



Gıda endüstrisinde immobilize enzim uygulamaları Application of immobilized enzymes in the food industry

Beyza Türköz^{1,*}, Ayşe Özçelik², Erkan Karacabey³

^{1,2,3} Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Öz

İmmobilizasyon terimi, hareketi sınırlama veya hareket edemez hale getirmek anlamına gelmektedir. Uygulamalarda, enzimler genellikle inert ve çözünmez taşıyıcılar üzerinde immobilize edilmektedir. Bu uygulama, çoklu yeniden kullanılabilirlik nedeniyle enzimlerin etkinliklerini artırmaktadır. Immobilize enzimler, belirli bir alanda hapsedilmiş ancak katalitik aktiviteleri korunan enzimleri ifade etmektedir. Immobilize enzimlerin özellikleri immobilizasyon yöntemine ve taşıyıcı tipine bağlıdır. Immobilize enzimlerin; laktozsuz süt üretimi, meyve suyunda acılığının giderilmesi, yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMS) üretimi gibi birçok alanda gıda sektöründe uygulaması mevcuttur. Bu derlemede, öncelikle gıda endüstrisine odaklanarak, immobilize enzimlerin elde edilme yöntemleri ve çeşitli taşıyıcı malzemelerine genel bir bakış açısı sunmak amaçlanmıştır. Ayrıca mevcut immobilize enzim uygulamaları gıda endüstrisi merkez alınarak değerlendirilmiştir. Derleme çalışması immobilize enzim teknolojisinin anlaşılması, bugünü ve geleceğinin değerlendirilmesine ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: İmmobilizasyon, Taşıyıcı Malzemeler, Gıda endüstrisi, Enzim aktivitesi

1 Giriş

Enzimler, canlıların yaşamını sürdürebilmesi için vazgeçilmez biyokatalizörlerdir. Enzimlerin doğal biyokatalizörler olarak en önemli rollerinden biri, bir hücre içindeki hemen hemen tüm kimyasal reaksiyonların hızını artırma kapasiteleridir. Enzimler, katalize ettikleri reaksiyonlar boyunca değişime uğramadan veya tüketilmeden kimyasal reaksiyonların hızlarını arttırmaktadırlar [1].

Endüstriyel uygulamalarda geniş bir alana sahip olan enzimlerin, işlem koşullarına olan hassasiyeti, stabiliteilerinin ve katalitik aktivitelerinin düşüklüğü büyük ölçekli uygulamaların geliştirilmesi için engel olarak görülmektedir. Kataliz sistemlerinde, çoğu enzim suda erimiş halde çalıştığından dolayı yeniden kullanım için reaksiyon karışımından enzimin geri kazanılması mümkün olmamaktadır. Aynı zamanda enzimlerin ürün elde edildikten sonra ekonomik olarak geri kazanılamaması ve pahalı olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır [2-4].

Bu nedenle enzimlerin ekonomik açıdan tekrarlı kullanımını ve bahsi geçen problemlerin aşılmasını

Abstract

The term immobilization refers to limiting movement or rendering something immovable. Enzymes are frequently immobilized on inert and insoluble carriers in practical applications. This application enhances the activities of enzymes due to their multiple reusability. Immobilized enzymes refer to enzymes confined to a specific area while retaining their catalytic activities. The type of carrier and the immobilization process affect the characteristics of the immobilized enzyme. Immobilized enzymes find applications in the food industry in various areas such as lactose-free milk production, reduction of bitterness in fruit juice, and production of high fructose corn syrup (HFCS). This review aims to provide an overview of methods for obtaining immobilized enzymes and various carrier materials, primarily focusing on the food industry. Additionally, existing applications of immobilized enzymes are evaluated with a focus on the food industry. This review work will shed light on understanding immobilized enzyme technology and assessing its present and future prospects.

Keywords: Immobilization, Carrier materials, Food industry, Enzyme activity

sağlamak için birtakım teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklere “immobilizasyon” denilmektedir. İmmobilizasyon, enzimin çözünmeyen bir taşıyıcı üzerine kovalent olarak bağlanması veya adsorbe edilmesi olarak tanımlanmaktadır [3,5]. Bir enzimin immobilizasyonu, o enzimin seçiciliği, kararlılığı ve kinetiği ile taşıyıcının fiziksel ve kimyasal özelliklerini, birincil rolü biyokatalizörün hem fiziksel hem de enzimatik kararlılığını maksimize eden özel bir formülasyonda birleştirmek anlamına gelmektedir [6].

Enzim immobilizasyonu ile enzimlerin çevresel değişimlere karşı direnci, pH, termal belirgin stabilite, sıcaklık gibi özellikleri gelişmektedir [4,7,8]. Immobilize edilmiş enzimlerin, yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücüler varlığında stabilitelerinde gelişme görülmektedir [4,5]. Enzim immobilizasyonunda temel amaç, düşük sentez maliyeti ve uygun yüksek bağlama kapasitesi içeren taşıyıcı kullanılarak enzimin katalizini mümkün olduğunca maksimum seviyeye ulaştırmaktır [7].

Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler fiziksel ve kimyasal olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Fiziksel

* Sorumlu yazar / Corresponding author, e-posta / e-mail: beyzatr61@gmail.com (B. Türköz)

Geliş / Received: 21.05.2024 Kabul / Accepted: 26.06.2024 Yayımlanma / Published: 15.07.2024

doi: 10.28948/ngumuh.1487845

yöntemlerde enzim ve taşıyıcı arasında zayıf etkileşimler oluşurken, kimyasal yöntemlerde güçlü etkileşimler gözlenmektedir [9]. Enzim adsorpsiyon yöntemi; basit, düşük maliyetli ve enzimi en az tahrip eden etkilerinden dolayı sıklıkla tercih edilen yöntemdir [10,11].

İmmobilize enzimin stabilitesi; bağlanma konumu, taşıyıcı ile enzimin etkileşimi ve konformasyonel değişimi gibi faktörlerden etkilenmektedir. İmmobilize enzimin bulunduğu mikro-ortam, taşıyıcının kimyasal ve fiziksel yapısı, enzimin immobilize edildiği koşullar ve enzimi taşıyıcıya bağlayan ajanın özellikleri enzimin aktivite ve stabilitesinde azalma ya da artışa yol açabilmektedir [5,7,8]. Seçilen taşıyıcı malzemenin, düşük maliyetli olmasının yanı sıra enzimatik reaksiyonlar için difüzyonla substratın ve ürünün geçişinde kolaylık ve geniş yüzey alanı sağlaması önem arz etmektedir [3].

Derlemede; çeşitli immobilize enzimlere, enzim immobilizasyon yöntemlerine, kullanılan taşıyıcı malzemelere ve gıda endüstrisinde kullanım alanlarına genel bir bakış sunmak amaçlanmaktadır. Bu çalışmanın farkı, immobilize enzimlerin daha detaylı incelenmesi ve gıda sektöründe kullanımına daha geniş bir perspektiften yaklaşmasıdır. Ayrıca son dönemde gıda alanında yapılan bazı çalışmaları da içermektedir.

2 İmmobilizasyonun avantajları

İmmobilizasyon yönteminin kullanılması endüstriyel uygulamalarda birçok avantaj sağlamaktadır. Bunlardan en önemlisi enzimlerin tekrar kullanılmasıdır [12–14]. Sektör ekonomik açıdan, enzimin yeniden kullanılmasına ve stabilitesindeki gelişmelere önem vermektedir [15,16].

Enzim immobilizasyonu ile belirli bir substrata karşı enzim aktivitesinde geri kazanımlar sağlanabilmektedir. Ayrıca, enzimin yapısındaki iyileştirilmiş stabilitesi enzim özelliğini ve seçiciliğini arttırabilmektedir [14,17].

İmmobilizasyon yönteminin kullanımı ile enzimin üründen kolaylıkla ayrılması ve kontrollü ürün oluşumu sağlanmaktadır. Nihayetinde immobilizasyon ile enzim uygulamaları zahmetsiz hale getirilerek güvenilir ve verimli reaksiyona olanak sağlanmaktadır [10].

Ek olarak immobilizasyonun, enzim inhibisyonunu azalttığı ve enzimi diğer kirleticilerden arındırmada ve ürün kontaminasyonunu engellemede başarılı olduğu belirtilmektedir [18]. Bahsi geçen avantajları ile enzim immobilizasyonu daha yüksek biyokatalizör verimliliği ve birtakım reaksiyonların gerçekleşmesi için olanak sağlamaktadır [10,14].

3 İmmobilizasyon yöntemleri

Yöntem seçimine bağlı olarak, bir enzimin immobilizasyondan sonra kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişiklikler olacağına bilmek önemlidir [19,20]. Taşıyıcı matrisin ve kendi etkilerinin ürünlerinin onlara dayattığı mikro çevre değişikliklerinin, enzimlerin kararlılığını ve aynı zamanda kinetik özelliklerini değiştirdiği yapılan çalışmalarda da ortaya konmuştur [21,22]. Enzimin immobilize edildiği yüzeyin, elektron geçiş kompleksleri oluşturmak veya matris ile hidrojen/kovalent bağlar kurmak enzimin üçüncül yapısını korumak gibi birkaç temel role sahip olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, bir enzimi bir

yüzey üzerinde immobilize ederken göz önünde bulundurulması gereken temel husus, matris yüzeyindeki reaktif gruplar ile enzimin substrat bağlanma bölgesi dışında kalan bölgelerle arasında uygun bir bağlanma yönteminin seçilmesini esas almaktır [20,23].

Enzim immobilizasyon yöntemleri, fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Fiziksel yöntemler; adsorpsiyon, kapsülleme ve sınırlandırma olarak kimyasal yöntemler; kovalent bağlama ve çapraz bağlama olarak sınıflandırılmaktadır [4,9]. Şekil 1'de çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi verilmektedir.

3.1 Fiziksel yöntemler

3.1.1 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon yönteminde enzimler bir taşıyıcı üzerinde Van der Waals bağları, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları veya iyonik bağlar vasıtasıyla immobilize edilmektedir [24,25]. Emilim süreci basit, düşük maliyetlidir. Bu yöntemi tamamlamak için yalnızca iki adım gerekmektedir. Bu adımlar, enzimin ilk olarak taşıyıcının yüzeyinden difüzyonu ve daha sonra taşıyıcıya bağlanması (adsorpsiyon) şeklindedir [24–26].

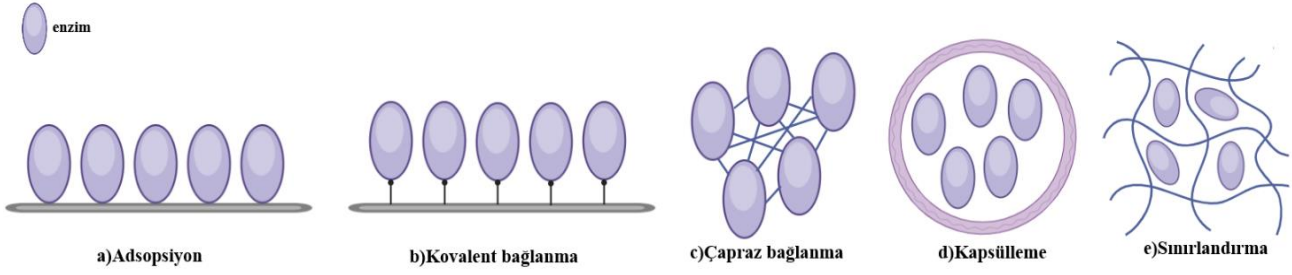
Enzimlerin taşıyıcı matrisleri üzerine adsorpsiyonu, belirli bir inkübasyon süresinde gerçekleşmektedir. Bu yöntemde, enzim immobilizasyonu için ilave birleştirme ajanları ve modifikasyon adımları gerekmez ve taşıyıcı matrisleri yeniden oluşturulabilir [25]. Ayrıca bu yöntemde immobilizasyon kendiliğinden gerçekleşmektedir. Bu nedenle enzimin yapısında çok az veya hiç değişiklik olmaz ve katalitik aktivitesi etkilenmez [24].

Fiziksel bir süreç olduğu için, enzim ve taşıyıcı arasındaki etkileşimler, ortamın iyonik gücündeki değişiklikler, pH, sıcaklık, reaktör akış hızı, ajitasyon ve partikül çarpışmalarından etkilenmektedir. Bunun sonucunda matriksten enzim salınımı görülebilmektedir. Bu etkileri azaltmak için gözenek boyutunun küçültülmesi ve taşıyıcının gözenekleri içinde enzimatik çapraz bağlanma gibi bazı taşıyıcı değişikliklerin yapılması mümkündür [25–27].

3.1.2 Sınırlandırma ve kapsülleme

Sınırlandırma, enzimlerin düşük maliyetli polimerik ağlarda tutulduğu (hapsedildiği) bir immobilizasyon yöntemi olarak açıklanmaktadır. Bu, enzimlerin bir arada toplanmasını önlemek için pratik bir strateji olarak da görülmektedir [25,28]. Bu süreçte gözenekli matris genellikle immobilize edilecek biyokatalizörün etrafında oluşur. Polimerizasyon ilerledikçe, polimer matrisi enzimi sararak kendi yapısı içinde hapseder, substratlar ve ürünler taşıyıcı matrisi boyunca yayılırken enzimler matris içerisinde hareketsiz kalır [29].

