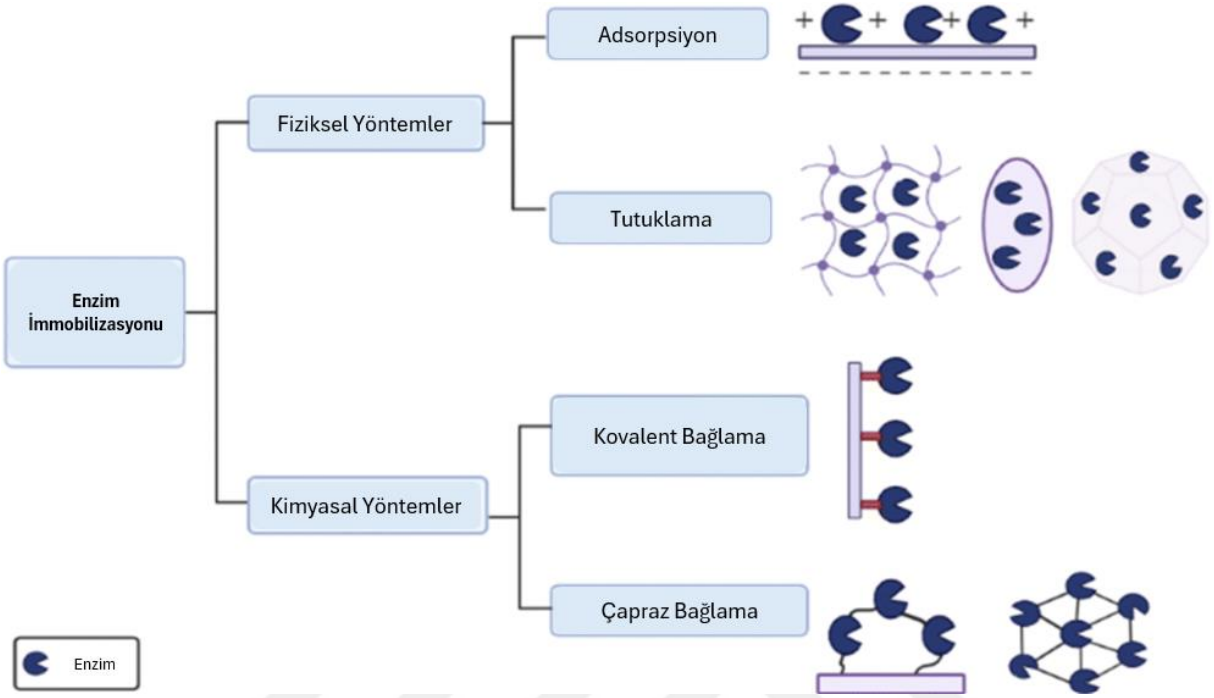
Enzim immobilizasyonu, enzimin aktivitesini koruyacak ve tekrar kullanılabilir bir hale gelecek şekilde katı bir destek materyaline bağlanmasıdır. İmmobilizasyon sonucunda enzimin yeniden kullanımı mümkün kılındığı gibi optimum koşullardan farklı ortamlarda bile aktivitesini koruması sağlanabilmektedir. İmmobilizasyon ile birlikte enzimler daha kararlı hale gelir. Aynı zamanda reaksiyona müdahale kolaylaşır ve yeniden kullanılabilir hale gelen enzimle ekonomik açıdan avantaj sağlanmış olur. Bu gibi özelliklerle enzim immobilizasyonu çeşitli endüstriler için önemli bir araştırma konusu olmuştur. Bununla birlikte bazı durumlarda immobilizasyon dezavantajlara sahip olabilmektedir. Şekil 1.11'de immobilizasyonun bazı avantaj ve dezavantajları gösterilmiştir (Eş vd., 2015; M. vd., 2020; Maghraby vd., 2023; Nguyen & Kim, 2017).



Şekil 1.11: Enzim immobilizasyonun avantaj ve dezavantajları (Eş vd., 2015)

Enzimlerin katı bir materyale immobilizasyonu ile birlikte gelen bazı olumlu ve olumsuz etkiler vardır. Enzimin yeniden kullanılabilirliğinin artması gibi ekonomik açıdan olumlu etkiler elde edilebilirken, substrat-enzim etkileşiminin zorlaşması gibi olumsuz etkilerle karşılaşılabilir.

Enzim immobilizasyon teknikleri fiziksel ve kimyasal olarak ikiye ayrılabilir. Adsorpsiyon ve tutuklama yöntemi fiziksel; kovalent bağlama ve çapraz bağlama yöntemleri kimyasal immobilizasyon yöntemler altında incelenir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12: Enzim immobilizasyonu yöntemleri (Gama Cavalcante vd., 2024)

Enzim immobilizasyonu adsorpsiyon ve tutuklama yöntemleri ile fiziksel; kovalent ve çapraz bağlama yöntemleri ile kimyasal yöntemlerle sağlanabilmektedir.

Adsorpsiyon yönteminde enzim, destek materyaline geri dönüşlü olarak kovalent olmayan bağlarla (Van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağı, hidrofobik ve iyonik etkileşimler) bağlanabilir. Kolay uygulanabilen ve basit bir teknik olsa bile zayıf bağlar ile enzim-destek materyali etkileşimi sağlandığından değişken sıcaklık, pH değerleri ve benzeri endüstriyel koşullar için dayanıklı bir yöntem değildir.

Bir diğer fiziksel immobilizasyon tekniklerinden biri tutuklama yöntemidir. Geri dönüşsüz olan bu yöntem, enzimin destek materyaline hapsedilmesiyle gerçekleşir. Genellikle bu yöntem polimerizasyon öncesi enzimin monomer çözeltisine katılması yoluyla gerçekleşir. Mikro-çevre düzenlemesinin kolay olması ve sızıntının azalması gibi avantajlara sahip olan bu yöntem, enzim yükleme kapasitesinin düşük olması gibi dezavantajlara da sahiptir (Eş vd., 2015; Fahim vd., 2024; Gama Cavalcante vd., 2024; M. vd., 2020; Maghraby vd., 2023; Nguyen & Kim, 2017; Remonatto vd., 2022).

Kimyasal bağlama yöntemlerinden olan kovalent bağlama yönteminde immobilizasyon enzim ve destek materyali arasında oluşan kovalent bağlarla sağlanmaktadır. Enzim ile destek materyali arasında kurulan kuvvetli bağ ile enzim sızıntısı riski azaltılabilir ancak enzimin hareketinin kısıtlanması gibi dezavantajlar da ortaya çıkabilmektedir. Bu çalışmada, *Candida rugosa*'dan elde edilmiş lipaz enzimi UV ile sertleşebilen metal-organik çerçeve tabanlı bir destek materyaline kovalent olarak immobilize edilmiştir.

Çapraz bağlama yöntemi de kimyasal immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Enzim molekülleri arasında çapraz bağlayıcı ajanlar yardımıyla kurulan kovalent bağlarla gerçekleştirilir. Enzim sızıntısının az olduğu basit bir tekniktir ancak çapraz bağlayıcı kullanımı enzimin konformasyonunda değişikliğe sebep olabilir (Eş vd., 2015; Fahim vd., 2024; Gama Cavalcante vd., 2024; M. vd., 2020; Maghraby vd., 2023; Nguyen & Kim, 2017; Remonatto vd., 2022).

Enzim immobilizasyonu için organik, inorganik ve hibrit destek materyali seçilebilmektedir. Bu destek materyali stabil, düşük maliyetli, güçlü ve yenilenebilir olmalıdır. İnorganik olarak silika, titanyum ve alüminyum oksitleri, bentoit ve benzerleri; organik olarak kitosan, kolajen, selüloz gibi organik biyopolimerler, çeşitli sentetik polimerler enzim immobilizasyonunda destek materyalleri olarak kullanılabilmektedir. Bunlar dışında manyetik nanoparçacıklar, karbon nanotüpler ve metal-organik kafesler kullanılabilmektedir (Eş vd., 2015; Fahim vd., 2024; Gama Cavalcante vd., 2024; Ismail & Baek, 2020; M. vd., 2020; Maghraby vd., 2023; Nguyen & Kim, 2017; Remonatto vd., 2022).

Hibrit bir malzeme olan metal-organik kafesler (MOF), metal iyon veya kümeleri ile organik bağlayıcıların koordine bağlarla bağlanmasıyla elde edilmektedir. Organik maddeler ve metalleri bir araya getiren kristal yapılı gözenekli malzemenin ilaç taşıma, kataliz, gaz depolama, sensör mekanizmaları gibi faklı alanlarda kullanımı vardır. Yüzey alanı geniş olan bu malzeme gözenek boyutlarının ayarlanabilir ve yapısının kontrol edilebilir olmasıyla ilgi çeken malzemelerden biridir. Hidrotermal, mekanokimyasal, elektrokimyasal ve ultrason gibi farklı teknikler yardımıyla sentezlenebilmektedir. MOF'ların alt ailesinden kabul edilen ZIF (zeolitik imidazolat çerçeveler) genel olarak klasik zeolitlere benzer topografiye sahiptir ancak farklı yaklaşımlarla değişik yapılar da elde etmek mümkündür. Yüksek işlevsellikleri, termal dayanımları ve geniş yüzey alanlarıyla enzim immobilizasyonu ve diğer farklı alanlarda değerlendirilmeye aday malzemelerdir (B. Chen vd., 2014; Li vd., 2024; Raptopoulou, 2021; Rezaee vd., 2022; Safaei vd., 2019; Souza vd., 2022).

