



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KETEN TOHUMU YAĞINDAN (LİNUM USİTATİSSİMUM L.) LİPAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**MURAT AKİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)

ANABİLİM DALI

**Danışman**  
**Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz DOĞAN**

**BURDUR-2025**



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KETEN TOHUMU YAĞINDAN (LİNUM USİTATİSSİMUM L.) LİPAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**MURAT AKİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)

ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz DOĞAN**

**BURDUR-2025**

## KABUL ve ONAY

### SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

*Murat AKİN* tarafından *Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz DOĞAN* yönetiminde hazırlanan “*Keten Tohumu Yağından (Linum Usitatissimum L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Sağlık ve Biyomedikal Bilimleri Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 16/01/2025

**Doç. Dr. Sıddıka ERSOY**  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Başkan

**Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz DOĞAN**  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Jüri

**Dr. Öğr. Üyesi Emine Hilal ŞENER**  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Jüri

## ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu .... / .... / .... Tarih ve ..... Sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

## TEŐEKKÖR

Bu teze iliŐkin yÖrÖtÖlen çalıŐmaların her safhasında maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen ve gerek nicel gerekse de nitel araştırma safhalarında yer alan ayrıca bilgi ve tecrÖbelerini benimle paylaŐarak yoluma ıŐık tutan saygıdeğer danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz DOĞAN'a

Bu tez çalışmasında öneri ve yardımlarıyla yanımda olan değerli kardeŐim Bilim Uzmanı Aziz AKİN'e

TÖm aileme en kalbi Őükranlarımı ve teŐekkürlerimi sunuyorum.



## ETİK BEYAN

***“Keten Tohumu Yağından (Linum Usitatissimum L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi”*** başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Şevkinaz Doğan danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazdığımı beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Murat AKİN

Tarih:

İmza:

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE: ENZİMLER	3
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi	3
2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	5
2.2.1. Oksido-redüktazlar	6
2.2.2. Hidrolazlar	6
2.2.3. İzomerazlar	6
2.2.4. Liyazlar	7
2.2.5. Ligazlar	7
2.2.6. Transferazlar	7
2.3. Lipazlar	7
2.3.1. Lipazların Yapısı ve Kaynakları	8
2.3.2. Lipazların Biyoteknolojik Açıdan Önemi ve Kullanımı	11
2.3.3. Endüstriyel Açıdan Lipazların Önemi ve Kullanımı	12
2.3.3.1. Gıda Endüstrisinde Lipazlar	13
2.3.3.2. Süt Endüstrisinde Lipazlar	13
2.3.3.3. Kozmetik Sanayisinde Lipazlar	14
2.3.3.4. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar	14
2.3.3.5. Biyosensör Olarak Lipazlar	15
2.4. Tez Çalışmasında Yer Alan Keten Tohumunun Özellikleri	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Kullanılan Malzemeler	18
3.2. Kullanılan Cihazlar	19
3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	19
3.4. Yöntem	22
3.4.1. Santrifüjleme	22
3.4.2. Diyaliz	22
3.4.3. SDS-PAGE	23
3.5. Keten Tohumundan Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	23
3.5.1. Besiyerinin Hazırlanması ve Ekim İşlemi	23
3.5.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme	24
3.5.3. Aktivite ve Protein Tayini	25
4. BULGULAR	27
4.1. Çalışma 1	27
4.2. Çalışma 2	29

4.3. Keten tohumu yağı ( <i>Linum Usitatissimum L.</i> )’ dan Elde Edilen Lipaz Enziminin Özelliklerinin İncelenmesi	32
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	45



## ŞEKİLLER

- Şekil 4.1.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) spesifik aktivite-zaman 28  
eğrisi
- Şekil 4.2.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) spesifik aktivite-zaman 29  
eğrisi
- Şekil 4.3.** SDS-PAGE ile moleköl ağırlığı tayini 2: Keten Tohumu Yağı (*Linum 31*  
*Usitatissimum L.*)



## TABLÖLAR

- Tablo 4.1.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) spesifik aktivite-zaman 28 değerleri
- Tablo 4.2.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) spesifik aktivite-zaman 30 değerleri
- Tablo 4.3.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*)’dan elde edilen lipaz 33 enziminin kısmi saflaştırılması (Çalışma 2)



## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ALA</b>	Aminolevulinik asit
<b>Ark.</b>	Arkadaşları
<b>BCA</b>	2,2- biçinolil 4,4- dikarbonik asit
<b>DHA</b>	Dokosaheksaenoik asit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EC</b>	Enzim Komisyonu
<b>EPA</b>	Eikosapentaenoik asit
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>mol.</b>	Moleküler ağırlık
<b>Ph</b>	Power of Hydrogen
<b>PUFA</b>	Çoklu doymamış yağ asitleri
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyumdodasilsülfat-poliakrilamid jelelektroforez
<b>TEMED</b>	N,N,N',N' – tetrametiletildiamin
<b>Vb.</b>	ve benzeri