Kapsülleme yönteminde enzimler ağlarda tutulurken, substratların ve ürünlerin geçmesine izin verilir. Bu da enzimlerin kapsül dışına salınımını sınırlarken, stabilizeyi arttıracak ve enzimatik reaksiyonların oluşmasına izin vermeyecektir [30].



Şekil 1. İmmobilizasyon yöntemleri

Bu yöntemde, enzimin reaksiyon ortamı ile doğrudan teması bulunmamaktadır. Böylece ortamda oluşabilecek inaktivasyon kısmen engellenmektedir. İlave, yöntem enzimlerin nispeten uzun süre stabil kalmasına olanak sağlamaktadır [28].

Kapsülleme ve sınırlandırma gibi kapalı alanda immobilizasyon yöntemlerinin düşük maliyetli olmalarının yanı sıra basit ve hızlı oldukları da söylenebilir. Kapalı alanda immobilizasyon yöntemleri küçük ölçekler için daha elverişlidir. Ayrıca, bu iki immobilizasyon yönteminin temel sorunu; taşıyıcı matrisinin gözenek boyutlarının kontrol edilmesidir. Gözenek boyutlarındaki yetersizlikler enzimlerin sızmasına ve/veya taşıyıcı matris içindeki substratların ve ürünlerin difüzyonunu hızlandırmada sınırlamalara yol açabilmektedir [28]. Alternatif olarak, kapsülleme ve sınırlandırma yöntemlerinin enzimin desteğe daha iyi bağlanmasına izin veren kovalent bağlanma gibi diğer yöntemlerle birlikte kullanılması önerilmektedir [31].

3.2 Kimyasal metotlar

3.2.1 Kovalent bağlanma

Kovalent bağlanmanın prensibi atomlar arasında elektron çifti kullanımına dayanmaktadır. Enzimlerin taşıyıcı malzemenin yüzeyine kovalent bağlanması “doğrudan” bağlanma olarak adlandırılmaktadır [32]. Ancak yüzeylerde kovalent bağ oluşturan reaktif gruplar genellikle taşıyıcı malzemelerde bulunmamaktadır. Bu nedenle ilk aşamada, taşıyıcı malzeme yüzeyine reaktif grupların eklenmesiyle taşıyıcı aktive edilmektedir. İkinci aşamada ise aktive edilmiş taşıyıcı materyal üzerine enzim bağlanması gerçekleştirilmektedir [33].

Güçlü bir kimyasal bağ olduğu için enzimin desteğe iyi tutunmasını sağlayarak yapısında bir rijitlik (sertlik) sağlamakta ve enzimin yapısını ısı, organik çözücüler, pH gibi denatüre edici etkilere karşı değiştirmeden koruyabilmektedir [33,34].

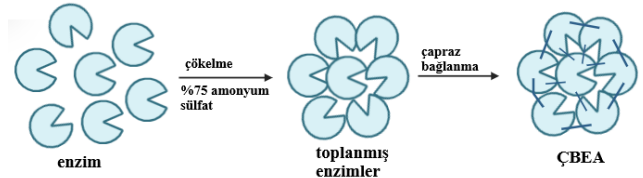
Enzim-taşıyıcı bağlanmasında taşıyıcının aktive edilmesi gerekmektedir. Bunun için enzim ve taşıyıcı arasında bir reaktif kullanılmaktadır. Ara madde olarak adlandırılan reaktif, taşıyıcıyı aktif etmenin yanı sıra enzime serbestçe salınma yeteneği sağlamaktadır. Dolayısıyla enzim daha yüksek katalitik aktivite göstermektedir [35]. En sık kullanılan ara madde glutaraldehitir. Glutaraldehit kovalent bağı sağlayan, etkileşimin sertliğini koruyan ve amid oluşturulan enzimin amino grubu ile aynı anda etkileşime girebilen aldehit gruplarına sahiptir [24].

3.2.2 Çapraz bağlanma

Çapraz bağlama, enzimin bağlanması için taşıyıcı gerektirmeyen, enzimlerin stabilitesini arttırmak için kullanılan bir enzimatik immobilizasyon yöntemidir. İmmobilizasyon işlemi, bir reaktif (ara madde) kullanılarak çözünmüş enzimin yüzeyinde bulunan belirli amino asit grupları ile molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar oluşması şeklinde gerçekleşmektedir [36].

Çapraz bağlama ajanları, enzimin yüzeyinde bulunan amino asitlerle spesifik bir kovalent bağ oluşturabilen fonksiyonel gruplara sahip moleküller olarak tanımlanmaktadır [37]. Çapraz bağlama ajanlarının ana işlevi, enzimi dış ortamdan korumaktır [36]. Bu amaçla, kovalent bağlarla enzimler, yeniden kullanılabilirliği ve stabiliteyi geliştirmek için sıkça immobilize edilmektedir. Sonunda yüksek molekül ve suda çözünmez bir enzim örgüsü oluşmaktadır [25].

En çok tercih edilen çapraz bağlama yöntemleri, kristalleştirme, atomizasyon ve agregasyon yoluyla elde edilen enzimlerden yapılanlardır. Bu enzimlerin immobilizasyonu, çapraz bağlama maddesi içeren ortamda gerçekleşmektedir. Çapraz bağlı enzim agregatı (ÇBEA) şu anda üzerinde en çok çalışılan çapraz bağlama türüdür. Çapraz bağlı enzim agregatlarını (Şekil 2) sentezlemek için enzimler birbirine çapraz bağlanır. ÇBEA'ların hazırlanması için, çökeltiler önce enzim agregasyonu için kullanılmalı, ardından iki işlevli reaktifler kullanılarak agrega enzimler birbirine çapraz bağlanmalıdır. Agregasyondan sonra, enzim aktif bölgeleri ve katalitik aktiviteler korunmaktadır [11].



Şekil 2. Çapraz bağlı enzim agregatlarının oluşumu

Çapraz bağlanan enzimlerin ana avantajları, yüksek enzimatik aktivite, stabilite ve katı desteğin hariç tutulması nedeniyle düşük üretim maliyetidir. Çok yönlü bir proses olmasının yanı sıra endüstriyel uygulamalar için daha sağlam ve stabil enzimler elde etmeyi de mümkün kılmaktadır

[19,24,38]. Tablo 1’de yukarıda bahsedilen immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları özetlenmiştir.

Enzim immobilizasyonunun temel yöntemleri yukarıda bahsedildiği gibi birkaç farklı yöntem olarak kategorize edilse de bu orijinal yöntemlerin kombinasyonlarına dayanan yüzlerce varyasyon geliştirilmiştir [39].

4 İmmobilizasyon taşıyıcı seçimi

Matrisin özellikleri, immobilize enzim sistemi performansının belirlenmesinde önemli bir parametredir. İdeal taşıyıcı özellikleri; sıkıştırmaya karşı fiziksel direnç, hidrofiliklik, enzimlere karşı inertlik, biyouyumluluk, mikrobiyal saldırıya karşı direnç ve düşük maliyetli erişilebilirliği içermelidir [40]. Selüloz, aljinat, kitin, kollajen, kitosan, nişasta, pektin gibi çeşitli doğal polimerler taşıyıcı malzeme olarak kullanılmaktadır [39]. Ayrıca, doğal polimerler dışında çeşitli sentetik polimerik malzemeler de iyi mekanik stabiliteye sahip oldukları ve kolayca modifiye edilebildikleri için taşıyıcı olarak değerlendirilmektedir [41]. Alümina, silika, zeolitler ve gözenekli silikalar gibi çeşitli inorganik taşıyıcılarda enzimlerin immobilizasyonu için tercih edilmektedir [39].

Doğru taşıyıcı ve immobilizasyon yönteminin seçilmesi endüstriyel uygulamalarda önem arz etmektedir. Taşıyıcının türü; enzimlerin depolama stabilitesi, enzim aktivitesi, sıcaklık ve optimum pH aralığı üzerinde etki göstermektedir.

Taşıyıcılardan biri enzim aktivitesinin birkaç gün devam etmesine izin verirken, diğeri sadece birkaç saat aktivitenin korunmasını sağlayabilir [42–46].

Bu bölümde yaygın olarak kullanılan taşıyıcı malzemeler, organik ve inorganik olmak üzere iki grup altında sınıflandırılarak açıklanmaktadır.

4.1 Organik taşıyıcılar

4.1.1 Biyopolimerler

Enzim immobilizasyonuna yönelik taşıyıcılar arasında biyopolimer organik taşıyıcılar destek yüzeyinde enzim immobilizasyonu için olanak sağlayan birçok serbest reaktif hidroksil ve amino grubuna sahiptir [47–49]. Özellikle suda çözünmeyen polisakkaritlerin; nişasta, agaroz, karragenanlar ve kitosan gibi biyopolimerlerin [50]; biyo-işlevsellik, biyouyumluluk, biyo-kararlılık ve biyo-bozunurluk dahil olmak üzere “biyo” özelliklerinden dolayı birtakım avantajları mevcuttur [51].

Bunun yanı sıra biyopolimerler, yüksek yapısal ve kimyasal çeşitliliğe, ekstrem olmayan sentez koşullarına da sahiptir [4,52]. Ek olarak biyopolimerler düşük konsantrasyonda bile yüksek jel kuvvetine sahip, inert sulu jeller oluşturur [50].

4.1.2 Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, doğada çözünmeyen ve gözenekli bir yüzeye sahip olan iyon değiştirici reçinelerdir [26]. Enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan sentetik polimerlerden Eupergit® C veya Sepabead® EC-EP akrilik reçinelerdir [53].

Sentetik polimerler, gözenekli yapılarından dolayı enzimi çok güçlü bir şekilde bağlayabilmektedir.

Tablo 1. İmmobilizasyon yöntemlerinin değerlendirilmesi

Yöntemler	Avantajlar	Dezavantajlar	Kaynak
Adsorpsiyon	Uygulaması kolay ve kısa sürelidir, Nispeten ucuzdur, Reaktif gerektirmez, Gözenek difüzyon sınırlaması yoktur, Minimum aktivasyon adımları içerir, Enzimler için kimyasal yöntemlere (kovalent ve çapraz bağlanma) göre daha az bozucudur.	Düşük verim elde edilir, Bölünme veya difüzyon olayları nedeniyle kinetiğin bozulması ve bu durumun enzimin pH stabilitesini veya pH optimumunu değişimi gözlenir, Enzimlerin taşıyıcıdan desorpsiyonu gerçekleşir.	[4,5,24–27]
Kovalent Bağlanma	Daha geniş uygulanabilirlik gösterir, Nispeten basit yöntemdir, Çeşitli taşıyıcılar mevcuttur, Taşıyıcılara enzimlerin güçlü bağlantısı vardır, Taşıyıcılardan çok işlevli grup mevcuttur, Sızıntı veya desorpsiyon yoktur.	Rekabetçi inhibisyon sorunları içerir, Enzimlerin kimyasal modifikasyonu ve fonksiyonel konformasyon kaybı gerçekleşir.	[4,5,33–35]
Sınırlandırma	Hızlı immobilizasyon yöntemidir, Algılama uygulamaları için kullanılabilir, Düşük maliyetli matrisler mevcuttur, Daha az konformasyonel değişiklik gerçekleşir, Küçük ölçeklerde uygulaması kolaydır.	Mikrobiyal kontaminasyon olasılığı vardır, Enzim sızıntısı ve gözenek difüzyon sınırlamaları mevcuttur, Düşük endüstriyel uygulama seviyeleri ve küçük ölçekli operasyonlarla sınırlıdır.	[5,28,30]
Enkapsülasyon	Uygun maliyetlidir, Enzimler uzun vadede stabildir, Ekstraksiyon/saflaştırma adımları gerektirmez, Çoklu enzimlerin "tek kaptan" immobilizasyonu gerçekleşir, Enzimlerin doğal yapısı en iyi şekilde korunur, Hücre organelleri, örneğin mitokondri immobilize edilebilir.	Daha düşük enzim konsantrasyonları içerir, Son ürünlerin diğer enzimler tarafından değiştirilir, Gözenek boyutu sınırlıdır, İstenmeyen ürünler oluşabilir.	[5,28,30]
Çapraz Bağlanma	Matris veya taşıyıcı içermez, nispeten basit bir yöntemdir, Endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır, Hızlı ve ucuzdur, Aynı anda büyük miktarda enzim çapraz bağlanabilir.	Çapraz bağlayıcılar tarafından denatürasyon veya yapısal modifikasyon gerçekleşir, Çok işlevli reaktifler (glutaraldehit) gereklidir.	[4,5,19,20,24,36,38]

Bu tür malzemeler, mevcudiyet, rejenerasyon kolaylığı ve mikroorganizmalara karşı matris direnci ile karakterize edilmektedir [26]. Ek olarak, geniş pH aralığında hem kimyasal hem de mekanik olarak oldukça hidrofilik ve stabildirler. Hidrofilik reçinelerin önemli bir dezavantajı, difüzyon sınırlamalarıdır [53].

4.2 İnorganik taşıyıcılar

4.2.1 İnorganik sol-jel malzemeler

İnorganik malzemelerin immobilizasyonu, sol-jel yoğunlaştırma işlemi ile enzime tutunması şeklinde gerçekleşmektedir [54]. Immobilizasyon işleminde taşıyıcı olarak kullanılan inorganik sol-jel malzemeler; metal oksitler, silika ve organosiloksandır [55]. Bu matrisler; hazırlama basitliği, optik şeffaflık, mekanik, kimyasal ve termal direnç gibi özelliklere sahiptir.