Zeolitik imidazolat türevi metal organik kafeslerden olan ZIF8, gözenek boyutunun ayarlanabilir olması ve farklı çözücülerde bu gözenekli yapısını koruyabilme özellikleriyle çeşitli araştırmalar için ilgi çekici bir malzemedir. Zn(II) ve 2-metil imidazol ligandlarından oluşan ZIF8 yapısı ve gözeneklerinin ayarlanabilir olması ile modifikasyona uygundur. Yapısal esnekliğe sahip bu materyal ayrıca iyi termal dayanıklılığa sahiptir. Mekanik ve kimyasal dayanımı da yüksek olan bu malzeme gaz depolama, su arıtma ve ilaç taşınımı gibi birçok uygulamada kullanılabilmektedir (Elaouni vd., 2022; Zou vd., 2018).

UV ile kürlenebilen sistemler, UV ışığı altında fotobaşlatıcıların reaksiyonu başlatması ve sonrasında çapraz bağlama ile devam eden bir süreçle elde edilebilen katı materyallerdir. Uçucu organik çözücü içermezler ve farklı formülasyonlarla hazırlanabilirler. Yüksek verimlilik ile kaliteli filmler elde edilebilmesi, maliyetinin düşük olması, düşük enerji gereksinimi gibi çeşitli sebepler bu sistemleri çeşitli endüstriler için avantajlı kılar. Bunun dışında, çevreye zararı dokunmaması ve hızlı bir şekilde elde edilebilmeleri de önemli özelliklerindendir (Boton vd., 2018; Yan vd., 2018).

1.12. Literatürde Lipaz Çalışmaları

İmmobilize edilmiş lipazlar, geri kazanım ve yeniden kullanım özelliklerinin gelişmesi ve bununla birlikte kazandırdıkları ekonomik iyileşmeler ile endüstride sıklıkta tercih edilmektedir. Lipazlar pek çok farklı katı destek materyaline immobilize edilebilmektedir. Bu destek materyalleri akrilik reçineler gibi organik maddeler veya silika gibi inorganik maddeler olabilir. İmmobilizasyon tekniği ise kimyasal ve fiziksel yöntemler olarak çeşitlendirilebilmektedir (Kim vd., 2023).

Parandi ve arkadaşları, titanyum oksit kaplanmış manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıkları üzerine grafen oksit ile doplanarak *Candida antarctica* lipaz B (CALB) enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve %75 aktivite geri kazanımı elde ettiklerini bildirmişlerdir (Parandi vd., 2023).

Muanruksa ve arkadaşları, 40 °C'de alginat-polivinil alkol (PVA) ile immobilize edilmiş *Rhizopus oryzae* lipazı kullanarak 4 saatlik esterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirmiş ve %91,30 biyodizel verimi elde etmişlerdir (Muanruksa & Kaewkannetra, 2020). Ayrıca, çeşitli çalışmalarda farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar karbon bazlı manyetik nano-parçacıklar, zirkonyum bazlı metal organik kafesler, magnezyum oksit-alüminyum oksit destekler, selüloz nano-kristalleri gibi çeşitli destek materyallerine immobilize edilmiştir (Culsum vd., 2023; Ramlee vd., 2024; Remonatto vd., 2022; Tan vd., 2024; Zheng vd., 2024).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Çalışmada Kullanılan Araçlar

Hassas Terazi (Sartorious Analytic, A200S ±0,0001 (Almanya))

Destile Su Cihazı (Millipore, Rios-DI UV (A.B.D.))

pH Metre (HANNA, HI 9024 (Romanya))

Buzdolabı (Regal (Türkiye))

Spektrofotometre (Thermo Scientific, Helioszeta UV-VIS (A.B.D.))

Santrifüj (Sigma, 3K 30 (A.B.D.))

UV Cihazı

Vorteks Karıştırıcı (Fisons, Whirlimixer (İngiltere))

Su Banyosu (Wasserbad WB Serisi (Almanya))

2.2. Kimyasallar

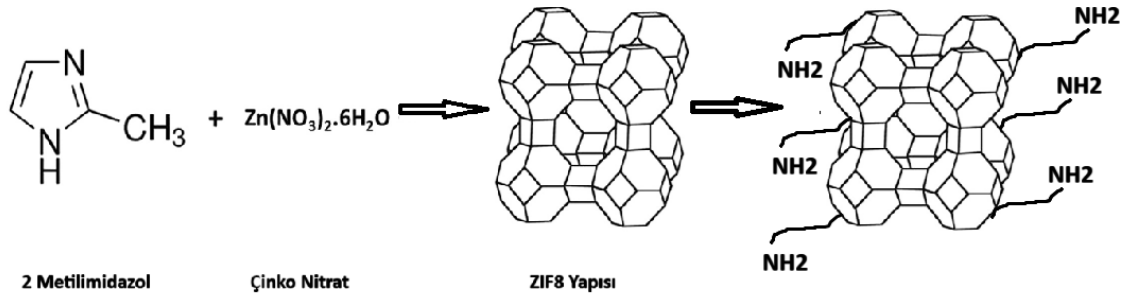
Çinko nitrat hekzahidrat ($Zn(NO_3)_2.6H_2O$), 2-Metilimidazol, poli(etilen glikol) dimetakrilat (PEGDMA), N-[3-(Dimetilamino)propil] metakrilamid (DMAPMA), fotobaşlatıcı, sodyum fosfat monobazik dihidrat ($NaH_2PO_4.2H_2O$), Sodyum fosfat dibazik dodekahidrat ($Na_2HPO_4.12H_2O$), *Candida Rugosa* Lipazı, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenol ve palmitik asit

2.3. Deneysel Yöntemler

2.3.1. Amin Modifiye Zeolitik İmidazolat Çerçeve Sentezi

Her biri 100 mL olacak şekilde $Zn(NO_3)_2.6H_2O$ ve 2-Metilimidazol metanolde hazırlandı ve oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı. Daha sonra, santrifüjleme ile beyaz çökelti ayrıldı. Çökelti metanol ile yıkandı ve daha sonra 80 °C'de 6 saat kurutuldu. 1 gram ZIF'e 10 mL su eklendi ve 3 dakika sonikasyona tabi tutuldu. Bu işlemden sonra, 25 mL amonyum hidroksit eklendi ve 1 dakika sonikasyona tabi tutuldu. 60 °C'de 24 saat karıştırıldıktan sonra, çökelti santrifüjleme ile ayrıldı. Çökelti birkaç kez su ve metanol ile yıkandı. Elde edilen amin modifiye zeolitik imidazolat çerçeve 8 (ZIF8-NH_2), 80 °C'de 6 saat kurutuldu (Liang vd., 2025). ZIF8 yapısı

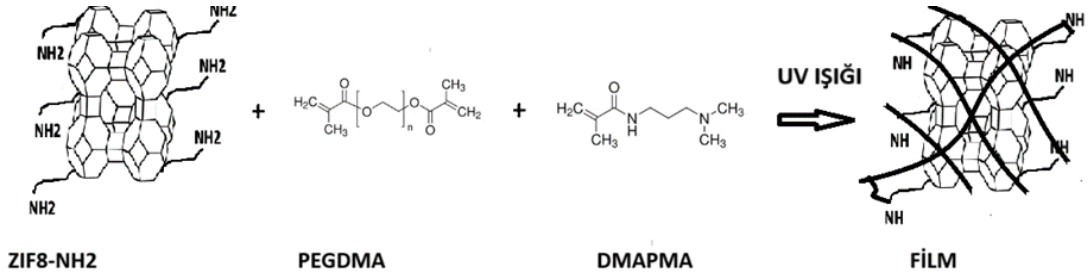
zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi Perkin-Elmer Spectrum 100 ATR-FTIR'de 400-4000 cm^{-1} aralığında karakterize edildi.



Şekil 2.1: ZIF8-NH_2 Sentezi (Kaur vd., 2017)

2.3.2. UV ile Kürlenebilen Polimerik Film Sentezi

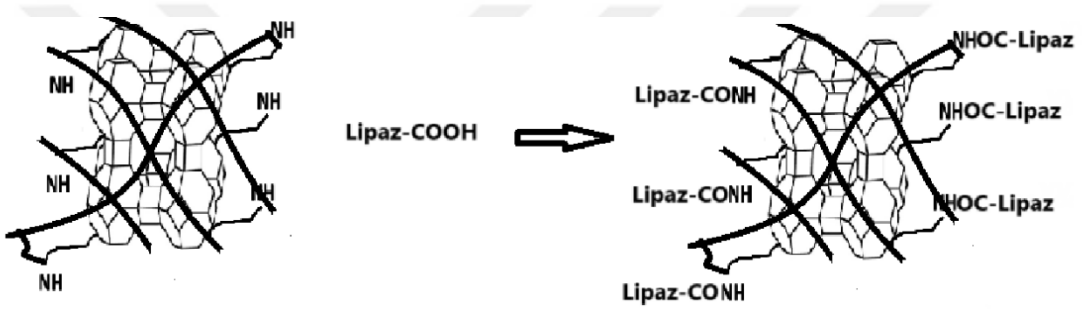
0,5 g PEGDMA ve 0,25 g DMAPMA karıştırıldı. 1 damla fotobaşlatıcı eklendi. Hazırlanan ZIF8-NH_2 karışımı %1, %3 ve %5 olacak şekilde film karışımına eklendi. UV ışığı altında kürlenerek, ince polimerik filmler immobilizasyona hazır hale getirildi.