## ÖZET

### Keten Tohumu Yağından (*Linum Usitatissimum L.*) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi

Enzimler, metabolizmada gerçekleşen reaksiyonlarda katalizör görevi üstlenen biyomoleküllerdir. Enzim teknolojisindeki gelişmeler, enzimlerin kullanım alanlarını genişletmiş ve ekonomik değerini artırmıştır. Bu nedenle, endüstriyel enzim araştırmaları biyoteknoloji alanında giderek daha fazla önem kazanmıştır. Bu çalışmada, öncelikle keten tohumu yağından (*Linum Usitatissimum L.*) lipaz enzimi saflaştırılmış, ardından enzimin potansiyel uygulamalarını daha iyi anlayabilmek amacıyla enzimatik özellikleri ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Enzim saflaştırma sürecinde lipaz enzimini etkin bir şekilde izole etmek için santrifüjleme ve diyaliz yöntemleri kullanılmıştır. Saflaştırılmış enzimin molekül ağırlığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE yöntemi uygulanmıştır. Saflaştırma işlemlerinin ardından, ham homojenatın spesifik aktivitesi 9.8 U/mg olarak ölçülmüştür. %80 çöktürme işlemi sonrasında ise çökelti spesifik aktivitesi 12.8 U/mg seviyesine yükselmiştir. Çökelti analizinde optimum sıcaklık ve pH kararlılığı değerlendirilmiş; ayrıca, inhibitör ve aktivatör etkileri incelenerek molekül ağırlığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Keten tohumu yağı, Lipaz enzimi, Saflaştırma.

## ABSTRACT

### Purification of Lipase Enzyme from Kefir and Investigation of Its Properties

Enzymes are biomolecules that serve as catalysts in metabolic reactions, facilitating various biochemical processes. Advances in enzyme technology have expanded the application areas and increased the economic value of enzymes. Consequently, industrial enzyme research has gained increasing importance in the field of biotechnology. In this study, lipase enzyme was first purified from flaxseed oil (*Linum Usitatissimum L.*), and then its enzymatic properties were analyzed in detail to better understand its potential applications. In the enzyme purification process, centrifugation and dialysis methods were employed to effectively isolate the lipase enzyme. The SDS-PAGE method was also applied to determine the molecular weight of the purified enzyme. Following the purification procedures, the specific activity of the crude homogenate was measured at 9.8 U/mg. After 80% precipitation, the specific activity of the precipitate increased to 12.8 U/mg. In the analysis of the precipitate, optimum temperature and pH stability were evaluated. Additionally, the effects of inhibitors and activators were examined to determine the molecular weight.

**Keywords:** Flaxseed oil, Lipase Enzyme, Purification

## 1. GİRİŞ

Enzimler, metabolizmada oluşan kimyasal ve biyokimyasal olayların hızlanmasında katalizör görevi üstlenen biyokatalizörlerdir. Bunlar, sadece katalizör olarak rol almakla kalmaz, eş zamanda hayvanlar, mikroorganizmalar ve bitki yapılarında salgılanan proteinlerin yapısında yer alan makro moleküllerdir (Pekin, 1980). Katalizör olarak enzimler, kimyasal reaksiyonların hızını çok büyük oranlarda artırır ve moleküllerin birbirine dönüşmesini sağlar. Bu süreçte, enzim yapısında herhangi bir değişiklik meydana gelmeden süreç tamamlanmış olur. Katalizör bulunmayan reaksiyonlara kıyasla, enzimlerin var olduğu reaksiyonlar birkaç milyon kat daha hızlı gerçekleşir (Singh, 2012; Uludağ, 2000).

Enzimler, etki ettikleri substratların veya katalizledikleri reaksiyon türlerinin isimlerine "-az" ya da bazı proteolitik enzimlerde "-in" eki eklenerek adlandırılmıştır. Ancak gelişen teknolojiler ve artan bilimsel çalışmalar neticesinde, bilinen enzim çeşitlerinin sayısı çok fazlalaşmış ve bu adlandırma sistemi yetersiz hale gelmiştir. Bu nedenle, her enzime Uluslararası Biyokimya Birliği (IUBMB) tarafından Enzim Komisyonu (EC) numarası verilerek bir tanımlama sistemi getirilmiştir. EC numaraları dört basamaklı bir dizilimle (EC x.x.x.x) ifade edilir (Erdoğan, 2020).