Sol-jel teknolojisi, nanokompozit malzeme elde etmenin drenajsız bir yöntemi olmakla birlikte çevre açısından da güvenilirliği bulunmaktadır. Hammade olarak kullanılan bileşikler nihai ürünü safsızlıklarla kirletmediğinden, bu yöntem çok sayıda tekrardan oluşan yıkama adımına ihtiyaç duymaktadır [56]. Sol-Jel matrislerinin, enzimlerin konformasyonel hareketliliğinin ve katalitik özelliklerinin nerdeyse tamamen korunması ve daha uzun bir biyokatalizör yarı ömrü sağlaması gibi önemli avantajları da bulunmaktadır [57].

4.2.2 Gözenekli seramik

Silika bazlı malzemeler gözenekli yapılar oluşturma yeteneğine sahiptir [58]. Alüminyum oksit, zirkonyum oksit, silisyum oksit ve titanyum dioksit gibi gözenekli membranlar yüksek mekanik ve kimyasal kararlılığa sahip malzemelerdir. Bu tür malzemeler, gözenekli yapıları ve mikro kanalların varlığı nedeniyle hacim birimi başına geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır [59].

Gözenekli malzemelerin yüksek gözenek yoğunluğu, düşük maliyet ve organik çözücülere karşı direnç gibi özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonu için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [60,61]. Ayrıca bu malzemeler, gözenekli yapıları sebebiyle geniş yüzey alanı sağlamaktadır [62]. Bu gözenekli yapılar mikrobiyolojik saldırılara karşı enzim moleküllerini korumaktadır. Fakat gözenekli yapıların çokluğu kırılma ve gözeneklerin tıkanması durumunda katalitik etkinin azalmasına sebep olmaktadır [63].

4.2.3 Hibritler

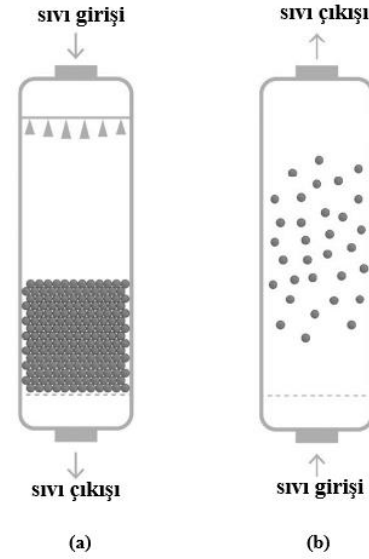
Organik-inorganik malzemeler içeren hibrit taşıyıcılar, enzim immobilizasyonu için alternatif sistemler olarak kullanılmaktadır [64]. Bu malzemeler taşıyıcıya uygun bir mikro ortamda mukavemet, elastikiyet, esneklik ve kimyasal bağlanma gibi mekanik özellikleri artıran yeni özellikler sağlamaktadır. Esneklik ve kolay şekil alabilme özelliklerini inorganik malzemedan, ısı stabilitesi ve kimyasal direnç gibi özellikleri ise organik malzemedan almaktadır [65].

Enzim immobilizasyonu için inorganik-organik kompozitlerin uygulanması, enzimlerin sık kullanımında daha yüksek aktivite ve stabilite sağlamaktadır [66].

5 Gıda endüstrinde immobilize enzim içeren biyokataliz reaksiyonları için kullanılan tipik reaktörler

İmmobilize enzimler hem kesikli hem de sürekli işlemlerde kullanılma avantajına sahiptir [22]. Gıda endüstrisinde, immobilize enzimlerle kullanılacak reaktör seçimi söz konusu olduğunda, Şekil 3'te gösterildiği gibi iki seçenek mevcuttur. Çözünür enzimlerin kullanıldığı sistemlerde proses kurulumu, immobilize enzimlerin kullanıldığı sistemlerde göre daha karmaşıktır. İmmobilize enzimler prosesin basitleştirilmesine olanak sağlamaktadır [6].

Dolgulu yataklı kolon reaktörleri (Şekil 3(a)), gıda ve kimya endüstrisi tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Gıda endüstrisinde tatlandırıcı gibi ürünlerin üretimi bu sistemlerde gerçekleştirilmektedir. Çok yüksek hacimlerde ürün üretilebilen ve zaman içerisinde verimliliğin önemli olduğu sistemlerdir. Büyük hacimli, fiyata duyarlı ürünler için dolgulu yataklı reaktörler kullanılırken proses üretkenliği ve maliyet önem arz etmektedir. Sürekli çalışması için gereken vana düzeni, gerekli hat içi kontroller ve yüksek basınçlara dayanıklılık göz önüne alındığında, reaktörler bu durumda oldukça büyük bir yatırım olarak görülmektedir [6,67].



Şekil 3. Gıda endüstrinde immobilize enzimlerle kullanılacak reaktör tipleri [6]

Dolgulu yataklı reaktörlere bir alternatif, akışkan yataklı reaktörlerdir (Şekil 3(b)). Yağlar gibi oldukça viskoz ürünler işlendiğinde ve immobilize enzim partikülleri, substratın yukarı akışı ile süspansiyon halinde tutulduğu sistemlerde tercih edilebilir [6,67].

Biyokatalizörlerin tasarlanmasında; reaksiyon sıcaklığı, substrat miktarı, immobilize enzim miktarı ve immobilize enzimlerin değiştirilmesi önemli parametrelerdir [6,13,14,67]. Reaksiyon sıcaklığının kinetik üzerinde önemli

etkisi bulunmaktadır. İmmobilize enzimler çözünür enzimlere kıyasla daha kararlı ve yüksek sıcaklıklarda çalışabilmektedir. Bu sistemlerde kullanılan immobilize enzim miktarı maliyeti etkileyen önemli bir faktördür.

Kesikli modda veya akışkan modda tipik endüstriyel yöntemlerde immobilize enzim toplam hacminin %3-10'unda (a/h) yürütülmektedir. Maliyeti etkileyen bir diğer etken substrat miktarıdır. Biyokatalizli bir reaksiyona birden fazla substrat dahil olduğunda, hedef eş molar konsantrasyonlarda çalışmak olmaktadır. Çünkü bu aşağı akış prosesi sırasında maliyetleri önemli ölçüde etkilemektedir [13].

İmmobilize enzimlerin uzun reaksiyon sürelerinden sonra değiştirilmesi, maliyetleri önemli düzeyde etkileyen diğer bir parametredir. Genel olarak endüstri, kalıntı aktivite başlangıç aktivitesinin %10-50'u arasında olduğunda immobilize enzimi değiştirmektedir. Dolgulu kolon işlemleri kullanılırken, kolonun ön ucunu kısmen taze enzimle değiştirip, böylece kolonun çalışma ömrünü uzatmak da bir çözüm olarak görülmektedir [13].

6 İmmobilize enzimlerin gıda endüstrisinde kullanımı

İmmobilize enzimler, tatlandırıcılar, şuruplar, şekerlemeler, sütlü gıdalar, alkollü ve meyve içecekleri, unlu mamuller için mayalar, peynir altı suyu laktoz hidrolizatları dahil olmak üzere çeşitli ürün imalatında gıda endüstrisinde geniş kullanım alanına sahiptir [39]. Ek olarak çeşitli bileşenlerin içeriğini belirlemek ve ürünlerin kalitesini kontrol etmek için biyosensör olarak da kullanılmaktadır [68]. Bunların dışında, raf ömrünü uzatmak ve paketlenmiş gıda kalitesini iyileştirmek için perspektif uygulama olan gıda ambalajlarında kullanımı mevcuttur [69]. Gıda endüstrisinde immobilize enzimlerin hem sürekli hem kesikli proseslerde uygulanabilmesi çözünür enzimlere göre oldukça avantajlıdır [70]. Tablo 2'de, gıda bileşenlerinin endüstriyel üretimi için kullanılan bazı örnek immobilize enzimler ve uygulama alanları verilmiştir.

6.1 Süt teknolojisi

Son yıllarda laktaz enzimi süt endüstrisinde önem arz etmektedir. Laktaz (β -galaktosidaz), laktozun glikoz ve galaktoza hidrolizinden sorumlu olan enzimdir. Laktaz enzimi eksikliği olan insanlar süt ürünlerindeki laktozu sindiremedikleri için "laktoz intoleransı" olarak isimlendirilen sağlık sorunuyla karşı karşıya kalmaktadırlar [4].

Laktaz enzimi ile süt ürünlerinde bulunan laktozun parçalanması sağlanmaktadır. Nihayetinde, laktoz içeriği düşük veya laktoz içermeyen ürünler üretilmektedir. Bu ürünler laktoz intoleransı olan bireyler tarafından rahatlıkla tüketilebilmektedir [22,71].

Laktaz enzimi çözünür formda tam yağlı süte eklendiğinde laktozu monomerleri olan glikoz ve galaktoza hidrolize eder ve enzimatik hidroliz tamamlandıktan sonra enzim ısı ile işlemle (pastörizasyonla) devre dışı bırakılır. Bu işlem immobilize lipazın kullanılması ile de gerçekleştirilmektedir [72]. Yağsız sütün, immobilize edilmiş laktaz (β -galaktosidaz) ile hidroliz edilmesi ve sonrasında içeriğini ayarlamak için hidrolize süte tekrar yağ eklenmesi şeklinde uygulanmaktadır. Bu uygulama, çözünür enzim lavesine kıyasla, immobilize enzimi geri dönüştürme ve alerjen etkiye sahip ek bileşenlerin uzaklaştırılması avantajına sahiptir [22].

Normal süt, immobilize laktaz içeren kolondan geçirilir ve elde edilen süt, glikoz ve galaktoz gibi ürünlere parçalanarak laktoz hassasiyetine sahip insanlar tarafından tüketime hazır hale getirilmektedir. Laktoz hidrolizi şekerin tatlılığını ve çözünürlüğünü artırır. Bu biyokimyasal reaksiyon, farklı süt ürünlerinin hazırlanmasında kullanılabilir. Peynir altı suyu bazlı bir içecekte, laktozun hidrolize edildiği peynir altı suyu bileşen olarak kullanılabilir. Laktoz etanol üretmek için fermente edilebilir veya bir mayalama maddesi ve yem maddesi olarak kullanılabilir. Bu sayede ucuz olan yan ürün, oldukça besleyici ve kaliteli bir gıda maddesine dönüştürülebilir [73].

Tablo 2. Gıda endüstrisinde kullanılan immobilize enzimler ve uygulama alanları

Ürün	Uygulama alanı	İmmobilize enzim	Kaynak
Alüloz	Tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır.	3- epimeraz	[74]
C vitamin esteri	Lipit bakımından zengin gıdalarda antioksidan olarak kullanılmaktadır	<i>Candida antarctica</i> kaynaklı Lipaz B	[75]
-	Biranın soğumaya karşı korunmasında ve kazein hidrolizinde kullanılmaktadır.	Proteaz	[16,76]
Akrilamid/akrilik asit ve amonyak	Ürünlerdeki akrilamid içeriğini belirlemek amacıyla biyotestlerde kullanılmaktadır.	Akrilamidaz	[77]
Sükroz/glikoz ve fruktoz	Depolama sırasında çeşitli ürünlerin (reçel, şekerleme) şekerlenmesini önlemek için kullanılmaktadır.	β -fruktofuranosidaz (invertaz)	[78]
Üre/karbon dioksit ve amonyak	Sütün kalitesini kontrol etmek için biyotestlerde kullanılmaktadır.	Üreaz	[79]
Nişasta/oligosakkaritler	Şekerleme endüstrisinde, meyve suları üretiminde ve bira yapımında glikoz ve fruktoz çözeltilerinin üretiminde kullanılmaktadır.	Glukoamilaz	[39]
Trigliseritler	Kakao yağı eşdeğeri olarak kullanılmaktadır.	<i>Thermomyces lanuginosus</i> kaynaklı Lipaz B	[12]

İmmobilizasyon için en yaygın kullanılan laktaz, *Escherichia coli* ve *Aspergillus niger*'den elde edilmektedir [70]. Yapılan bir çalışmada, laktaz kitosan ve slika üzerine kovalent bağlanma ile immobilize edilmiş ve laktaz hidrolizi için kullanılmıştır. Sonucunda %62'ye varan yüksek oranda laktaz hidrolizi sağlanmıştır [80]. Farklı bir çalışmada; polizosiyanat (bir polimer) ile kaplanmış teflon karıştırma çubukları üzerinde immobilize edilen laktaz enziminin pH 8.75'e kadar kararlı olduğu tespit edilmiştir. Etkinlikte kayda değer kayıplar olmadan 137.6 saat boyunca sürekli olarak kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir [4,70].