Şekil 2.2: ZIF8-NH_2 bazlı polimerik film sentezi

2.3.3. Enzim İmmobilizasyonu

Tartımı alınmış polimerik filmler üzerine 10'ar mL(mg/mL) lipaz enzimi çözeltisi eklendi. Orbital karıştırıcıda 8 saat inkübasyon sağlandı. İmmobilizasyon sonrası polimerler enzim çözeltisinden alınarak yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Geriye kalan enzim çözeltisinde protein tayini yapıldı (Bradford, 1976). 0,1mg/mL stok ovalbumin çözeltisinden 2-8 µg konsantrasyon aralığında tüplere konuldu ve son hacim 800 µL olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Her tüpe 200 µL Bradford reaktifi eklendi ve 5 dakika inkübe edildi ve referans çözeltiye (800 µL distile su 200 µL Bradford reaktif karışımı) karşı 595 nm'de absorbans okuması yapıldı. Ovalbumin standart grafiğinden protein konsantrasyon hesaplandı.



Şekil 2.3: Enzim İmmobilizasyonu

2.3.4. Hidrolitik Aktivite Tayini

14,4 mM olacak şekilde hazırlanan p-nitrofenil palmitat substratıyla lipaz enziminin hidrolitik aktivite tayini yapıldı. Bunun için, tartımı alınmış immobilize lipaz ve serbest lipaza 0,25 mL fosfat tamponu ve 0,25 mL p-nitrofenil palmitat substratı eklendi. 15 dakika inkübasyondan sonra 0,5 mL 0,5 M Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. 10 dakika boyunca 10000g santrifüj edildi ve süzüntüde 410 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

Serbest ve immobilize lipazın hidrolitik aktivite ölçümleri farklı pH'larda gerçekleştirildi. Bunun için pH 5 – 8,5 aralığında fosfat tamponları kullanıldı ve çalışmalar serbest ve immobilize enzim üzerinde 37 °C'de gerçekleştirildi.

Hidrolitik aktivite ölçümleri ayrıca farklı sıcaklıklarda yapıldı. Serbest ve immobilize lipaz üzerinde 25-60 °C aralığında deneyler gerçekleştirildi.

2.3.5. Hidrolitik Aktivite Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Kinetik değerlerinin belirlenmesi için optimal şartlarda serbest ve immobilize enzimin üzerinde 0,125 – 0,5 – 1 – 2 – 5 mM substrat konsantrasyonlarında hidrolitik aktivite tayinine göre çalışıldı. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak Km ve $Vmax$ değerleri hesaplandı.

2.3.6. Hidrolitik Aktivite Yeniden Kullanılabilirlik

Yeniden kullanabilirlik için tartımı alınmış immobilize enzim üzerinde optimal şartlarda hidrolitik aktivite tayini metodu 6 kez tekrar edildi.

2.3.7. Hidrolitik Aktivite Depolama Süresi

Serbest ve immobilize enzimlerin ilk aktiviteleri belirlendi ve ardından enzimler buzdolabında saklandı. Daha sonra 1 ay boyunca belirli aralıklarla aktiviteleri ölçüldü. İlk aktivite %100 kabul edilerek bağıl aktiviteler hesaplandı.

2.3.8. Sentetik Aktivite Tayini

10 mM para nitrofenol ve 50 mM palmitik asit içeren substrat çözeltisi lipazın sentetik aktivite tayininde kullanıldı. Serbest ve tartımı alınmış immobilize lipaza 0,25 mL hazırlanan substrat çözeltisi ilave edildi. 15 dakikalık inkübasyonun ardından 1 mL 25 mM NaOH çözeltisi ilave edildi ve reaksiyona girmeyen para nitrofenol için 410 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

Sentez aktivite ölçümleri ayrıca farklı sıcaklıklarda yapıldı. Serbest ve immobilize lipaz üzerinde 37-60 °C aralığında deneyler gerçekleştirildi.

2.3.9. Sentetik Aktivite Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Optimal koşullarda serbest ve immobilize enzimin üzerinde 0,1 – 0,3 – 0,5 – 1 – 5 mM substrat konsantrasyonlarında sentetik aktivite tayinine göre kinetik değerlerinin belirlenmesi için çalışıldı. Km ve $Vmax$ değerleri Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla hesaplandı.

2.3.10. Sentetik Aktivite Yeniden Kullanılabilirlik

Tartımı alınmış immobilize enzim üzerinde optimal şartlarda sentetik aktivite tayini metodu 6 kez tekrar edilerek yeniden kullanılabilirlik değeri belirlendi.

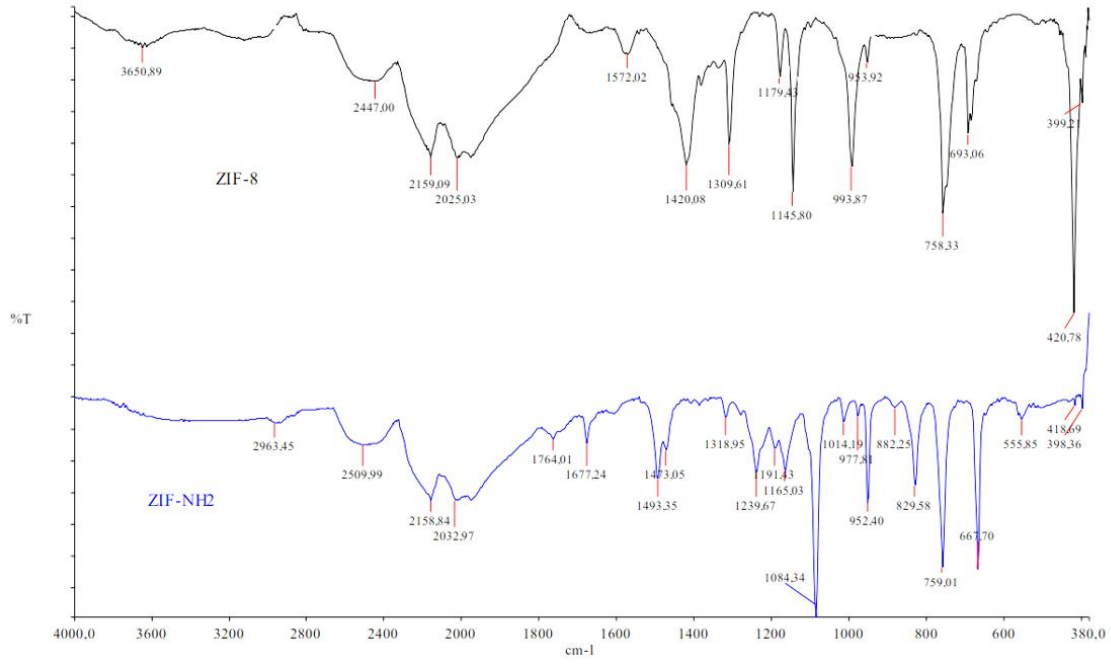
2.3.11. Sentetik Aktivite Depolama Süresi

Serbest ve immobilize enzimlerin ilk aktiviteleri belirlendi ve sonrasında enzimler buzdolabında saklandı. Daha sonra 1 ay boyunca belirli aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı. İlk aktivite %100 kabul edilerek bağıl aktiviteler hesaplandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Filmler

ZIF8 ve sonrasında -NH_2 ile modifiye edilerek elde edilen ZIF8-NH_2'nin ATR-FTIR spektroskopisi yapısal analizi incelenmiş ve Şekil 3.1'de spektrumlar verilmiştir. Buna göre 2-metilimidazolün C-H gerilme titreşimleri 2963 cm^{-1} de görülmektedir. İmidazol halkasına ait karakteristik gerilmeler 1470-760 cm^{-1} de aralığında gözlenmektedir. ZIF8 ve ZIF-NH_2'nin Zn-N gerilmesi 1014 ve 995 cm^{-1} görülmekte olup Zn-N'nin gerilme titreşimi ZIF-NH_2'de 418 cm^{-1}'ye kaymıştır. ZIF-NH_2 spektrumunda 1318 ve 667 cm^{-1} de oluşan iki yeni pik amin grubunun ZIF8'e kovalent olarak bağlandığını göstermektedir (Kaur vd., 2017; Wang vd., 2025).