Lipazları, ilk kez 1856 yılında Claude Bernard tanımlamıştır. Kan plazmasında bulunan lipoprotein lipazlar ise 1943 yılında "temizleyici faktör" olarak nitelendirilmiştir. Hidrolaz enzim grubuna dâhil olan lipazlar (Triasilgliserol ester hidrolaz), bitki ve hayvansal yağların normal şartlarda ters etki hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar, "EC 3.1.1.3" numarasıyla tanımlanmaktadır. Trigliseritlerin hidrolizini katalizleyen lipazlar, bu reaksiyonlar sonucunda alkol ve karboksilik asitlerin oluşmasını sağlar. Yani, yağ ve yağ asitlerinin su ile parçalanmasına yardımcı olur. Lipazlar, mono-, di- ve trigliseritlerin yapısına göre çeşitlendirilmektedir (Bakkal, 2006; Sharma ve ark., 2001).

Lipazların doğal substratları gliserol esterleridir. Enzimlerin kimyasal tepkimelerden farklılaşan en önemli özelliği seçicilikleridir. Lipazların seçiciliği,

enzimin moleküler yapısı, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Bu seçicilik üç temel grupta incelenir: pozisyon seçiciliği, substrat seçiciliği ve stereo seçicilik. Lipazlar, esteraz enzimlerinin özel bir sınıfıdır ve yağları hidrolize ederek gliserol ve yağ asitlerine parçalar (Öztürk, 2013).

Keten tohumu, insanlık tarihi boyunca yetiştirilen en eski mahsuller arasındadır. Tarihi, M.Ö. 6000 yıllarına kadar uzanır. Latince "çok kullanışlı" anlamına gelen *Linum usitatissimum* adıyla bilinen keten tohumu, çoğunlukla Arjantin, Çin, Hindistan, ABD ve Kanada gibi ülkelerde yetiştirilmektedir. ABD'de elyaf üretiminde kullanılan keten tohumu, aynı zamanda yenilebilir bir yağlı tohum ve tahıldır. Günümüzde fonksiyonel bir gıda ürünü olarak önem kazanmıştır (Wang ve ark., 2007; Şenkal, 2022).

Bu çalışmanın amacı, keten tohumu yağından (*Linum usitatissimum L.*) lipaz enziminin saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesidir. Bu kapsamda, çalışmanın kavramsal çerçevesinde enzimlere genel bir bakış sunulmuş, materyal ve metotlar belirlenmiş ve elde edilen bulgular ile sonuçlar detaylı bir şekilde ele alınmış ve incelenmiştir.

## 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE: ENZİMLER

### 2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler metabolizmada meydana gelen, kimyasal ve metabolizmal olayların oluşmasında katalizör görevi üstelenen biyokatalizörlerdir. Enzimler hem katalizör olarak bulunurken hem de hayvanlar, mikroorganizmalar ve bitki yapılarının içerisinde salgılanan proteinlerin yapısında yer alan makro moleküllerdir (Pekin, 1980). Proteinlerin yapısı biçim olarak, sarmal bir yapıda kıvrımlı yüksek molekül ağırlığına sahip bir görünümde dirler. Proteinlerin yapısında bulduklarından dolayı enzimlere metabolik proteinler de denilebilmektedir. Enzimlerin yapısı incelendiğinde, içerisinde; oksijen, azot, hidrojen ve karbon gibi elementler bulunmaktadır. Hücre içerisinde biyokimyasal biçimde meydana gelen tepkimelerde katalizör görevi görmektedir. Bunun yanı sıra enzimler, biyokimyasal şekilde meydana gelen olayların vücutta yaşam ile mevzun bir biçimde oluşmasında rol oynayan maddeler bütünüdür (Aehle, 2012).

Katalizör olarak enzimler, kimyasal tepkimelerin hızını artırma ve moleküllerin diğer moleküllere dönüştürülmesinde görev alırlar. Bu görev esnasında enzimin yapısında bir değişiklik gerçekleşmemektedir. Enzimin yapısında değişiklik görülmezken katalizörün bulunmadığı tepkimelere oranla enzimin var olduğu tepkimelerin hızları bir veya birkaç milyon kat daha yüksek gerçekleşmektedir (Singh, 2012; Uludağ, 2000). Enzimlerin tepkime sonucu etkilediği maddelere “substrat” adı verilmektedir. Enzimlerin etki ettikleri substrat ya da katalize ettikleri tepkime tiplerinin adının sonuna “-az” eki (örneğin; oksidaz, karboksilaz vb.) olarak belirtilir. Bunun yanı sıra bazı enzimlerin (proteolitik grubu) isimlerinin sonuna ise “-in” eki (tripsin, papin, vb.) getirilerek adlandırılır (Kuzu, 2008; Robinson, 2015).