1970'lerde İtalya'nın Snam Progetti işletmesinde, selüloz triasetat liflerinde tutulan *Saccharomyces lactis*'ten immobilize bir galaktosidaz geliştirmiş ve Centrale del Latte (İtalya) ve Snow Brand Milk Products (Japonya)'da %9'dan daha az enzim aktivite kaybıyla 50 döngü boyunca kullanıldığı rapor edilmiştir [6]. Başka bir benzer uygulamada, Sumitomo Chemical (Japonya), *Aspergillus oryzae*'den immobilize bir beta-galaktosidaz enzimini, polifenolik formaldehit (Duolit tipi reçineler) bazlı bir iyon değişim reçinesine kovalent olarak bağlanması ile geliştirmiş ve Avustralya'daki Drouin Kooperatif Tereyağı Fabrikası tarafından başarıyla kullanılmıştır [81]. Immobilize beta-galaktosidaz endüstride yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun nedeni çözünür enzime kıyasla özel bir süreç tasarlamaya ihtiyaç duyulmasıdır. Ayrıca, immobilize lipaz, süt ürünlerinde konjuge linoleik asit (KLA) oluşturmaktadır [82].

Akin vd. [83] üç farklı polimerde (k-karragenan, gellan ve sodyum aljinat) kapsüllenmiş lipazı, Türkiye'de, Akdeniz bölgesinde ve Balkan Yarımadası'nda yaygın olarak bulunan bir peynir olan kaşarın olgunlaşmasının hızlanmasında kullanmıştır. Immobilize enzimlerle işlenen peynirler, kontrole göre önemli ölçüde daha yüksek miktarlarda serbest yağ asitleri içermiş, bu da duyuşal özelliklerin artırılması için enzim ilavesinin olumlu etkisini kanıtlar nitelikte bulunmuştur. Duyuşal özelliklerdeki değişimler olgunlaşmanın ileri aşamalarında istenmeyen hale gelmiştir. Bunun nedenlerinden birisinin de ekşimede artışa yol açan aşırı lipoliz olabileceği ifade edilmektedir. Bu sonuçlar, pozitif duyuşal özelliklerin enzimlerin varlığından dolayı erken ortaya çıkması anlamında, olumlu bir durumu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, aşırı bozunmayı önlemek için olumsuz duyuşal özelliklere yol açan peynir bileşenlerinin salınımının daha kontrollü olması gerektiğini bildirmişlerdir.

Mikrobiyal kontaminasyon, sütün büyük ölçekli sürekli işlenmesinde önemli bir sorun olarak görülmektedir [14]. Bu sorunun üstesinden gelmek için birtakım yöntemler kullanılmaktadır. Yardımcı immobilizat kullanımı bunlardan birisidir. Uygulamada sonuç con A (Concanavalin A) kullanılarak glikoz oksidazın mikrobiyal hücre duvarına bağlanmasıyla elde edilmektedir [26]. Başka bir uygulama, laktosuz süt üretimi gerçekleştirilmeden önce, biyoreaktörün mikrobiyal büyümeyi önlemek için 10°C'de %10 gliserol çözeltisine daldırılmakta ve sanitasyon işlemi gerçekleştirilmektedir [84].

6.2 Meyve ve sebze teknolojisi

Turunçgil meyvelerinin birçoğunda naringin "ani" acılıktan, limonin ise "gecikmiş" acılıktan sorumludur [85]. İçerdiği naringin bileşeninden dolayı, üretilen meyve sularında depolama süresine bağlı olarak acılığın arttığı gözlenmektedir [86].

Narenciye meyvelerinde acılık, narenciye suyu endüstrisindeki en önemli sorunlardan birisi olarak görülmekte ve ekonomik anlamda önemli kayba neden olmaktadır. Narenciye sularındaki acılığı tüketici tarafından kabul edilebilirlik eşik seviyesinin altına düşürmek için bir dizi fizyokimyasal ve enzimatik işlem geliştirilmiştir [87]. Bunlardan birisi işlem sırasında immobilize enzim kullanmaktır.

Şekeroğlu vd. [88] basit adsorpsiyon yöntemini kullanarak naringinazın selit üzerinde immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Adsorbe edilmiş naringinazın aktivitesi, optimum koşullarda (enzim konsantrasyonu 0.1 mg·mL⁻¹, pH 3.5, sıcaklık 60°C ve süre 15 dk) %83 olarak bulunmuştur. Naringin hidrolizi için optimum reaksiyon koşullarında immobilize enzimin aktivitesi beşinci çalıştırmaya kadar takip edilmiştir. Immobilize naringinaz aktivitesi, ikinci kullanımdan sonra yaklaşık %68, üçüncü kullanımdan sonra yaklaşık %60 olarak rapor edilmiştir. İkinci kullanımdan sonra aktivitedeki gözlemlenen hızlı düşüşün nedeni, zayıf etkileşim ve sızmaya bağlanmıştır. Üçüncü kullanımdan sonra aktivitenin hemen hemen hiç değişmediği tespit edilmiştir.

Roitner vd. [89] naringini prunine dönüştürmek için naringinazın katı faz formunu gözenekli cam üzerinde immobilize etmiştir. İşlem, pH 12'de 0.1 M glisinol NaOH tamponunda gerçekleştirilmiştir, %98 oranında dönüşüm sağlanmıştır.

Turunçgil meyve sularının acılığını gidermek ve durultmak için kullanılan immobilize enzimlerin, çözünür enzimlere kıyasla birçok avantaj sunduğu görülmektedir. Biyokatalizörlerin immobilizasyonu ile enzimin tekrar kullanımındaki yüksek oran, reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılması, sürekli çalışması, işlenmiş ürünün kontaminasyonunun önlenmesi, daha yüksek enzim aktivitesi, depolama sırasında artan stabilite, daha geniş optimum sıcaklık ve kısa işlem süresi gibi birçok avantaja sahiptir [87].

Greylfurt suyunun acılığının giderilmesi üzerine yapılan bir çalışmada; lif ile sınırlandırılmış enzim, greylfurt suyunda naringini hidrolize etmek ve eş zamanlı olarak limonini parçalamak için kullanılmıştır. Greylfurt suyunun acılığı giderildiğinde; şeker bileşenleri, toplam organik asitler ve bulanıklık seviyeleri değişmeden kaldığı gözlenmiştir. Tespit edilebilir sızıntı olmadan 4°C'de depolama sırasında artan stabilite, daha geniş sıcaklık optimizasyonu ve daha kolay geri kazanım sağlamıştır. Ek olarak çözünür enzime kıyasla daha kısa (1 saat) acılık giderme süresi ile işlem tamamlanmıştır [90]. Farklı bir çalışmada, greylfurt suyunda naringin hidrolizi, k-karragenan boncuklarında immobilize naringinazın kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın (9–51°C) ve naringinaz konsantrasyonunun (0.29–1.7 g·L⁻¹)

bir fonksiyonu olarak k-karragenan boncuklarında immobilize edilmiş naringinaz tarafından naringin hidrolizinin modellenmesi için tepki yüzey metodolojisi kullanılmıştır. 30°C'den yüksek sıcaklıklarda daha yüksek naringin dönüşümü (%95), 800 mg·L⁻¹'den yüksek naringinaz konsantrasyonları elde edilmiştir [91].

Ono vd. [92] mandalina suyunda acılığın giderilmesinde immobilize naringinaz kullanmıştır. Naringinazın immobilizasyonu, %1 glutaraldehit yoluyla tavuk yumurtası akı boncukları üzerinde kovalent bağlanma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, %68 oranında acılık giderme etkinliği sağlanmıştır.

Meyve sıkma işleminden sonra ham meyve suyu, ağırlıklı olarak koloidal yapıda pektin bileşikler içerdiğinden çok bulanık bir formda bulunmaktadır. Meyve suyu sektöründe pektin istenmeyen bir bileşendir. Bu nedenle meyve suyunun berraklaştırılması işlemi ile pektin hidrolize edilmektedir [93]. Bu işlem için immobilize pektinazlar kullanımı mevcuttur. Immobilize pektinaz, pektini hidrolize etmekte ve böylece pektin kalıntısı olmayan meyve suyu üretim miktarını arttırmaktadır [94]. Ek olarak; birlikte immobilize edilmiş amilaz, poligalakturonaz ve naringinazdan oluşan bir sistem, meyve ve sebze sularında nişasta ve pektin hidrolizi için, meyve suyunun ayrı ayrı immobilize edilmiş pektinaz ve amilaz ile işlendiği sisteme göre daha üstün olduğunu ifade etmektedir [95].

6.3 Şeker teknolojisi

Immobilize enzimlerin gıda endüstrisindeki en önemli kullanım alanı, glikoz şuruplarının glikoz izomeraz enzimi tarafından yüksek fruktozlu mısır şurubuna (YFMS) dönüştürülmesidir. Immobilize enzimler ortam pH'ı ve sıcaklığı altında, glikozu sakarozdan daha tatlı ve düşük glisemik indekse sahip olan fruktoza dönüştürmektedir [96]. Immobilize izomeraz enzimi kullanıldığında, daha yüksek fruktoz konsantrasyonu ile daha az yan ürün oluşmaktadır. Tüm hücre immobilizasyonu çoğunlukla ısı işlem görmüş hücrelerin glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla yapılmaktadır [97]. Yılda 500 tonun üzerinde immobilize D-Glikoz/ksiloz izomeraz tüketilmekte ve bu da yılda yaklaşık 10 milyon ton YFMS üretimini mümkün kılmaktadır [98]. YFMS ayrıca içecekler ve gıda maddeleri için bir tatlandırıcı olarak veya bir gıda bileşeni olarak doğrudan kullanım için fruktoz üretiminde kullanılmaktadır [96].

Şekerli izomaltuloza (palatinoz) dönüştürmek için izomaltuloz sentaz enzimi kullanılmaktadır. İzomaltuloz balda bulunan doğal indirgeyici şekerdir. Düşük kalorili bir şeker olan izomaltuloz; asit çözeltilerinde stabilite, insan bağırsağında *Bifidobakter*lerin büyümesini teşvik etme ve antikaryojenik gibi birtakım özelliklere sahiptir [99]. İzomaltuloz üretiminde immobilize edilmiş *Erwinia rhapsodica*, *Protaminobacter rubrum* veya *Serratia plymuthica* hücrelerinden herhangi birinin kullanıldığı immobilize hücre reaktörleri bulunmaktadır [100].

Şekerleme endüstrisinde yaygın olarak kullanılan fruktoz şurubu elde edilmesinde immobilize inulinazın kullanımı mevcuttur. Wenling vd. [101] yaptıkları bir çalışmada, inulinaz enzimini DEAE A-500 selüloz üzerinde kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Immobilize

inulinazın optimum koşulları (pH'ı 5.0, sıcaklık 55°C), çözünür enziminkinden (pH 4.5, sıcaklık 5°C) biraz daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Immobilize inulinaz ve serbest inulinazın aktivitesi, 24 saat boyunca ölçülmüştür. Immobilize inulinaz, 50°C'de başlangıç aktivitesinin %95'ini korurken, çözünür enzimin aktivitesi %67'ye düştüğü tespit edilmiştir. Ancak çözünür inulinaz, immobilize enzime göre çok daha düşük bir termal stabilite ortaya çıkarmıştır. Enzimin birçok noktada taşıyıcılarla moleküler çapraz bağlanması, immobilize enzimin uzaysal konfigürasyonunu daha 'sert' hale getirmekte ve ısıtıldığında açılmasını zorlaştırmaktadır. Böylece stabil konfigürasyonu korunabilir ve termal stabilite geliştirilebilir [102].

İnvertaz (β -fruktofuranosidaz), fruktoz şurubu üretiminde kullanılan farklı bir enzimdir. Smaali vd. [103] *Aspergillus awamori*'den elde edilen invertazı, kovalent bağlanma yoluyla kitosan üzerinde immobilize etmiştir. Immobilize invertaz, sakkarozdan yüksek fruktozlu mısır şurubu üretmek için dolgu yataklı reaktörde (50°C, pH 6 ve 17 mL/saat akış hızında) kullanılmıştır. Başlangıçta 139.2 g/L toplam şeker ve 78.6 g/L sakaroz içeren ekstraktan, 0.95'lik bir dönüşüm faktörü ile 69 g/L fruktoz şurubu elde edilmiştir. Farklı bir çalışmada, invertaz polivinil alkol-aljinat taneciklerine sınırlandırma yöntemi ile immobilize edilmiştir. Immobilize invertaz, %1 (a/h) sakaroz çözeltisinin tam hidrolizi için 14 döngüde etkili bir şekilde kullanılmış ve aktivitede herhangi bir bozulma olmadan 60 gün boyunca 4°C'de saklanmıştır. Dahası, immobilize edilmiş invertaz, ananas atıklarında bulunan sakkarozun %91.4'ünü başarılı bir şekilde glikoza dönüştürmüştür [104]. Ek olarak, immobilize invertaz enzimi depolama sırasında çeşitli ürünlerin (reçel, şekerleme) şekerlenmesini önlemek için de kullanılmaktadır [78].

D-Tagatoz, süt ürünlerinde az miktarda, doğal olarak bulunan bir monosakkarittir. D-Tagatoz'un gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılması ABD'de genel olarak güvenli kabul edilmektedir. Alkali koşullar altında, bir metal hidroksit ile izomerizasyon yoluyla galaktozdan üretilebilir [105]. Ek olarak, *Thermotoga neapolitana*'dan elde edilen immobilize formda termostabil L-arabinoz izomeraz enziminin immobilize formu kullanılarak galaktozdan izomerizasyon yoluyla da üretilebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, ermostabil L-arabinoz izomerazın immobilize edilmiş formunun aktivitesi, 20 günlük bir ısı işleminden sonra %80'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir [106].