Şekil 3.1: ZIF-8 ve ZIF-NH_2 FTIR Spektrumları

3.2. Lipazın Polimerik Filme İmmobilizasyonu

Lipaz enzimi, UV ile kürlenebilen ZIF8-NH_2 tabanlı polimerik destek materyaline immobilize edilmiştir. Bradford protein tayini metodu kullanılarak polimerik filmlere immobilize olan enzim miktarı saptanmıştır. 1 g polimere bağlanan enzim miktarı ZIF8-NH_2 içermeyen film (Base) için 2,34 mg olarak bulunmuştur. Bununla birlikte %1, %3 ve %5 oranında ZIF8-NH_2 içeren filmlerde bu değer sırasıyla 3,12 mg, 3,20 mg ve 3,59 mg olarak bulunmuştur. ZIF8'in

gözenekli yapısı, geniş bir yüzey alanı ve gözenek hacmi ve ayrıca ZIF8'e -NH_2 fonksiyonel gruplarının eklenmesi immobilizasyon verimini artırmış olabilir (W. Chen vd., 2025). Tablo 3.1'de filmlere immobilize olan enzim miktarları gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Enzim İmmobilizasyonu

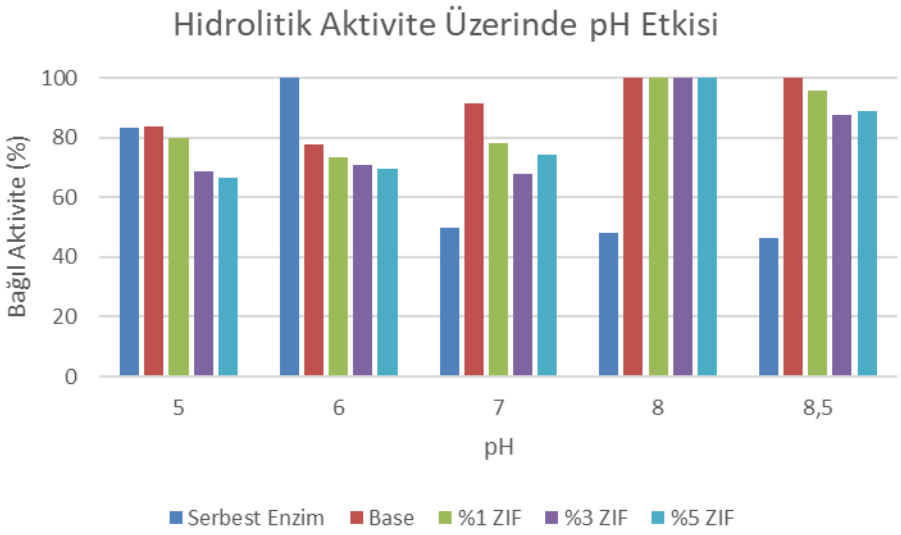
Polimerik Film	1 g polimere bağlanan enzim mg	İmmobilizasyon Yüzdesi (%)
Base	2,34	24
%1	3,12	47
%3	3,20	39
%5	3,59	57

3.3. Hidrolitik Aktivite

Hidrolitik aktivite tayin metoduna göre serbest ve immobilize enzim üzerinde pH ve sıcaklık değerlerinin etkisi araştırılmıştır. Bunun yanında enzimin yeniden kullanabilirliği ve depolama süresi ile kinetik parametreler hesaplanmıştır.

3.3.1. pH Etkisi

Çok yüksek veya çok düşük pH değerleri lipazın aktif merkezinin konformasyonunun değişmesine ve ardından tüm molekülün yapısının değişerek denatüre olmasına ve inaktive olmasına yol açabilir. Çalışmada pH 5 ile 8 arasında serbest ve immobilize enzim üzerinde çalışma yapılmış, immobilize enzimde optimum değer pH 8 olarak saptanmıştır. Serbest lipazda ise bu değer pH 6 olarak bulunmuştur. Bu durum, enzimin immobilizasyon sonrası polimerik desteğin sahip olduğu fonksiyonel gruplar ile enzimin etkileşmesi ve bunun sonucunda oluşacak çevresel yükün değişmesi sonucu enzimin değişen pH değerlerinde daha iyi aktivite gösterebileceğini düşündürmektedir. Şekil 3.2'de pH değerinin serbest ve immobilize enzimin hidrolitik aktivitesine olan etkisinin sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.2: pH'ın Hidrolitik Aktivite Üzerindeki Etkisi

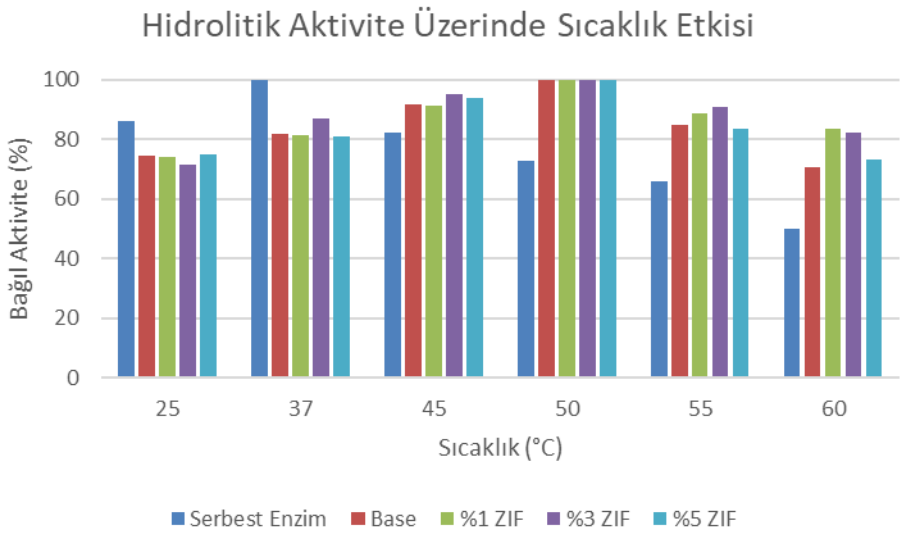
Serbest enzimin en yüksek aktivite gösterdiği değer pH 6 iken immobilize lipaz için bu değer pH 8 olarak bulunmuştur. Bu durum enzimin polimerik destekle yaşadığı etkileşimler sonucu değişen pH değerlerinde aktivite gösterebileceği şeklinde yorumlanabilir.

Artan pH değerlerinde serbest enzim aktivitesini kaybederken immobilize enzimin aktivitesini yüksek oranda koruduğu gözlemlenmesi destek materyalinin bazik ortamda enzimin konformasyonunu koruduğunu ve farklı pH değerlerine adaptasyonun iyileştiğini gösteriyor olabilir. Ayrıca daha düşük pH değerinde ZIF8-NH_2 içermeyen polimere yapılan immobilizasyonun sonucu aktivitenin daha yüksek olması farklı pH ortamlarında amin grubunun etkilenmesinden kaynaklı olabilir.

3.3.2. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklık, lipaz aktivitesinde önemli bir rol oynamaktadır ve lipazın immobilizasyonu, lipazın konformasyonunda bir değişikliğe yol açabilir; bu da optimum sıcaklıkta bir değişikliğe neden olabilir. Hidrolitik aktivite tayinine göre yapılan çalışma 25 ile 60 °C aralığında yürütülmüştür. Serbest lipazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 37 °C olarak bulunurken immobilize enzimlerde bu değer 50 °C olarak bulunmuştur. ZIF8 içeren filmlerde immobilize enzimin Base formundaki immobilize enzime göre 55 ve 60 derece sıcaklıklarda bile daha yüksek aktivite gösterdiği tayin edilmiştir. Bu bulgu, ZIF8'in enzimin esnekliğini sınırlaması ve denatürasyona uğramasını engellediği şeklinde yorumlanabilir. Bununla birlikte immobilizasyonun etkisi ile enzimin yükselen sıcaklıklarda bile enzimin aktif bölgesi ve konformasyonunu koruduğu ve

taşıyıcı desteğinin daha stabil bir yapı oluşturduğu, lipazın ısıya karşı direncini artırdığı şeklinde yorumlanabilir (Ozyilmaz vd., 2023). Şekil 3.3'de serbest ve immobilize enzimin hidrolitik aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisinin sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Sıcaklığın Hidrolitik Aktivite Üzerindeki Etkisi

Serbest lipazın 37 °C'de gösterdiği maksimum aktiviteye karşın immobilize lipaz 50 °C'de daha yüksek aktivite göstermiştir. İmmobilizasyon ile birlikte enzimin yükselen sıcaklıklarda bile aktif bölgesini koruduğu söylenebilir. Değişen sıcaklıklarda bile konformasyonun korunabiliyor olması ve buna bağlı olarak da enzimin aktivite göstermeye devam edebiliyor olması şeklinde yorumlama yapılabilir.

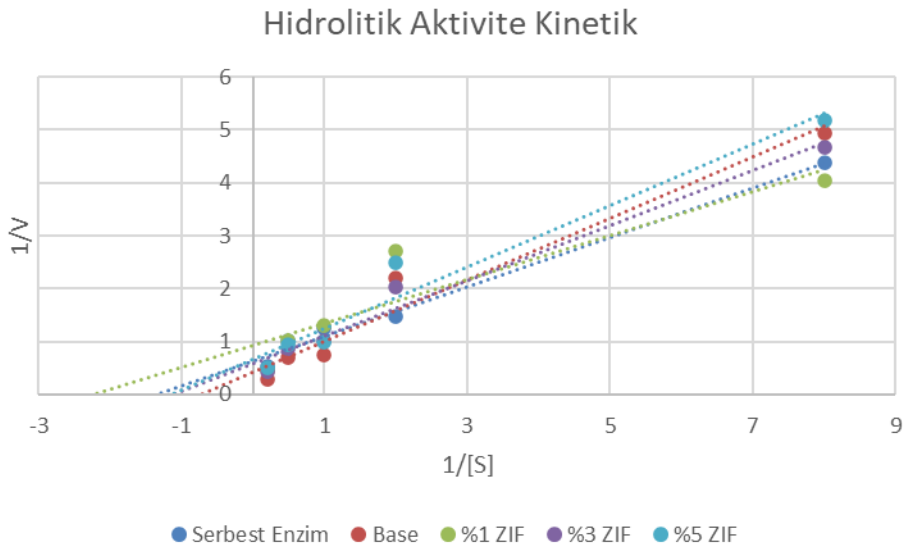
3.3.3. Kinetik Parametreler

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin korunumu ve biyokataliz uygulamaları açısından önemli bir potansiyele sahiptir. MOF sistemleri de enzim immobilizasyonu için kullanılan materyallerden olup, pek çok farklı grup bu sistemler kullanılarak gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu sonucu enzim-substrat afinite ilişkisini incelemiştir (Ozyilmaz vd., 2023). Farklı konsantrasyonlarda substratlar kullanılarak hidrolitik aktivite tayin metoduna göre kinetik parametreler tayin edilmiştir. Km ve $Vmax$ değerleri Lineweaver-Burk grafiği ile hesaplanmıştır. Serbest lipaz için Km ve $Vmax$ değerleri sırasıyla 0,73 ve 1,57 olarak bulunmuştur. Base, %1, %3 ve %5 ZIF8-NH_2 içeren film için *Km* sırasıyla 1,39, 0,45, 0,90 ve 0,88; *Vmax* sırasıyla 2,4, 1,08, 1,72 ve 1,52 olarak bulunmuştur. Enzimin Base polimere

immobilizasyonu sonucu *Vmax* ve *Km* değerleri artış göstermiştir. Bununla birlikte %1 ve %5 ZIF8-NH_2 içeren filmlerde immobilize enzimde *Vmax* değeri azalmıştır. Ancak *Km* değeri serbest enzime göre %1 ZIF8-NH_2 içeren filmde azalırken Base ve %5 ZIF8-NH_2 içeren filmde artış göstermiştir. Bu durum hidrolitik aktivite için substrat ilgisinin Base'e göre %1 ZIF8-NH_2 içeren filmde arttığını bunun ZIF8-NH_2'nin porlu yapısının enzimin substrata olan ilgisini arttırdığını ve enzim-substrat ilişkisini kolaylaştırdığını ancak diğerinde enzim-substrat etkileşimi için hareket alanının kısıtlanması gibi sebeplerle etkileşimin daha zor olabileceği şeklinde açıklanabilir. Lipazların kapak olarak adlandırılan hidrofilik ve hidrofobik kısımlar içeren hareketli yapısı ortam şartlarına göre enzim aktivitesini etkilemektedir. Sulu çözeltilerde kapalı konformasyonda olan bu yapı enzimin aktif bölgesini kapalı tutar. Lipazların hidrofobik kısımlarıyla etkileşime giren yüzey aktif maddeler sayesinde kapak yapısı açılır ve bu konformasyon değişikliği enzimin aktivitesinde ve yapısında değişikliklere sebep olabilir (Ozyilmaz vd., 2023).

Tablo 3.2: Hidrolitik Aktivite Kinetik Parametreleri

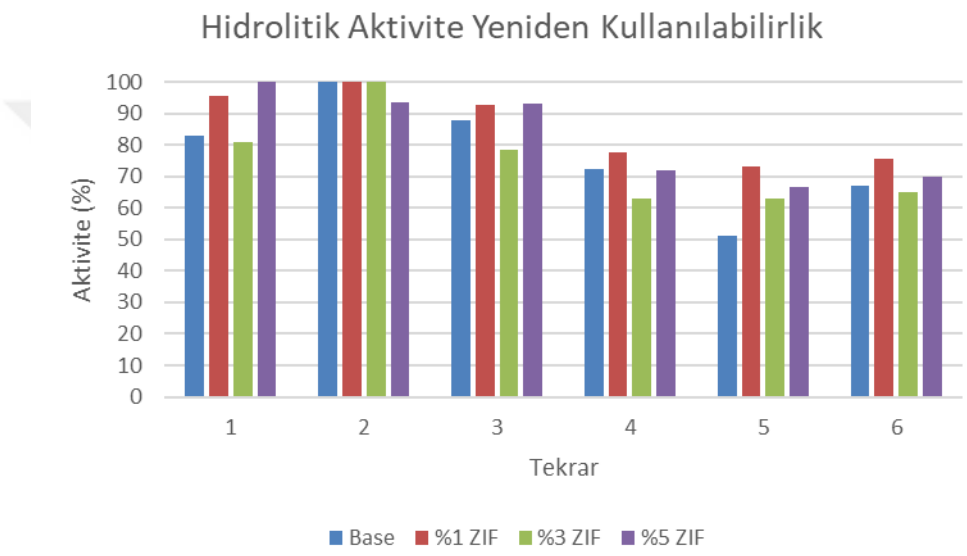
	Vmax	Km
Serbest Enzim	1,57	0,73
Base	2,4	1,39
%1 ZIF	1,08	0,45
%3 ZIF	1,72	0,90
%5 ZIF	1,52	0,88



Şekil 3.4: Hidrolitik Aktivite Kinetik

3.3.4. Yeniden Kullanılabilirlik

İmmobilizasyon yoluyla enzimlerin tekrar kullanılabilirliğinin sağlanabilmesi, enzimlerin ekonomik olarak uygulanabilir olmasını ve endüstriyel kullanımda veriminin artmasını sağlamaktadır. İmmobilize enzimlerin yeniden kullanılabilirliğini 6 döngü boyunca hidrolitik aktivite tayinine göre test edilmiştir. Tekrar kullanımlar sonunda Base ve %1, %3, %5 ZIF8-NH_2 içeren filmlerde sırayla yaklaşık yüzde 67, 75, 65 ve 70 aktivitelerini korudukları tayin edilmiştir. Genel olarak polimerik destek materyalinin içerdiği fonksiyonel gruplara bağlı olarak tekrar kullanımda farklılıklar olduğu rapor edilmiştir (Ozyilmaz vd., 2023)



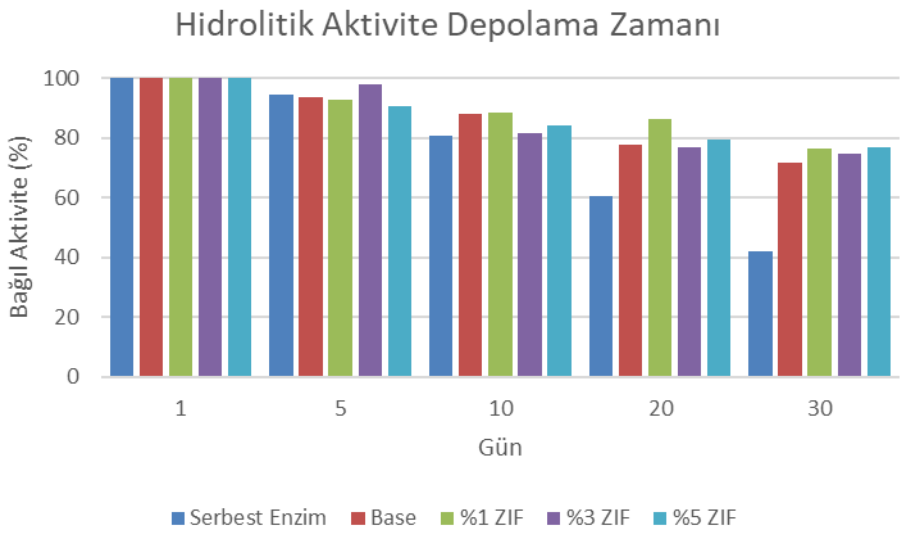
Şekil 3.5: Hidrolitik Aktivite Yeniden Kullanılabilirlik

İmmobilize lipaz üzerinde 6 tekrarla yapılan hidrolitik aktivite tayin metodu uygulaması sonucunda enzimin tekrar kullanılabilirliğinin sağlandığı ve 6. tekrarda dahi aktivitenin korunduğu gözlemlenmiştir.

3.3.5. Depolama Süresi

ZIF içermeyen Base formunda immobilize enzimin 1 ay sonunda yaklaşık %72 aktivitesini koruduğu saptanmıştır. %1, %3 ve %5 ZIF8-NH_2 içeren filmlere immobilize enzimlerin yüzde 75-77 aralığında aktivitelerini korudukları bulunmuştur. Serbest enzim 1 ay sonunda yüzde 60 oranında aktivitesini kaybetmiştir. ZIF içeren immobilize lipazın daha yüksek depolama kararlılığı, ZIF çerçevesi tarafından sağlanan koruyucu kalkan sayesinde ayrıca fonksiyonel

gruplarla güçlendirilmesi göz önüne alındığında hem serbest hem de Base formunda immobilize enzime göre daha yüksek bulunmuştur. Şekil 3.6'da depolama süresi sonuçları verilmiştir.