6.4 Yağ teknolojisi

Yağ endüstrisinde, immobilize lipazın büyük bir uygulama alanı mevcuttur. Enzimin stabilitesi ve aktivitesi immobilizasyon ile geliştirildiğinden, immobilize lipaz çözünür enzime göre daha çok tercih edilmektedir. *Rhizomucor miehe* tarafından üretilen immobilize lipaz, hurma yağındaki transesterifikasyon reaksiyonu için kullanılmış ve palmitik asit, stearik asit ile değiştirilmiştir [107].

Immobilize lipaz enzimi, trans yağ içermeyen yağ üretiminde; mısır, ayçiçeği ve/veya soya yağı gibi kaynaklardan sıfır veya düşük trans yağ, katı yağ ve margarin üretmek için kullanılmaktadır. Örnek olarak; trans

yağ içermeyen ancak aynı zamanda stearik asit açısından da zengin olan, yaklaşık %25 oranında tamamen doymuş soya fasulyesi yağı ile %75 sıvı soya fasulyesi yağının birleştirilmesi ile neredeyse trans içermeyen ancak oda sıcaklığında işlevsel özelliklere sahip katı bir nihai ürün elde sağlanabilmektedir. Soya yağı, yüksek miktarda doymamış yağ asidi içermekte ve buna bağlı olarak zayıf oksidatif stabilite göstermektedir. Bu nedenle kısmen hidrolize edilerek, trans yağı içermeyen katı yağ üretilmektedir. Çok düşük bir sulu ortamda, interesterifikasyon enzimatik olarak yapılabilmektedir. Bu reaksiyon çok spesifik, hafif ve çok az işlem gerektirmektedir [108]. İmmobilize lipaz enziminin bir başka kullanım alanı, işlevselleştirilmiş fenollerin esterleştirilmesi için de kullanılmasıdır. Doğada lipofilik karakterde olan ve ayçiçeği yağında kullanılan antioksidanların sentezinde immobilize lipaz enziminden faydalanılmaktadır [107].

İmmobilize lipaz kullanımı, hidroliz uygulamalarında avantaj sağlamaktadır [27]. Li ve Wu [109] çalışmalarında poliakrilonitril (PAN) nanolifli membranlar üzerinde lipaz immobilizasyonunu inceleyip bunu soya fasulyesi yağı hidrolizinde kullanmışlardır. Reaksiyon sisteminde soya fasulyesi yağının hidroliz dönüşümünün 10 dakika sonra %72 ve 1.5 saat sonra %85 olduğunu ve immobilize lipazın 20 döngü yeniden kullanımdan sonra orijinal formunun %65'ini koruyabildiğini tespit etmişlerdir. Ek olarak, immobilize lipazın az yağlı peynirlerde lezzet artırıcı olarak kullanıldığı bir çalışmada, lipaz α -laktalbümin nanotüpleri üzerine kapsülleme yöntemi ile immobilize edilmiştir. Bu çalışma ile immobilize lipazın, az yağlı peynirlerde lezzeti artırdığı tespit edilmiştir [110].

Omega-3 yağ asitleri gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA), günlük yaşam ve işlev için hayati öneme sahip olduğu bilinmektedir [111]. Gıda endüstrisi, organoleptik ve biyoyararlanım özelliklerini iyileştirmek için omega-3 balık yağlarının bileşimini değiştirmeye odaklanmıştır [6]. Kralovec vd. [112] balık yağlarında esterleştirme ve bunun sonucunda ÇDYA'nın azaltılması için immobilize CalB'nin kullanılabileceğini bildirmiştir. İşlemden, stiren/divinil benzen (XAD-1180) bazlı polimerik boncuklar üzerine immobilize edilmiş CalB kullanılarak çalışma başına 4000 ve 8000 kg işleyebilen sabit yataklı bir enzim reaktörüne SYA balık yağı ve gliserol ilave edilir. Sistem, 24 saatlik bir reaksiyon döngüsü ile 70°C'de ısıtılmış ve nihai bileşim, %15 SYA ve %85 trigliserit olarak elde edilir.

Pronova BioPharma Norge AS, balık yağının doğrudan esterifikasyon ile immobilize CalB kullanarak, EPA (eikosapentaenoik asit, C20:5) açısından zenginleştirilmiş etil ester (EE) fraksiyonlarının, DHA (dokosaheksaenoik asit, C22:6) açısından zenginleştirilmiş serbest yağ asidi fraksiyonundan (SYA) balık yağının doğrudan esterleştirilmesiyle ayrılmasına yönelik bir işlem bildirmiştir. Bunun için immobilize CalB kullanılmıştır. 4 saatlik reaksiyondan sonra %78'in üzerinde etil ester (EE) ve kalan %22 serbest yağ asidi (SYA) dönüşümü gerçekleşmiş ve kalıntı SYA, %49 DHA ve %6 EPA içerecek şekilde artırılmıştır [113].

6.5 Bira ve şarap teknolojisi

Bira gibi fermente içeceklerin üretimi, proses ve kapasite gereği yaklaşık 6-7 gün sürmektedir. İmmobilizasyon tekniği, bira endüstrisinde maya hücrelerinin konsantrasyonlarını artırmak için enzimlerin sınırlandırılması tekniği ile kullanılmaktadır. İmmobilize maya hücreleri, ürün kalitesini etkilemeden işlem süresini azaltmaktadır [70]. İmmobilize enzim uygulaması ile biranın 2 günden kısa sürede üretildiği bildirilmiştir [73].

Bira üretiminde malttaki çözünebilir proteinler, ürün soğutulduğunda 'üşüme' adı verilen, bir kalite sorununa sebep olmaktadır. Bu kusur biranın bulanıklaşmasıdır. İmmobilize enzimlerin kullanılması ile proteinlerin hidrolizi gerçekleştirilir ise bu sorun önlenir. Glutaraldehit ve papain bu bağlamda kullanılmıştır [16,114].

Bira üretiminde diketonlar diasetil ve 2,3-pentanedion bileşiklerinin aroma olgunlaşma aşamasında uzaklaştırılması gerekmektedir. İmmobilize maya hücrelerinin kullanımı ile çözünür enzimlere kıyasla işlem süresi azalmaktadır. Yaklaşık 2 saatte üretim gerçekleştirilebilir [97]. Yapılan bir çalışmada, serbest α -amilaz yerine immobilize enzim kullanımının arpa maltı hidrolizatlarında 1.5 kat verim artışına yol açtığı tespit edilmiştir [115]. Ek olarak, bir çalışmada gluteni giderilmiş bira üretmek için immobilize proteaz enzimi kullanılmıştır. Proteaz çapraz bağlanma ile kitosan boncukları üzerine immobilize edilmiştir. Çalışma sonunda, gluten içeriği 65'ten 15 mg/kg'a düşmüş bira elde edilmiştir [116].

Farklı bir fermente ürün ise şaraptır ve eldesi karmaşık bir sürece sahiptir. Biyokatalitik sistemde sırasıyla alkol ve malolaktik fermantasyon için maya ve laktik asit bakterilerinin aynı anda aktivasyon oluşturmasıdır [117]. Bu süreç, *Saccharomyces bayanus* ve *Leuconostoc oenos* hücrelerinin, kalsiyum aljinat matrisinde immobilize edilmesiyle elde edilen immobilize enzimlerin kullanımı ile kolaylaştırılabilir [118]. Bu da gıda endüstrisinde pratik uygulama potansiyeline bir örnek teşkil etmektedir.

İmmobilize enzimler, şarapta aromayı artırmak için kullanılabılır [119,120].

6.6 Aroma teknolojisi

Lezzet ve koku maddeleri, gıda formülasyonlarına, içeceklere, ilaçlara ve kişisel bakım ürünlerinin içerisine eklenmektedir [121]. Aroma bileşikleri; metil/bütül bütirat (ananas veya elma aroması), etil bütirat (ananas veya çilek aroması) ve izomil asetat/bütirat (muz aroması) gibi kısa zincirli yağ asitleri ve alkollerdir [121,122].

İmmobilize lipazlar, ekstrem olmayan koşullar altında doğal tat maddelerinin sentezini katalize etmektedir [70]. İmmobilize lipazların kullanımı, doğal aromaların üretimi için daha uygun koşullarda sentez imkanı sunmaktadır [123]. İmmobilize lipazın uygulandığı çalışmalara; bütirik asit ve bütanolde bütül bütiratın üretimi [122], bütirik asit ve izoamil alkolden izoamil bütirat üretimi [124] örnek verilebilir.

Eterler, ana lezzet bileşimidir ve bu bileşiklerin aşırı maliyeti, işlemi uygulanamaz hale getirmektedir. Ayrıca kimyasal proseslerin kullanılması, gıda ve içecek endüstrilerinde, uygulamalarını çok sınırlı hale getiren

istenmeyen bileşiklerin oluşumuna yol açmaktadır [121]. Sadighi vd. [125] valerik asit ve etanol bileşiklerini etil valerat (yeşil elma aroması) sentezi için kullandıklarında, n-hekzan ve dimetilsülfoksit ortamında 24 saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla %60 ve %53'lük bir azalma gözlemlenmiştir.

Silva vd. [126] bütanol ve bütirik asidin heptan ortamında esterleştirilmesiyle ananas aromasının sentezinde kullanılan domuz pankreatik lipazını (PPL) immobilize etmek için polihidroksibutirat (PHB) partikülleri kullanmışlardır. Esterleştirme reaksiyonunda, 2 saatlik sürenin ardından optimum dönüşüm yaklaşık %93 olmuş ve 6 döngü esterleştirmeden sonra biyokatalizörün başlangıç aktivitesinin %63'ünü koruduğunu ortaya koymuştur.

Caldini vd. [119] şarapta aroma artışı için mantar glukosidazlarında kinetik ve immobilizasyon çalışmaları yürütmüşlerdir. Çalışmada uygun şarap aromasının gelişimi için hazırlanan *A. niger*'in enzim preparasyonu içerisinde, β -glukosidaz, α -arabinosidaz ve α -ramnosidaz bulundurmaktadır. Şarap aromasının artırılması için enzimler bir bentonit katı taşıyıcıya immobilize edilmiştir. Farklı bir çalışmada, *A. niger*'den saflaştırılmış α -L-ramnosidazın, şarabın aromasını artırdığı bildirilmiştir [120].

Aroma maddesi olarak kullanılan aspartam, kimyasal olarak aspartik asit ve fenilalaninden sentezlenebilir. Ancak bu, acı bir tada sahip optik izomerin oluşmasına sebep olmaktadır [14]. Karbobenzoksi-L-aspartat ve D,L-fenilalanin metil esteri yoğunlaştırmak için immobilize Thermolase™ kullanan bir işlem geliştirilmiştir [97,127].

6.7 Besin takviyesi

Amino asitler ve oligosakkaritlerin bulunduğu çeşitli gıda takviyeleri bulunmaktadır. Amino asitler, tek başlarına veya kombinasyon halinde geliştirilmiştir. Genellikle L-amino asitler, rasemik karışımlar, d-amino asitleri ve l-amino asitleri üreten kimyasal bir yöntemle sentezlenir. Bunun için DEAE-sephadex üzerinde immobilize edilmiş amino asilaz enzimi kullanılır. Sonunda d-, ve l-asil amino asit grupları oluşmaktadır [128].

Prebiyotikler, insan kalın bağırsağının simbiyotik mikroflorasının büyümesini ve geçimini sağlayan sindirilemez gıda bileşenleridir [129]. Galakto-oligosakkaritler (GOS) ve genel olarak oligosakkaritler, birçok yararlı sağlık etkileri ve prebiyotik gıda olarak geniş uygulamaları nedeniyle son zamanlarda çok fazla ilgi görmektedir. β -galaktosidaz enzimi, GOS üretmek için kullanılmaktadır [130]. Kovalent olarak immobilize edilmiş β -galaktosidaz, laktozdan sürekli GOS üretimi için dolgu yatak veya akışkan yataklı reaktörlerde başarıyla kullanılabilir. Reaksiyondaki veya laktoz karışımındaki yüksek laktoz konsantrasyonlarının, bu süreçte kullanılan immobilize enzimin stabilitesini destekleyeceği tespit edilmiştir. 24 saatlik reaksiyon süresinde %57'ye kadar GOS oluşumunun sağlandığı rapor edilmiştir [131]. GOS üretimi için ayrıca PVA (polivinil alkol) jelde kullanılmaktadır. PVA jeli ucuzdur, mükemmel fiziksel ve kimyasal özellikler gösterir ve yüksek stabiliteye sahiptir. Dolayısıyla immobilize formda bu amaç için kullanılabilir. 2008 yılında,

Aspergillus oryzae'den β -galaktosidaz enzimi lentiküler formdaki polivinil alkol kapsüllerine immobilize edilmiştir. Immobilizasyon, enzim pH aralığının genişlemesine yol açmamıştır, ancak 45°C'de 530 saatlik laktoz hidrolizi sırasında β -galaktosidaz stabilitesinin korunduğu gözlemlenmiştir. Immobilize enzimin orijinal aktiviteyi 4°C'de ve pH 4.5'te 14 ay boyunca koruduğu tespit edilmiştir [129].