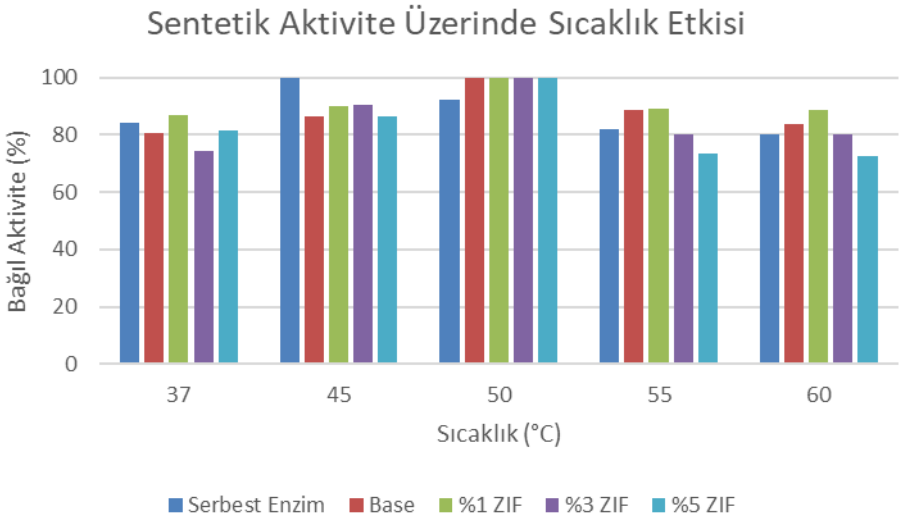
Şekil 3.6: Hidrolitik Aktivite Depolama Süresi

3.4. Sentetik Aktivite

Sentetik aktivite tayini metoduna göre immobilizasyonun sıcaklık, yeniden kullanılabilirlik ve depolama süresi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Aynı şekilde serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

3.4.1. Sıcaklık Etkisi

37 ile 60 °C aralığında sıcaklık aktivite tayini yapılarak sıcaklığın sentetik aktivite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Serbest lipazın maksimum sentetik aktivite gösterdiği sıcaklık 45 °C olarak bulunurken immobilize enzimde bu değer 50 °C'ye çıkmıştır. Enzimin daha yüksek sıcaklıklarda bile konformasyonun korunduğu ve aktivite gösterebileceği şeklinde yorum yapılabilir. Şekil 3.7'de serbest ve immobilize lipazın sentetik aktivitesi üzerinde sıcaklık etkisinin sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.7: Sıcaklığın Sentetik Aktivite Üzerindeki Etkisi

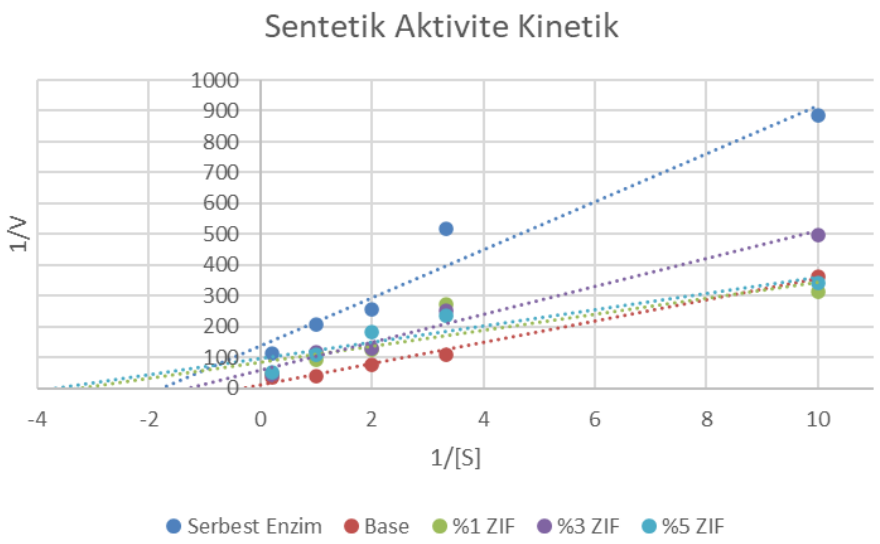
Serbest lipazın 45 °C'de maksimum aktivite göstermesine karşın immobilize lipazın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 50 °C olarak bulunmuştur.

3.4.2. Kinetik Parametreler

Serbest ve immobilize lipazın kinetik parametreleri farklı konsantrasyonlarda substrat kullanılarak sentetik aktivite tayini metoduna göre hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiği ile hesaplanan Km ve $Vmax$ değerleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir. İmmobilizasyon sonucunda $Vmax$ değerleri bütün polimerlerde artış göstermiştir. Base polimere immobilize enzimin Km değeri artış göstermiş, %1 ve %5 ZIF8-NH_2 içeren polimere immobilize enzimde Km değeri azalmıştır. Sentetik aktivite için enzimin substratına ilgisi polimerin ZIF8-NH_2 içermesiyle artma eğilimi göstermesi ZIF'in çevresi ve fonksiyonel gruplarının etkili olması ile açıklanabilir.

Tablo 3.3: Sentetik Aktivite Kinetik Parametreleri

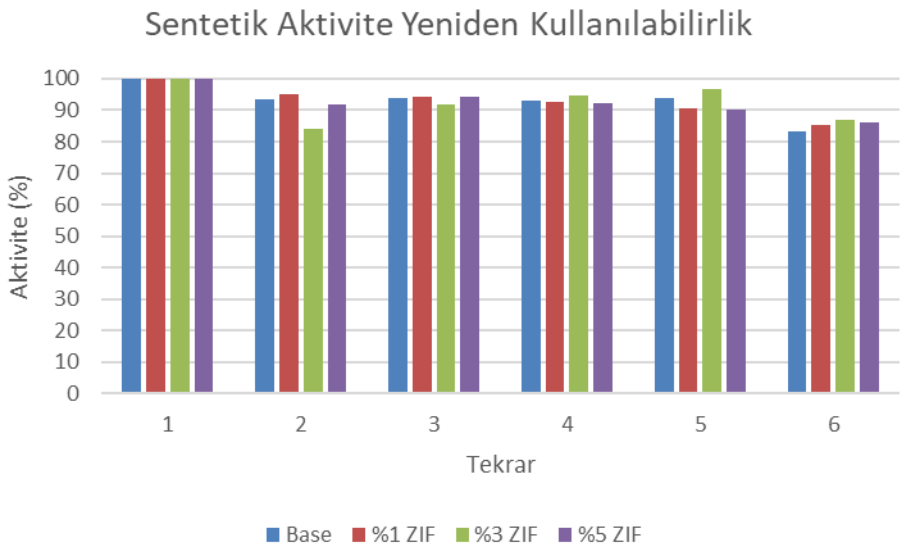
	Vmax	Km
Serbest Enzim	0,0073	0,56
Base	0,0962	3,33
%1 ZIF	0,0119	0,31
%3 ZIF	0,0169	0,76
%5 ZIF	0,0104	0,28



Şekil 3.8: Sentetik Aktivite Kinetik

3.4.3. Yeniden Kullanılabilirlik

Yeniden kullanılabilirliğin incelenmesi için sentetik aktivite tayini metodu 6 kere immobilize lipaz üzerinde gerçekleştirilmiştir. 6 tekrara rağmen enzimin sentetik aktivitesini %80'in üzerinde koruduğu bulunmuştur. 6. kullanım sonunda sentetik aktivite Base, %1, %3 ve %5 ZIF8-NH_2 içeren polimerlerde yaklaşık yüzde 83-87 aralığında bulunmuştur.

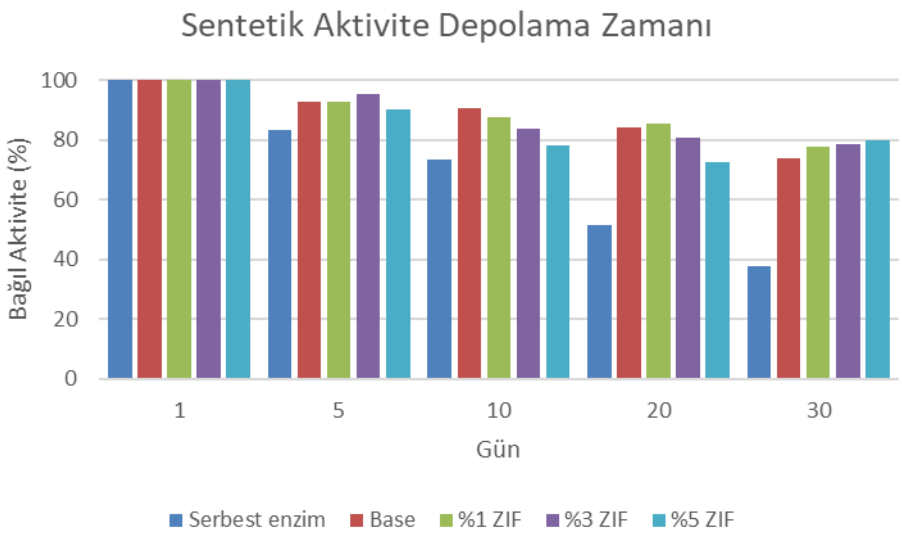


Şekil 3.9: Sentetik Aktivite Yeniden Kullanılabilirlik

İmmobilize lipazın sentetik aktivite tayininin 6. tekrarından sonra bile aktivitesini büyük ölçüde koruduğu gözlemlenmiştir.

3.4.4. Depolama Süresi

ZIF içermeyen Base formunda immobilize enzimin 1 ay sonunda yaklaşık %74 aktivitesini koruduğu saptanmıştır. %1, %3 ve %5 ZIF8-NH_2 içeren filmlere immobilize enzimlerin yüzde 78-80 aralığında aktivitelerini korudukları bulunmuştur. Serbest enzim 1 ay sonunda yüzde 38 oranında aktivite göstermiştir. Depolama süresi sonuçları Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10: Sentetik Aktivite Depolama Süresi

4. SONUÇLAR

Candida rugosa lipazının metal organik kafes tabanlı UV ile sertleşebilen polimerik filme immobilizasyonu ve immobilizasyonun enzimin çeşitli parametreleri üzerindeki etkileri çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışma için polimerik filmin hazırlanmasında amin modifiye zeolitik imidazolat çerçeve 8 (ZIF8-NH_2) kullanılmıştır. Lipazın, bu polimerik filmin -NH_2 gruplarına kovalent olarak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimin ZIF8-NH_2 içeren polimerik filme daha yüksek oranda immobilize olduğu bulunmuştur.

Hidrolitik aktivite çalışmaları sonucunda serbest enzim ve immobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerleri sırasıyla 6 ve 8 olarak bulunmuştur. Bu durum, enzimin ZIF8-NH_2 içeren ve içermeyen filmlere immobilizasyonu ile destek materyalinin üzerindeki yük ve lipazın bu yüklerle etkileşiminden sonra enzimin daha yüksek pH değerlerinde çalışabileceği hakkında bilgi verir. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkilerine bakıldığında serbest enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 37 °C iken immobilizasyon sonrası bu değer 50 °C'ye çıkmıştır. Bu durum, ZIF8-NH_2 gruplarının bulunduğu destek materyaline immobilize olan enzimin yükselen sıcaklıklarda dahi konformasyonunun ve aktif bölgesinin korunmasının sağlandığı, enzimin artan sıcaklıklarda dahi aktivite gösterebileceği şeklinde yorum yapmaya olanak kılar. Yeniden kullanımda aktivite çalışmaları sonucunda 6 kullanım sonucunda bile aktivitenin büyük oranda korunduğu anlaşılmıştır. Depolama süreleri incelendiğinde serbest enzimin hidrolitik aktivitesini kaybettiği, immobilize enzimlerin ise 1 ay sonra dahi aktivitesini yüksek oranda koruduğu bulunmuştur.

Sentetik aktivite çalışmasında sıcaklığın serbest ve immobilize lipaz üzerindeki etkileri incelendiğinde serbest lipazın maksimum aktiviteyi 45 °C'de gösterdiği, immobilize lipazın maksimum aktiviteyi 50 °C'de gösterdiği bulunmuştur. Yeniden kullanımda sentetik aktivitenin 6 tekrar ardından %80 üzerinde korunduğu gözlemlenmiştir. Kinetik değerlerine göre *Vmax* değeri artış göstermiş ve ZIF8-NH_2 içeren filmlerde *Km* değerinde düşüş olmuştur, bu da immobilizasyon ile birlikte enzimin substratına olan ilgisinin arttığı şeklinde yorumlanabilir. Sentetik aktivite depolama süresi incelendiğinde serbest enzim 1 ayın sonunda aktivitesini ancak yaklaşık %38 korurken, immobilize lipaz aktivitesini %70'in üzerinde korumuştur.

Genel olarak bakıldığında lipaz enzimi ZIF8-NH_2 içeren polimere daha fazla miktarda immobilize olmuştur. İmmobilizasyon ile birlikte enzimin daha yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde de aktivite gösterebileceği bulunmuştur. Bununla birlikte endüstriyel kullanım için büyük önem arz eden yeniden kullanılabilirlik değerleri incelendiğinde hidrolitik ve sentetik

aktivite için enzimin tekrar kullanımlarda aktivitesini büyük oranlarda koruyabildiği gözlemlenmiştir. Depolama süreleri de göz önüne alındığında hem hidrolitik hem de sentetik reaksiyonlarda immobilize enzim, serbest enzime göre aktivitesini daha iyi oranda korumuştur.

KAYNAKLAR

Ahluwalia, V. K., Kumar, L. S., & Kumar, S. (2022). Enzymes. *Chemistry of Natural Products*, 157-214. https://doi.org/10.1007/978-3-030-86698-3_4

Albayati, S. H., Masomian, M., Ishak, S. N. H., Ali, M. S. B. M., Thean, A. L., Shariff, F. B. M., Noor, N. D. B. M., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2020). Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity. *Catalysts 2020, Vol. 10, Page 747*, *10*(7), 747. https://doi.org/10.3390/CATAL10070747

Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I. J. (2023). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms*, *11*(2). https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11020510

Angelotti, J. A. F. de A. F., Hirata, D. B. B., & Santos, M. R. R. dos. (2022). Lipases: Sources of Acquisition, Ways of Production, and Recent Applications. *Catalysis Research 2022, Vol. 2, 013*, *2*(2), 1-43. https://doi.org/10.21926/CR.2202013

Bauer, T. L., Buchholz, P. C. F., & Pleiss, J. (2020). The modular structure of α/β-hydrolases. *The FEBS Journal*, *287*(5), 1035-1053. https://doi.org/10.1111/FEBS.15071

Blanco, A., & Blanco, G. (2022). Enzymes. *Medical Biochemistry*, 165-190. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91599-1.00029-8

Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 20774. https://doi.org/10.3390/IJMS160920774

Boton, L., Puguan, J. M., Latif, M., & Kim, H. (2018). Synthesis and properties of quick-drying UV-curable hyperbranched waterborne polyurethane coating. *Progress in Organic Coatings*, *125*, 201-206. https://doi.org/10.1016/J.PORGCOAT.2018.09.017

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Buxbaum, E. (2015a). Enzyme Kinetics and Mechanism. *Fundamentals of Protein Structure and Function*, 111-140. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19920-7_5

Buxbaum, E. (2015b). Enzymes Are Biocatalysts. *Fundamentals of Protein Structure and Function*, 97-110. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19920-7_4

Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., & Sandoval, G. (2018). Lipases: An overview. *Methods in Molecular Biology*, *1835*, 3-38. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1

Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, *19*(1), 1-42. https://doi.org/10.1186/S12934-020-01428-8/FIGURES/8

Chen, B., Yang, Z., Zhu, Y., & Xia, Y. (2014). Zeolitic imidazolate framework materials: Recent progress in synthesis and applications. *Journal of Materials Chemistry A*, *2*(40), 16811-16831. https://doi.org/10.1039/C4TA02984D

Chen, D., Li, Y., Li, X., Hong, X., Fan, X., & Savidge, T. (2022). Key difference between transition state stabilization and ground state destabilization: increasing atomic charge densities before or during enzyme–substrate binding. *Chemical Science*, *13*(27), 8193-8202. https://doi.org/10.1039/D2SC01994A

Chen, W., Lin, S., Zheng, J., Ling, J., & Zhong, N. (2025). Ultrastable hierarchically porous nucleotide-based MOFs and their use for enzyme immobilization and catalysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *245*, 114294. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2024.114294

Choi, B., Rempala, G. A., & Kim, J. K. (2017). Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1-11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z

Culsum, N. T. U., Wibowo, A., Subagjo, & Budhi, Y. W. (2023). Fabrication of lipase immobilized-carboxylated cellulose nanocrystals as biocatalyst for enzymatic hydrolysis of palm oil and its kinetical study. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *54*, 102915. https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2023.102915

Elaouni, A., El Ouardi, M., Zbair, M., BaQais, A., Saadi, M., & Ait Ahsaine, H. (2022). ZIF-8 metal organic framework materials as a superb platform for the removal and photocatalytic degradation of organic pollutants: a review. *RSC Advances*, *12*(49), 31801-31817. https://doi.org/10.1039/D2RA05717D

Eskandari, A., Leow, T. C., Rahman, M. B. A., & Oslan, S. N. (2024). Recent insight into the advances and prospects of microbial lipases and their potential applications in industry. *International Microbiology 2024*, 1-35. https://doi.org/10.1007/S10123-024-00498-7

Eş, I., Vieira, J. D. G., & Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(5), 2065-2082. https://doi.org/10.1007/S00253-015-6390-Y/TABLES/2

Fahim, Y. A., El-Khawaga, A. M., Sallam, R. M., Elsayed, M. A., & Assar, M. F. A. (2024). A Review on Lipases: Sources, Assays, Immobilization Techniques on Nanomaterials and Applications. *BioNanoScience*, *14*(2), 1780-1797. https://doi.org/10.1007/S12668-024-01319-X/TABLES/3

Gama Cavalcante, A. L., Dari, D. N., Izaias da Silva Aires, F., Carlos de Castro, E., Moreira dos Santos, K., & Sousa dos Santos, J. C. (2024). Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials: toward sustainable industrial applications. *RSC Advances*, *14*(25), 17946-17988. https://doi.org/10.1039/D4RA02939A

Godoy, C. A., Pardo-Tamayo, J. S., & Barbosa, O. (2022). Microbial Lipases and Their Potential in the Production of Pharmaceutical Building Blocks. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17). https://doi.org/10.3390/IJMS23179933

Hlima, H. Ben, Dammak, M., Karray, A., Drira, M., Michaud, P., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2021). Molecular and Structural Characterizations of Lipases from Chlorella by Functional Genomics. *Marine Drugs*, *19*(2). https://doi.org/10.3390/MD19020070

Ismail, A. R., & Baek, K. H. (2020). Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *International Journal of Biological Macromolecules*, *163*, 1624-1639. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.09.021

Kaur, H., Mohanta, G. C., Gupta, V., Kukkar, D., & Tyagi, S. (2017). Synthesis and characterization of ZIF-8 nanoparticles for controlled release of 6-mercaptopurine drug. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *41*, 106-112. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2017.07.004

Kim, B. H., Hwang, J., & Akoh, C. C. (2023). Liquid microbial lipase — recent applications and expanded use through immobilization. *Current Opinion in Food Science*, *50*, 100987. https://doi.org/10.1016/J.COFS.2023.100987

Kourist, R., Schmidt, S., Iqbal Khan, F., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). *The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties*. *5*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016

Krishnaraj, R. N., David, A., & Sani, R. K. (2017). Fundamentals of enzymatic processes. *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*, 5-29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1_2/FIGURES/3