Fonksiyonel oligosakkaritlerin (ksilo-, frukto-, izomalto- ve inulo-) sentezinde immobilizasyon teknolojilerinden yararlanılmaktadır. Bunlar, prebiyotik olan çözünür diyet lifleri gibi davranarak prebiyotik mikroorganizmaların (*Bifidobacterium spp.* ve *Lactobacillus spp.*) bağırsakta gelişmesini teşvik edebilir. Fonksiyonel oligosakkaritlerin üretiminde kullanılan enzimler glikozidazlar (EC 3.2) ve glikosiltransferazlar (transglikosilazlar (EC 2.4)) olmak üzere iki gruba ayrılır. Bunlar immobilize formda fonksiyonel oligosakkaritleri üretmek için kullanılırlar [96].

Ek olarak immobilize enzimler, nutrasötiklerin üretiminde de kullanılmaktadır. Immobilizasyon tekniği ile nutrasötiklerin tıbbi değerlerini artırmak için gıdalara izolasyonları yapılmakta veya dahil edilmektedir [70].

6.8 Karbonhidratların hidrolizi

Amilazlar, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir enzim grubudur. Nişastanın şekerlere, şuruplara ve dekstrinlere dönüştürülmesi, nişasta işleme endüstrisinin büyük bölümünü oluşturmaktadır. Amilazın, esas olarak suda çözünmeyen taşıyıcılar üzerinde immobilizasyonu, enzimlerin daha kararlı ve yeniden kullanılabilir formlarını elde etmenin en umut verici yolu gibi görünmektedir [132].

Kitosanın karbonhidrat parçalayıcı enzimlerin immobilizasyonu için uygun olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmektedir [47,49]. Hosseinipour vd. [66] α -amilazı yeni geliştirilen nanopartiküllerin üzerinde immobilize etmişler ve çözünür enzime göre fizikokimyasal özelliklerini karşılaştırmışlar. Ayrıca, farklı pH ve sıcaklıklarda kapsamlı kinetik ve kararlılık çalışmaları da yapmışlardır. Bahsedilen çalışmada, α -amilaz tek başına glutaraldehit ile aktive edilmiş, amino fonksiyonelleştirilmiş silika kaplı manyetik nanopartiküller (AFSMNP'ler) üzerinde başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir ve kovalent bağlama yöntemi kullanılarak kitosan ile kaplanmıştır. Yapılan analizler sonucunda; termal, pH, depolama stabilitesinde ve immobilizasyona bağlı olarak α -amilazın sık kullanımında önemli bir gelişme gözlemlenmiştir. Kinetik çalışmalar immobilize enzimin performansında çözünür enzime kıyasla bir gelişme olduğunu göstermektedir.

Maltoz, hafif tatlı olması ve esmerleşmeye neden olmaması nedeniyle gıda endüstrilerinde geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Maltoz üretimine yönelik olarak farklı uygulamalar mevcuttur. Das vd. [128] β -amilaz molibden sülfid nano tabakalar üzerinde immobilize etmiştir. Immobilize β -amilaz gıda ve ilaç endüstrilerinde maltoz üretimi için kullanılabilir. Diğer bir çalışmada ise Noda vd. [133] kitosan boncukları ile immobilize edilmiş β -amilazları yatay bir döner kolonlu reaktöre maltoz üretmek için eklemiştir.

Reshmi vd. [132] zirkonya üzerinde α -amilaz immobilizasyonu adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen immobilize enzim nişasta hidroliz reaksiyonunda kullanılmış ve aktivasyonu çözünür enzim ile karşılaştırılmıştır. Optimum stabilite için pH değerinin immobilize enzimde artış gösterdiğini ifade etmişlerdir. İmmobilize α -amilaz ve çözünür formu için en yüksek stabilitenin gözlemlendiği pH değerleri sırasıyla pH 6 ve pH 7 olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon sonucunda pH değişikliklerine duyarlılığın azaldığı gözlemlenmiştir.

Aktif kömür, taşıyıcı malzeme olarak gıda endüstrilerinde herhangi bir çapraz bağlama maddesi olmaksızın nişasta hidrolizi için amiloglukosidazın immobilize edilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca taşıyıcı aktif kömür %90 katalitik aktiviteye sahiptir [134]. Daha önce Kibar & Akovali [135] tarafından bildirildiği üzere; kömür, yüksek adsorplama kapasitesi ve minimum ince partikül madde salınımı ile mükemmel bir adsorban olarak tercih edilebilmektedir.

6.9 Kakao işleme teknolojisi

Lipazlar, yağların erime özelliklerini değiştirmek ve sonucunda daha değerli bir ürün oluşturmak için kullanılmaktadır. Kakao yağı 37°C'lik bir erime noktasına sahip, ana bileşenleri POS (1(3)-palmitoil-3(1)-stearoil-2-mono-olein) ve SOS (1,3-distearoil-2-mono-olein)'tur [136].

İmmobilize lipaz, kakao yağı muadili üretmek için kullanılmaktadır. 1980'lerde Unilever, hurma orta fraksiyonu ve stearik asit karışımını, arzu edilen trigliseritler, POS ve SOS'tan yüksek düzeyde içeren bir kakao yağı eşdeğerine dönüştürmüştür. Ticari uygulamada *Rhizomucor miehei* tarafından üretilen immobilize lipaz kullanılmaktadır. Bu süreç, palmitik asidin stearik asit ile yer değiştirmesi ile gerçekleşmektedir. Hedeflenen stearik asit-oleik asit-stearik asit trigliserid oluşumu sağlanmaktadır [6,137]. Benzer bir zamanda, Fuji Oil Company, 1,3-dipalmitoil-2-olein (hurma yağı orta fraksiyonundan) ve etil stearat arasındaki transesterifikasyonu katalize etmek için immobilize lipaz kullanımına yönelik bir süreç geliştirmiştir. İmmobilizasyon için *Rhizopus niveus*'tan 1,3'e özgü lipaz enzimi iki atomlu toprağa adsorbe edilmiştir. Buradaki amaç, çikolata üretimi için uygun bir kakao yağı ikamesi üretmektir [6,138].

6.10 Protein modifikasyonu

Proteinler daha kolay sindirilebilmeleri için hidrolize edilmektedir. Bu amaçla immobilize formda pepsin, tripsin, kimotripsin gibi enzimler ve bağırsak mukozal peptidazlar kullanılmaktadır. Enzimatik hidroliz, aromatik amino asitlerden yüksek oranda dallı zincirli amino asitler içeren hidrolize kazein üretmek için yapılmaktadır. Bu ürün, fenilketonüri, hepatik ensefalopatiler ve tirozinemiden muzdarip hastalarda kullanılmaktadır [139].

İmmobilize proteazların, gelişmiş işlevselliğe sahip gıda proteinlerinin sınırlı proteolizi için kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Huang vd. [140] immobilize edilmiş tripsin ile β -Laktoglobulin hidrolizatlarını geliştirmiştir. Bu sayede daha düşük bir jel noktası elde edilmiş ve doğal proteine göre daha hızlı jelleşme tespit edilmiştir. Jelleşme sıcaklığındaki azalma ile içsel viskozitenin arttığı ve sonuç olarak, ısıtmadan sonra daha güçlü ve daha kırılğan jeller oluştuğu

bildirilmektedir. Farklı bir çalışmada; immobilize transglutaminaz enzimi tarafından peynir altı suyu proteini elde edilmiştir [21,97].

Ticu vd. [141], immobilize domuz pepsin kullanarak hemoglobin hidrolizinden çeşitli biyoaktif peptitlerin üretimini araştırmıştır. Ek olarak, kazeinden fosfopeptitleri elde etmek için hareketsizleştirilmiş tripsin kullanıldığı çalışmalarda mevcuttur [142,143].

6.11 Organik asit

İmmobilize hücreler glukonik asit, fumarik asit, malik asit, propiyonik asit, süksinik asit ve bütirik asit gibi diğer organik asitleri üretmek için kullanılmaktadır.

Mantar fermentasyonlarında immobilize hücrelerin kullanımı ile büyüme kısıtlanabilir. Çünkü büyüme ortam viskozitesini artmasına ve beraberinde ortamda oksijen transferinin yavaşlamasına neden olmaktadır. Bu sayede fermentör ortam viskozitesini etkilemeden çalıştırılabilir [70,144].

7 Sonuç

Enzimlerin işlem koşullarına hassasiyeti, operasyonel stabilitesinin, katalitik aktivitesinin düşüklüğü ve yeniden kullanımına yönelik geri kazanım problemleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu problemlerin aşılması için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir [3]. İmmobilizasyon hareketsizleştirme tekniğidir. Bu teknik, enzimin üründen kolay ayrılması, kontrollü ürün oluşumu, enzimin tekrar kullanılabilmesi, enzim inhibisyonunu azaltması, enzim stabilitesini geliştirmesi gibi avantajlar sağlamaktadır.

Gıda endüstrisinde, dünya çapında ana gıda bileşenleri olarak kullanılan YFMŞ, amino asit, kakao yağı analogları üretimi gibi köklü endüstriyel işlemlerde yüksek miktarda immobilize enzim kullanılmaktadır. Bunların dışında, laktozsuz süt üretimi, meyve suyunun acılığının giderilmesi gibi oldukça önem arz eden işlemlerde de kullanımı mevcuttur. Glikoz izomeraz (YFMŞ üretiminde), immobilize lipazlar (diasilgliserollerin transfree katı ve/veya sıvı yağların üretiminde), immobilize β -galaktosidaz (Galakto-oligosakkaritlerin üretiminde) gibi enzimler gıda endüstrisinde immobilize edilerek kullanılan önemli enzimlerdir.

İmmobilizasyon, enzim teknolojisinin problem arayışına bir çözümdür. Gıda alanında kullanımı artan bu teknoloji oldukça umut vaat edicidir. Nüfusun artması ve doğal kaynakların azalması ile, immobilize enzimlerin gelecekte kullanımı artabilir. Bu çalışma ile immobilizasyon teknikleri ve gıda endüstrisi uygulamaları açısından bir derleme amaçlanmıştır. Bu çalışma bu alanda yapılacak olan diğer araştırmalar açısından bir başlangıç niteliğinde olacak mevcut durumun anlaşılması ve geleceğinin değerlendirilebilmesi adına hizmet edecektir.

Çıkar çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Benzerlik oranı (iThenticate): %6

Kaynaklar

- [1] D. Sutay Kocabaş, Gıda Endüstrisinde Enzimlerin Rolü ve İlgili Yasal Düzenlemeler, Gıda Biyoteknolojisi, 1st ed., Ögel ZB, pp. 29–38, Ankara: Türkiye Klinikleri, 2021.
- [2] M. Misson, H. Zhang, B. Jin, Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications, Journal of The Royal Society Interface. 12, 20140891, 2015. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0891>.
- [3] N.M. Mubarak, J.R. Wong, K.W. Tan, J.N. Sahu, E.C. Abdullah, N.S. Jayakumar, P. Ganesan, Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 107, 124–131, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.002>.
- [4] A. Homaei, Enzyme Immobilization and its Application in the Food Industry, Advances in Food Biotechnology, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 145–164, 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118864463.ch09>.
- [5] B. Brena, P. González-Pombo, F. Batista-Viera, Immobilization of Enzymes: A Literature Survey, in: J.M. Guisan (Ed.), Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition, Humana Press, pp. 15–31, Totowa, NJ, 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2.
- [6] A. Basso, S. Serban, Industrial applications of immobilized enzymes—A review, Molecular Catalysis. 10, 110607, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.
- [7] R.A.M. Sardar, Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix, Biochemistry & Analytical Biochemistry. 4, 2015. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>.
- [8] J.R. Xavier, K.V. Ramana, R.K. Sharma, β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing, Journal of Food Biochemistry. 42, e12564, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>.
- [9] R.C. Rodrigues, J.J. Virgen-Ortíz, J.C.S. dos Santos, Á. Berenguer-Murcia, A.R. Alcántara, O. Barbosa, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions, Biotechnology Advances. 37, 746–770, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.
- [10] S. Jakovetić Tanasković, B. Jokić, S. Grbavčić, I. Drvenica, N. Prlainović, N. Luković, Z. Knežević-Jugović, Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants, Applied Clay Science. 135, 103–111, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.09.011>.
- [11] M. Bilal, H.M.N. Iqbal, H. Hu, W. Wang, X. Zhang, Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes, Journal of Environmental Management. 188, 137–143, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.015>.
- [12] R. Fernandez-Lafuente, Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 62, 197–212, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>.
- [13] A. Illanes, L. Wilson, C. Vera, Problem Solving in Enzyme Biocatalysis, John Wiley & Sons, 2013.
- [14] H.E. Swaisgood, The use of immobilized enzymes to improve functionality. Proteins in food processing, Proteins in Food Processing, pp. 607–630, 2004.
- [15] K. Khoshnevisan, F. Vakhshiteh, M. Barkhi, H. Baharifar, E. Poor-Akbar, N. Zari, H. Stamatis, A.-K. Bordbar, Immobilization of cellulase enzyme onto magnetic nanoparticles: Applications and recent advances, Molecular Catalysis. 442, 66–73, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2017.09.006>.
- [16] A. Homaei, H. Barkheh, R. Sariri, R. Stevanato, Immobilized papain on gold nanorods as heterogeneous biocatalysts, Amino Acids. 46, 1649–1657, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1724-0>.
- [17] N. Rueda, J.C.S. dos Santos, C. Ortiz, R. Torres, O. Barbosa, R.C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities, The Chemical Record. 16, 1436–1455, 2016. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600007>.
- [18] M. Ali, Q. Husain, S. Sultana, M. Ahmad, Immobilization of peroxidase on polypyrrole-cellulose-graphene oxide nanocomposite via non-covalent interactions for the degradation of Reactive Blue 4 dye, Chemosphere. 202, 198–207, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.073>.
- [19] L. Cao, L. van Langen, R.A. Sheldon, Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free?, Current Opinion in Biotechnology. 14, 387–394, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00096-X).
- [20] R.A. Sheldon, Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance, Advanced Synthesis & Catalysis. 349, 1289–1307, 2007. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>.
- [21] V.-D. Truong, D.A. Clare, G.L. Catignani, H.E. Swaisgood, Cross-Linking and Rheological Changes of Whey Proteins Treated with Microbial Transglutaminase, J. Agric. Food Chem. 52, 1170–1176, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf034397c>.
- [22] P.S. Panesar, S. Kumari, R. Panesar, Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries, Enzyme Research. 2010, 2010.
- [23] D. Brady, J. Jordaan, Advances in enzyme immobilisation, Biotechnol Lett. 31, 1639–1650, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0076-4>.
- [24] D.G. Filho, A.G. Silva, C.Z. Guidini, Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications, Appl Microbiol Biotechnol. 103, 7399–

- 7423, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>.
- [25] D.-M. Liu, J. Chen, Y.-P. Shi, Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 102, 332–342, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.
- [26] V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, Chapter Nine - Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes, in: S.-K. Kim, F. Toldrá (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, pp. 179–211, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>.
- [27] W. Shuai, R.K. Das, M. Naghdi, S.K. Brar, M. Verma, A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials, *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 64, 496–508, 2017. <https://doi.org/10.1002/bab.1515>.
- [28] S. Voběrková, V. Solčány, M. Vršanská, V. Adam, Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates, *Chemosphere*. 202, 694–707, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.088>.
- [29] X. Ji, Z. Su, C. Liu, P. Wang, S. Zhang, Regulation of enzyme activity and stability through positional interaction with polyurethane nanofibers, *Biochemical Engineering Journal*. 121, 147–155, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.02.007>.
- [30] K. Liang, R. Ricco, C.M. Doherty, M.J. Styles, S. Bell, N. Kirby, S. Mudie, D. Haylock, A.J. Hill, C.J. Doonan, P. Falcaro, Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules, *Nat Commun*. 6, 7240, 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms8240>.
- [31] J.W. Wilkerson, S.-O. Yang, P.J. Funk, S.K. Stanley, B.C. Bundy, Nanoreactors: Strategies to encapsulate enzyme biocatalysts in virus-like particles, *New Biotechnology*. 44, 59–63, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.04.003>.
- [32] S. Nordholm, G.B. Bacskay, The Basics of Covalent Bonding in Terms of Energy and Dynamics, *Molecules*. 25, 2667, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25112667>.
- [33] G. Cirillo, F.P. Nicoletta, M. Curcio, U.G. Spizzirri, N. Picci, F. Iemma, Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand, *Reactive and Functional Polymers*. 83, 62–69, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.07.010>.
- [34] M. Sharifi, S.-M. Robotjazi, M. Sadri, J.M. Mosaabadi, Immobilization of organophosphorus hydrolase enzyme by covalent attachment on modified cellulose microfibrils using different chemical activation strategies: Characterization and stability studies, *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 27, 191–199, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.03.023>.
- [35] İ. Saldamlı, Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2007.
- [36] C.E. La Rotta Hernandez, S. Lütz, A. Liese, E.P.S. Bon, Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking, *Enzyme and Microbial Technology*. 37, 582–588, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.025>.
- [37] N. Aissaoui, J. Landoulsi, L. Bergaoui, S. Boujday, J.-F. Lambert, Catalytic activity and thermostability of enzymes immobilized on silanized surface: Influence of the crosslinking agent, *Enzyme and Microbial Technology*. 52, 336–343, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.02.018>.
- [38] L. Cao, F.V. Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase, *Organic Letters*. 2, 1361–1364, 2000. <https://doi.org/10.1021/ol005593x>.
- [39] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*. 3, 1–9, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.
- [40] K. Mosbach, P. Brodelius, Immobilized enzymes and cells. B. II: Immobilization technique for cells/organelles, *Methods Enzymol*. 135, 171–472, 1987.
- [41] Y. Yong, Y.X. Bai, Y.F. Li, L. Lin, Y.J. Cui, C.G. Xia, Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity, *Process Biochemistry*. 43, 1179–1185, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.019>.
- [42] M. Rebroš, M. Rosenberg, Z. Mlichová, L. Křištofiková, M. Paluch, A simple entrapment of glucoamylase into LentiKats® as an efficient catalyst for maltodextrin hydrolysis, *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 800–804, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.001>.
- [43] G.A. Kovalenko, L.V. Perminova, T.G. Terent'eva, G.V. Plaksin, Catalytic properties of glucoamylase immobilized on synthetic carbon material Sibunit, *Appl Biochem Microbiol*. 43, 374–378, 2007. <https://doi.org/10.1134/S0003683807040023>.
- [44] A.S. Drozdov, O.E. Shapovalova, V. Ivanovski, D. Avnir, V.V. Vinogradov, Entrapment of Enzymes within Sol–Gel-Derived Magnetite, *Chem. Mater*. 28, 2248–2253, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b00193>.
- [45] T. Nakamura, Y. Ogata, A. Shitara, A. Nakamura, K. Ohta, Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817, *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80, 164–169, 1995. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)93213-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)93213-4).
- [46] Q. Shen, R. Yang, X. Hua, F. Ye, W. Zhang, W. Zhao, Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization, *Process Biochemistry*. 46, 1565–1571, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.04.010>.

- [47] M. Sureshkumar, C.K. Lee, Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization, *Carbohydrate Polymers*. 84, 775–780, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.036>.
- [48] V. Zargar, M. Asghari, A. Dashti, A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications, *ChemBioEng Reviews*. 2, 204–226, 2015. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>.
- [49] P. Tripathi, A. Kumari, P. Rath, A.M. Kayastha, Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 49, 69–74, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.08.011>.
- [50] F. van de Velde, N.D. Lourenço, H.M. Pinheiro, M. Bakker, Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques, *Advanced Synthesis & Catalysis*. 344, 815–835, 2002. [https://doi.org/10.1002/1615-4169\(200209\)344:8<815::AID-ADSC815>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1615-4169(200209)344:8<815::AID-ADSC815>3.0.CO;2-H).
- [51] B. Bayón, I.R. Berti, A.M. Gagneten, G.R. Castro, Biopolymers from Wastes to High-Value Products in Biomedicine, Energy, Environment, and Sustainability, Springer Nature, pp. 1–44, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8_1.
- [52] M.L. Cacicedo, R.M. Manzo, S. Municoy, H.L. Bonazza, G.A. Islan, M. Desimone, M. Bellino, E.J. Mammarella, G.R. Castro, Chapter 7 - Immobilized Enzymes and Their Applications, in: R.S. Singh, R.R. Singhanian, A. Pandey, C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology*, Elsevier, pp. 169–200, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00007-8>.
- [53] E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer, Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10, 157–176, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00124-7).
- [54] V.V. Vinogradov, D. Avnir, Exceptional thermal stability of therapeutical enzymes entrapped in alumina sol-gel matrices, *Journal of Materials Chemistry B*. 2, 2868–2873, 2014. <https://doi.org/10.1039/C3TB21643H>.
- [55] M.N. Gupta, M. Kaloti, M. Kapoor, K. Solanki, Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 39, 98–109, 2011. <https://doi.org/10.3109/10731199.2010.516259>.
- [56] S. Escobar, C. Bernal, M. Mesa, Relationship between sol-gel conditions and enzyme stability: A case study with β -galactosidase/silica biocatalyst for whey hydrolysis, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 26, 1126–1138, 2015. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1078929>.
- [57] E.T. Hwang, M.B. Gu, Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials, *Engineering in Life Sciences*. 13, 49–61, 2013. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100225>.
- [58] M. Hartmann, Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis, *Chem. Mater.* 17, 4577–4593, 2005. <https://doi.org/10.1021/cm0485658>.
- [59] N. Carlsson, H. Gustafsson, C. Thörn, L. Olsson, K. Holmberg, B. Åkerman, Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical–chemical perspective, *Advances in Colloid and Interface Science*. 205, 339–360, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.08.010>.
- [60] S. Tanvir, H. Adenier, S. Pulvin, Screening and prediction of reactive intermediates in a microreactor with immobilized rat hepatic microsomes using acetaminophen as a model drug, *Enzyme and Microbial Technology*. 45, 112–117, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.006>.
- [61] S. Hudson, J. Cooney, E. Magner, Proteins in Mesoporous Silicates, *Angewandte Chemie International Edition*. 47, 8582–8594, 2008. <https://doi.org/10.1002/anie.200705238>.
- [62] L. Treccani, T. Yvonne Klein, F. Meder, K. Pardun, K. Rezwan, Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications, *Acta Biomaterialia*. 9, 7115–7150, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.036>.
- [63] M. Hartmann, X. Kostrov, Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges, *Chem. Soc. Rev.* 42, 6277–6289, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3CS60021A>.
- [64] K. Ashtari, K. Khajeh, J. Fasihi, P. Ashtari, A. Ramazani, H. Vali, Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: Enzyme immobilization and cytotoxic study, *International Journal of Biological Macromolecules*. 50, 1063–1069, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.025>.
- [65] G. Larsen, R. Velarde-Ortiz, K. Minchow, A. Barrero, I.G. Loscertales, A Method for Making Inorganic and Hybrid (Organic/Inorganic) Fibers and Vesicles with Diameters in the Submicrometer and Micrometer Range via Sol–Gel Chemistry and Electrically Forced Liquid Jets, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1154–1155, 2003. <https://doi.org/10.1021/ja028983i>.
- [66] S.L. Hosseinipour, M.S. Khiabani, H. Hamishehkar, R. Salehi, Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe_3O_4 nanoparticles for potential application in food industries, *J Nanopart Res.* 17, 382, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3174-3>.
- [67] A. Illanes, C. Altamirano, Enzyme Reactors, in: A. Illanes (Ed.), *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, Springer Netherlands, pp. 205–251, Dordrecht, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7_5.
- [68] S.K. Sharma, R.M. Leblanc, Biosensors based on β -galactosidase enzyme: Recent advances and perspectives, *Analytical Biochemistry*. 535, 1–11, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.019>.

- [69] J.-W. Rhim, H.-M. Park, C.-S. Ha, Bio-nanocomposites for food packaging applications, *Progress in Polymer Science*. 38, 1629–1652, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008>.
- [70] S. Adhikari (Nee Pramanik), Chapter 41 - Application of Immobilized Enzymes in the Food Industry, in: M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology*, Academic Press, pp. 711–721, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00041-4>.
- [71] H.A.R. Gomes, L.R.S. Moreira, E.X.F. Filho, *Enzymes and Food Industry: A Consolidated Marriage*, *Advances in Biotechnology for Food Industry*, Elsevier Inc., pp. 55–89, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00003-7>.
- [72] P. Brodelius, Industrial applications of immobilized biocatalysts, *Advances in Biochemical Engineering*. 10, 75–129, 2005. <https://doi.org/10.1007/BFb0004472>.
- [73] D. Abdel, R. Mahmoud, D.A.R. Mahmoud, W.A. Helmy, Potential Application of Immobilization Technology in Enzyme and Biomass Production, *Journal of Applied Sciences Research*. 5, 2466–2476, 2009.
- [74] Y.H. Hong, J.H. Kim, S.B. KIM, J.H. Kim, Y.M. Lee, S.W. Park, Immobilization of psicose-epimerase and a method of producing D-psicose using the same, *US8735106B2*, 2014.
- [75] P. Villeneuve, Lipases in lipophilization reactions, *Biotechnology Advances*. 25, 515–536, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.06.001>.
- [76] S.-J. Gea, H. Bai, H.-S. Yuan, L.-X. Zhang, Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor, *Journal of Biotechnology*. 50, 161–170, 1996. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01561-1](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01561-1).
- [77] F. Xu, M.-J. Oruna-Concha, J.S. Elmore, The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food, *Food Chemistry*. 210, 163–171, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.105>.
- [78] C.-J. Chiang, L.-T. Hsiau, W.-C. Lee, Immobilization of cell-associated enzymes by entrapment in polymethacrylamide beads, *Biotechnology Techniques*. 11, 121–125, 1997. <https://doi.org/10.1023/B:BITE.0000034016.43050.22>.
- [79] B. Sujoy, A. Aparna, *Enzymology, immobilization and applications of urease enzyme*, *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2, 51–56, 2013.
- [80] N.C. Ricardi, E.W. de Menezes, E. Valmir Benvenuti, J. da Natividade Schöffner, C.R. Hackenhaar, P.F. Hertz, T.M.H. Costa, Highly stable novel silica/chitosan support for β -galactosidase immobilization for application in dairy technology, *Food Chemistry*. 246, 343–350, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.026>.
- [81] H. Hirohara, H. Yamamoto, E. Kawano, S. Nabeshima, Immobilized lactase, its preparation and use, *EP 0037667B1*, 1981.
- [82] S. Chauhan, A. Vohra, A. Lakhanpal, R. Gupta, Immobilization of Commercial Pectinase (Polygalacturonase) on Celite and Its Application in Juice Clarification, *Journal of Food Processing and Preservation*. 39, 2135–2141, 2015. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12457>.
- [83] M.S. Akin, M.B. Güler-Akin, H.A. Kirmaci, A.F. Atasoy, H. Türkoğlu, The effects of lipase-encapsulating carriers on the accelerated ripening of Kashar cheese, *International Journal of Dairy Technology*. 65, 243–249, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00821.x>.
- [84] V. Gekas, M. Lopez-Leiva, Hydrolysis of lactose: a literature review, *Process Biochem*. 20, 1985.
- [85] D.A. Kimball, S.I. Norman, Processing effects during commercial debittering of California navel orange juice, *J. Agric. Food Chem*. 38, 1396–1400, 1990.
- [86] M. Puri, S.S. Marwaha, R.M. Kothari, J.F. Kennedy, Biochemical Basis of Bitterness in Citrus Fruit Juices and Biotech Approaches for Debittering, *Critical Reviews in Biotechnology*. 16, 145–155, 1996. <https://doi.org/10.3109/07388559609147419>.
- [87] M. Puri, A. Kaur, R.S. Singh, J.R. Kanwar, Immobilized enzyme technology for debittering citrus fruit juices, *Transworld Research Network*, 2008.
- [88] G. Şekeroğlu, S. Fadiloğlu, F. Gögüş, Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin, *European Food Research and Technology*. 224, 55–60, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0288-y>.
- [89] M. Roitner, Th. Schalkhammer, F. Pittner, Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer, *Appl Biochem Biotechnol*. 9, 483–488, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF02798402>.
- [90] H.-Y. Tsen, G.-K. Yu, Limonin and Naringin Removal from Grapefruit Juice with Naringinase Entrapped in Cellulose Triacetate Fibers, *Journal of Food Science*. 56, 31–34, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb07968.x>.
- [91] I.A.C. Ribeiro, M.H.L. Ribeiro, Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 51, 10–18, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.09.023>.
- [92] M. Ono, T. Tosa, I. Chibata, Preparation and properties of immobilized naringinase using tanninaminohexyl cellulose, *Agricultural and Biological ChemistryAgric. BioI. Chem*. 42, 1847–1853, 1978. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863264>.
- [93] P. Kohli, M. Kalia, R. Gupta, Pectin Methylsterases: A Review, *Journal of Bioprocessing &*