Kumar, A., Verma, V., Dubey, V. K., Srivastava, A., Garg, S. K., Singh, V. P., & Arora, P. K. (2023). Industrial applications of fungal lipases: a review. *Frontiers in microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1142536

Li, D., Yadav, A., Zhou, H., Roy, K., Thanasekaran, P., & Lee, C. (2024). Advances and Applications of Metal-Organic Frameworks (MOFs) in Emerging Technologies: A Comprehensive Review. *Global Challenges*, *8*(2), 2300244. https://doi.org/10.1002/GCH2.202300244

Liang, X., Yao, X., Chen, S., Wang, W., Zhu, H., Bu, Q., & Liu, Z. (2025). Investigation of efficient adsorption-electrochemical degradation performance of ZIF-8/MWCNTs nanocomposites toward 2,4-dichlorophenol. *Separation and Purification Technology*, *358*, 130385. https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2024.130385

Lotti, M., & Alberghina, L. (2007). Lipases: Molecular Structure and Function. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, 263-281. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_16

M., S., O., P., N., P., N., P., A. M., B., & R., P. (2020). The Enzyme Immobilization: Carriers and Immobilization methods. *JOURNAL OF ENGINEERING & PROCESSING MANAGEMENT*, *11*(2). https://doi.org/10.7251/JEPM1902089S

Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, *8*(6), 5184-5196. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.2C07560/ASSET/IMAGES/LARGE/AO2C07560_0003.JPEG

Martínez Pérez, M., Cerioni, E., Gonçalves, S., Vici, A. C., Carlos, J., Salgado, S., Pérez, M. M., Gonçalves, · E C S, Vici, A. C., De Moraes Polizeli, · M L T, & Salgado, J. C. S. (2019). *Fungal Lipases: Versatile Tools for White Biotechnology*. 361-404. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_11

Ma'ruf, I. F., Widhiastuty, M. P., Suharti, Moeis, M. R., & Akhmaloka. (2021). Effect of mutation at oxyanion hole residu (H110F) on activity of Lk4 lipase. *Biotechnology Reports*, *29*, e00590. https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2021.E00590

McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *The FEBS Journal*, *290*(9), 2214-2231. https://doi.org/10.1111/FEBS.16274

Meisenberg, G., & Simmons, W. H. (2012). Enzymatic Reactions. *Principles of Medical Biochemistry*, 39-54. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07155-0.00004-6

Muanruksa, P., & Kaewkannetra, P. (2020). Combination of fatty acids extraction and enzymatic esterification for biodiesel production using sludge palm oil as a low-cost substrate. *Renewable Energy*, *146*, 901-906. https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2019.07.027

Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, *26*(6), 157-163. https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157

Ozyilmaz, E., Kocer, M. B., Caglar, O., Yildirim, A., & Yilmaz, M. (2023). Surfactant-based metal-organic frameworks (MOFs) in the preparation of an active biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, *371-372*, 10-21. https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2023.06.003

Parandi, E., Safaripour, M., Mosleh, N., Saidi, M., Rashidi Nodeh, H., Oryani, B., & Rezania, S. (2023). Lipase enzyme immobilized over magnetic titanium graphene oxide as catalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. *Biomass and Bioenergy*, *173*, 106794. https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2023.106794

Park, J. Y., & Park, K. M. (2022). Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. *Journal of Chemistry*, *2022*(1), 7609019. https://doi.org/10.1155/2022/7609019

Piumetti, M., & Illanes, A. (2022). Enzymes and their function. *Molecular Dynamics and Complexity in Catalysis and Biocatalysis*, 23-53. https://doi.org/10.1007/978-3-030-88500-7_2/FIGURES/28

Punekar, N. S. (2018a). On Enzyme Nomenclature and Classification. *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*, 33-41. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_4

Punekar, N. S. (2018b). Quantification of Catalysis and Measures of Enzyme Purity. *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*, 143-153. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_14

Ramlee, N. N., Md Illias, R., Toemen, S., Abdul Manas, N. H., & Wan Azelee, N. I. (2024). The effect of immobilization parameters towards Candida rugosa lipase immobilization on magnesium oxide-aluminium oxide via adsorption. *Materials Today: Proceedings*, *96*, 40-49. https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2023.09.211

Ramos Sanchez, L. B. (2015). Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, *05*(02). https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000203

Raptopoulou, C. P. (2021). Metal-Organic Frameworks: Synthetic Methods and Potential Applications. *Materials*, *14*(2), 1-32. https://doi.org/10.3390/MA14020310

Remonatto, D., Miotti, R. H., Monti, R., Bassan, J. C., & de Paula, A. V. (2022). Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochemistry*, *114*, 1-20. https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2022.01.004

Renneberg, R. (2023). Enzymes: Molecular Supercatalysts for Use at Home and in Industry. *Biotechnology for Beginners*, 35-68. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85569-3.00015-5

Rezaee, T., Fazel-Zarandi, R., Karimi, A., & Ensafi, A. A. (2022). Metal-organic frameworks for pharmaceutical and biomedical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *221*, 115026. https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2022.115026

Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, *59*, 1. https://doi.org/10.1042/BSE0590001

Rodrigues, R. C., Virgen-Ortíz, J. J., dos Santos, J. C. S., Berenguer-Murcia, Á., Alcantara, A. R., Barbosa, O., Ortiz, C., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnology Advances*, *37*(5), 746-770. https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.04.003

Roy Choudhury, A. K. (2020). Introduction to enzymes. *Sustainable Technologies for Fashion and Textiles*, 75-90. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102867-4.00004-9

Safaei, M., Foroughi, M. M., Ebrahimpoor, N., Jahani, S., Omidi, A., & Khatami, M. (2019). A review on metal-organic frameworks: Synthesis and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *118*, 401-425. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.06.007

Salgado, C. A., dos Santos, C. I. A., & Vanetti, M. C. D. (2022). Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. *Food Bioscience*, *45*, 101509. https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2021.101509

Sampaio, C. S., Angelotti, J. A. F., Fernandez-Lafuente, R., & Hirata, D. B. (2022). Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *215*, 434-449. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.06.139

Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, *34*(1), 5-28. https://doi.org/10.1002/BTPR.2581

Selvaraj, C., Rudhra, O., Alothaim, A. S., Alkhanani, M., & Singh, S. K. (2022). Structure and chemistry of enzymatic active sites that play a role in the switch and conformation mechanism. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, *130*, 59-83. https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2022.02.002

Souza, J. E. da S., Oliveira, G. P. de, Alexandre, J. Y. N. H., Neto, J. G. L., Sales, M. B., Junior, P. G. de S., Oliveira, A. L. B. de, Souza, M. C. M. de, & Santos, J. C. S. dos. (2022). A Comprehensive Review on the Use of Metal–Organic Frameworks (MOFs) Coupled with Enzymes as Biosensors. *Electrochem 2022, Vol. 3, Pages 89-113*, *3*(1), 89-113. https://doi.org/10.3390/ELECTROCHEM3010006

Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., & Frąc, M. (2021). Various Perspectives on Microbial Lipase Production Using Agri-Food Waste and Renewable Products. *Agriculture 2021, Vol. 11, Page 540*, *11*(6), 540. https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11060540

Tan, Z., Chen, G., Ma, X., Ge, F., Zhao, Y., Li, A., Hu, L., Ren, S., Zhu, C., You, Q., Zhou, J., & Shi, H. (2024). Carbon-based magnetic nano-particle utilizing nano-biochar as core and its immobilizing lipase for biodiesel preparation. *Industrial Crops and Products*, *222*, 119693. https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2024.119693

Wang, Z., He, Q., Liu, Y., Yu, C., Zhang, X. F., & Kong, X. (2025). Amino functionalized zeolitic imidazolate framework-8 coated cellulose aerogel for enhanced air purification. *Separation and Purification Technology*, *355*, 129741. https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2024.129741

Yan, R., Yang, D., Zhang, N., Zhao, Q., Liu, B., Xiang, W., Sun, Z., Xu, R., Zhang, M., & Hu, W. (2018). Performance of UV curable lignin based epoxy acrylate coatings. *Progress in Organic Coatings*, *116*, 83-89. https://doi.org/10.1016/J.PORGCOAT.2017.11.011

Zhao, D., Chen, J., Hu, X., & Zhang, S. (2023). Catalytic Antibodies: Design, Expression, and Their Applications in Medicine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *195*(2), 1514. https://doi.org/10.1007/S12010-022-04183-1

Zheng, X., Hao, X., Wang, Y., Gao, S., Wen, D., & Wang, J. (2024). Zr-based MOF as a support for lipase immobilization to enhance enzymatic transesterification for biodiesel production. *Molecular Catalysis*, *569*, 114603. https://doi.org/10.1016/J.MCAT.2024.114603

Zou, D., Liu, D., & Zhang, J. (2018). From Zeolitic Imidazolate Framework-8 to Metal-Organic Frameworks (MOFs): Representative Substance for the General Study of Pioneering MOF Applications. *Energy & Environmental Materials*, *1*(4), 209-220. https://doi.org/10.1002/EEM2.12018

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad-Soyad: Merve Betül ARSLAN

Eğitim

Yüksek Lisans: Marmara Üniversitesi, Biyokimya

Lisans: Marmara Üniversitesi, Kimya

Sunum

"IMMOBILIZATION OF LIPASE ONTO MOF-BASED FILM," *IX. INTERNATIONAL HEALTH, ENGINEERING AND SCIENCES CONGRESS*, Ankara, Turkey, pp.245-246, 2024