- Biotechniques. 5, 2015. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000227>.
- [94] K. Hiteshi, S. Chauhan, R. Gupta, Immobilization of microbial pectinases: a review, *CIBTech J Biotechnol.* 2, 37–52, 2013.
- [95] Magindag, Amylase, polygalacturonase and naringinase co-immobilization, *EP* 298, 954, 1989.
- [96] R.D. Cosimo, J.M. Auliffe, A.J. Poulouse, G. Bohlmann, Industrial use of immobilized enzymes, *Chemical Society Reviews.* 42, 6437–6474, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3CS35506C>.
- [97] M.K. Walsh, 4 - Immobilized enzyme technology for food applications, in: R. Rastall (Ed.), *Novel Enzyme Technology for Food Applications*, Woodhead Publishing, pp. 60–84, 2007. <https://doi.org/10.1533/9781845693718.1.60>.
- [98] B. Hauer, C.K. Branneby, K. Hult, A. Magnusson, A. Hamberg, Enzymatically catalyzed method of preparing mono-acylated polyols, *US8715970B2*, 2014.
- [99] P.S.J. Cheetham, C.E. Imber, J. Isherwood, The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapsontici*, *Nature.* 299, 628–631, 1982. <https://doi.org/10.1038/299628a0>.
- [100] P. Cheetham, Applications of immobilized enzymes and cells in the food industry', *Chemical Aspects of Food Enzymes*, AT Andrews, pp. 53–93, 1987.
- [101] W. Wenling, W. Wuguang Le Huiying, W. Shiyuan, Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces sp.* Y-85, *Process Biochemistry.* 34, 643–646, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00140-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00140-X).
- [102] P. Bajpai, A. Margaritis, Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 2. Application for high fructose syrup production, *Enzyme and Microbial Technology.* 7, 459–461, 1985. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90048-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90048-1).
- [103] I. Smaali, A. Soussi, H. Bouallagui, N. Chaira, M. Hamdi, M.N. Marzouki, Production of high-fructose syrup from date by-products in a packed bed bioreactor using a novel thermostable invertase from *Aspergillus awamori*, *Biocatalysis and Biotransformation.* 29, 253–261, 2011. <https://doi.org/10.3109/10242422.2011.615924>.
- [104] N.A. Mohd Zain, S. Mohd Suardi, A. Idris, Hydrolysis of liquid pineapple waste by invertase immobilized in PVA–alginate matrix, *Biochemical Engineering Journal.* 50, 83–89, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.02.009>.
- [105] J.R. Beadle, J.P. Saunders, T.J.W. Jr, Process for manufacturing tagatose, *US5002612A*, 1991.
- [106] S. Jung, B.P. Lamsal, V. Stepien, L.A. Johnson, P.A. Murphy, Functionality of soy protein produced by enzyme-assisted extraction, *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 83, 71–78, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1178-y>.
- [107] S. Sharma, S.S. Kanwar, *Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications*, The Scientific World Journal. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/625258>.
- [108] W. Nawar, *Lipids*, ed. or fennema food chemistry, 3rd ed., New York, 1996.
- [109] S.F. Li, W.T. Wu, Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis, *Biochemical Engineering Journal.* 45, 48–53, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.02.004>.
- [110] T. Guan, B. Liu, R. Wang, Y. Huang, J. Luo, Y. Li, The enhanced fatty acids flavor release for low-fat cheeses by carrier immobilized lipases on O/W Pickering emulsions, *Food Hydrocolloids.* 116, 106651, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106651>.
- [111] J.A. Nettleton, *Omega-3 Fatty Acids and Health*, Springer US, Boston, MA, 1995. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2071-9_2.
- [112] J. Kralovec, W. Wang, J.C. Barrow, Enzymatic modification of oil, *US8420349B2*, 2013.
- [113] G.G. Haraldsson, A. Halldorsson, O. Thorstad, Lipase-catalysed esterification of marine oil, *US7491522B2*, 2009.
- [114] P.R. Witt, R.A. Sair, T. Richardson, N.F. Olson, Chillproofing beer with insoluble papain., *Brewers Digest.* 45, 70, 1970.
- [115] E.A. Raspopova, A.A. Krasnoshtanova, Characterizing the properties and evaluating the efficiency of biocatalysts based on immobilized fungal amylase, *Catalysis in Industry.* 8, 75–80, 2016. <https://doi.org/10.1134/S2070050416010104>.
- [116] I. Benucci, M.C. Caso, T. Bavaro, S. Masci, M. Keršienė, M. Esti, Prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* immobilized on a food-grade carrier for the production of gluten-reduced beer, *Food Control.* 110, 106987, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106987>.
- [117] R. Willaert, H. Verachtert, K. van den Bremt, F. Delvaux, G. Derdelinckx, *Bioflavouring of Foods and Beverages, Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, pp. 355–372, 2005.
- [118] A. Durieux, X. Nicolay, J.-P. Simon, *Application of Immobilisation Technology to Cider Production: A Review, Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, pp. 275–284, 2005. https://doi.org/10.1007/1-4020-3363-X_16.
- [119] C. Caldini, F. Bonomi, P.G. Pifferi, G. Lanzarini, Y.M. Galante, Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine, *Enzyme and Microbial Technology.* 16, 286–291, 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90168-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90168-6).
- [120] G. Spagna, R.N. Barbagallo, A. Martino, P.G. Pifferi, A simple method for purifying glycosidases: α -l-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine, *Enzyme and*

- Microbial Technology. 27, 522–530, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00236-2).
- [121] K.P. Dhake, D.D. Thakare, B.M. Bhanage, Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds, *Flavour and Fragrance Journal*. 28, 71–83, 2013. <https://doi.org/10.1002/ffj.3140>.
- [122] C.M.F. Soares, H.F. de Castro, J.E. Itako, F.F. de Moraes, G.M. Zanin, Characterization of Sol-Gel Bioencapsulates for Ester Hydrolysis and Synthesis, in: B.H. Davison, B.R. Evans, M. Finkelstein, J.D. McMillan (Eds.), *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Humana Press, pp. 845–859, Totowa, NJ, 2005. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_72.
- [123] A.R.M. Yahya, W.A. Anderson, M. Moo-Young, Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions, *Enzyme and Microbial Technology*. 23, 438–450, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00065-9).
- [124] S.H. Krishna, B. Manohar, S. Divakar, N.G. Karanth, Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: Optimization by response surface methodology, *J Amer Oil Chem Soc*. 76, 1483–1488, 1999. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0189-x>.
- [125] A. Sadighi, S.F. Motevalizadeh, M. Hosseini, A. Ramazani, L. Gorgannezhad, H. Nadri, B. Deiham, M.R. Ganjali, A. Shafiee, M.A. Faramarzi, M. Khoobi, Metal-Chelate Immobilization of Lipase onto Polyethylenimine Coated MCM-41 for Apple Flavor Synthesis, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 182, 1371–1389, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2404-9>.
- [126] N.C.A. Silva, J.S. Miranda, I.C.A. Bolina, W.C. Silva, D.B. Hirata, H.F. de Castro, A.A. Mendes, Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor, *Biochemical Engineering Journal*. 82, 139–149, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.015>.
- [127] K. Oyama, S. Irino, N. Hagi, [46] Production of aspartame by immobilized thermoase, *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 503–516, 1987. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(87\)36048-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(87)36048-3).
- [128] R. Das, H. Mishra, A. Srivastava, A.M. Kayastha, Covalent immobilization of B-amylase onto functionalized molybdenum sulfide nanosheets, its kinetics and stability studies: A gateway to boost enzyme application, *Chemical Engineering Journal*. 328, 215–227, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.019>.
- [129] Z. Grosová, M. Rosenberg, M. Rebroš, M. Šipocz, B. Sedláčková, Entrapment of β -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel, *Biotechnology Letters*. 30, 763–767, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9606-0>.
- [130] X.Y. Chen, M.G. Gänzle, Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics?, *International Dairy Journal*. 67, 61–72, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.001>.
- [131] Z. Kovács, E. Benjamins, K. Grau, A.U. Rehman, M. Ebrahimi, P. Czermak, Recent developments in manufacturing oligosaccharides with prebiotic functions, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 143, 257–295, 2013. https://doi.org/10.1007/10_2013_237.
- [132] R. Reshmi, G. Sanjay, S. Sugunan, Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis, *Catalysis Communications*. 8, 393–399, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2006.07.009>.
- [133] T. Noda, S. Furuta, I. Suda, Sweet potato β -amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose, *Carbohydrate Polymers*. 44, 189–195, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00226-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00226-5).
- [134] A.S. Rani, M.L.M. Das, S. Satyanarayana, Preparation and characterization of amyloglucosidase adsorbed on activated charcoal, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10, 471–476, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00116-2).
- [135] G.D. Kibarer, G. Akovali, Optimization studies on the features of an activated charcoal-supported urease system, *Biomaterials*. 17, 1473–1479, 1996. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)89771-7](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)89771-7).
- [136] M.-K. Chang, G. Abraham, V.T. John, Production of cocoa butter-like fat from interesterification of vegetable oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 67, 832–834, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF02540501>.
- [137] R. Aravindan, P. Anbumathi, T. Viruthagiri, Lipase applications in food industry, *IJBT Vol.6(2)*. 2007.
- [138] N. Sawamura, Transesterification of Fats and Oils, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 542, 266–269, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb25840.x>.
- [139] J. Pedroche, M.M. Yust, H. Lqari, J. Girón-Calle, J. Vioque, M. Alaiz, F. Millán, Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases, *International Dairy Journal*. 14, 527–533, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.11.002>.
- [140] X.L. Huang, G.L. Catignani, H.E. Swaisgood, Improved Emulsifying Properties of β -Barrel Domain Peptides Obtained by Membrane-Fractionation of a Limited Tryptic Hydrolysate of β -Lactoglobulin, *J. Agric. Food Chem*. 44, 3437–3443, 1996. <https://doi.org/10.1021/jf960038o>.
- [141] E.-L. Ticu, D. Vercaigne-Marko, R. Froidevaux, A. Huma, V. Artenie, D. Guillochon, Use of a protease-modified-alumina complex to design a continuous stirred tank reactor for producing bioactive hydrolysates, *Process Biochemistry*. 40, 2841–2848, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.003>.
- [142] P.C. Lorenzen, E. Schlimme, Characterization of trypsin immobilized on oxirane-acrylic beads for obtaining phosphopeptides from casein, *Z Ernährungswiss*. 34, 118–130, 1995. <https://doi.org/10.1007/bf01636945>.

[143] O. Park, H.E. Swaisgood, J.C. Allen, Calcium Binding of Phosphopeptides Derived from Hydrolysis of α -Casein or β -Casein Using Immobilized Trypsin, Journal of Dairy Science. 81, 2850–2857, 1998. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75844-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75844-8).

[144] K. Garg, A.C.B. Sharma, Continuous Production of Citric Acid by Immobilized Whole Cells of *Aspergillus Niger*, J. Gen. Appl. Microbiol. 38, 605–615, 1992. <https://doi.org/10.2323/jgam.38.605>.