Enzimlerin kullanımı insanlık tarihinin ilk çağlarına kadar uzanmaktadır. Eski çağ ilkel topluluklarında, bazı türlerin üretimi, insan yaşamı için gerekli yiyecek ve içeceklerin işlenmesinin yanı sıra deri üretmek için derilerin tabaklanmasında da bilmeden de olsa enzim aktivitelerinin uygulanmasını içeriyordu. 19. yüzyıla gelindiğinde gelişen biyokimya faaliyetleri neticesinde dönemin bilim insanları

tarafından enzimlerin doğası ve çalışma biçimleri üzerinde çalışmalar yapılmış ve anlaşılmıştır. Bu çalışmalar 1760-1825 yılları arasında etkili olmuştur.

Kimyager Jöns Jacob Berzelius tarafından 1825 yılında ilk kez enzimlere yönelik çalışmayı, nişastanın sindiriminde önemli rol oynayan bitkisel kaynaklı etkiler üzerinde olmuştur. Fransa'da Jean-François Persoz ve Anselme Payen 1833 yılında amilolitik bir maddenin çimlenmiş arpadan izolasyonunu anlatmıştır. Pasteur ise fermantasyon enzimleri üzerinde çalışmalar yapmış ve bu etkileşimden dolayı "ferment" adı kullanılsa da 1878 yılına gelindiğinde Wilhelm Kühne tarafından enzimler mayalardan elde edildiklerinden Yunanca'da "mayada oluşan" (in yeast) anlamına gelen "enzim" olarak değiştirilmiştir (Onat ve ark., 2002; Polaina ve MacCabe, 2007).

Enzimler genellikle, büyük oranda katalitik aktivite içermektedir. Seçici ve spesifik olma gibi özellikleri bulunmaktadır. Enzimlerin en önemli görevi canlı organizmalardaki kimyasal tepkimeleri hızlandırmaktır. Doğal yaşam döngüsünün devamı açısından hayati etkide olan metabolik olaylar ele alındığında enzimlerin yapısında gerçekleşen binlerce spesifik tepkimenin, yüksek oranda katalitik aktivite ile meydana gelmesinde etkili maddelerdir (Nelson, 2004). Enzimler metabolik görevleri de dâhil nerede ise hayatın her alanında karşılaşılabılır maddelerdir. Hücre içerisinde gerçekleşen tüm olaylar DNA etkisiyle kontrol edilerek düzenlenmektedir. Bu duruma sebep olan olay ise; enzimler proteinin içerisinde yer aldığından ve DNA tarafından şifrelenmesidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

Hayati fonksiyonların devamlılığında kimyasal tepkimelerin vücutta gerçekleşmesi sonucuyla olmaktadır. Bu sebeple enzimler, yaşamsal fonksiyonların devamında merkezi konumdadır. Enzimler metabolik fonksiyonlarının yanı sıra tıp biliminin teşhis konma ve tedavi döneminde, süt ve süt ürünlerinin yapımında, gıda ve temizlik malzemelerinin üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Enzimlerin bu denli geniş çaplı bir kullanım alanının olma sebeplerinden bazıları; düşük maliyet, İn-vitro şartlarında aktif olması ve zararsız bir etkide olmasından kaynaklanmaktadır (Nelson ve Cox, 2005; Wiseman, 1987).

Hayati açıdan önemli ve kimyasal tepkimelerde merkezi görevde bulunan enzimler bu durumlarının yanı sıra kararlı haldeki hücreler oluşturan moleküller enzimler olmadan tepkimelere girememektedir. Bu çerçevede insan vücudunda 4000 enzimin olduğu ve bu sebeple de yapılarında gerçekleşen tepkimelerdeki katalize uğrattıkları molekül yapılarından daha büyük oldukları sonucuna ulaşılmaktadır (Keha ve Kührevioğlu, 2018). 4000 tane enzim bilinmekle beraber tahmini 200 tanesi de ticari faaliyetlerde kullanılmaktadır. 3000 tanesi de gelişen teknolojik faaliyetler neticesinde enzim saf preparat halde tespit edilmiş ve kullanılmaktadır (Fucinos ve ark., 2005).

## 2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, etkiledikleri substratın veya katalizledikleri tepkimelerin tipinin adının sonuna “-az” ya da bazı proteolitik enzimler adının sonuna “-in” eki alarak sınıflandırılmıştır. Fakat gelişen teknolojik faaliyetler ve enzimler üzerine artan çalışmalar neticesinde bilinen enzimlerin sayısı (1000’lerce çeşit) artmakta ve isimlendirmelerde zorlanılmıştır. Bu sebepten dolayı her enzime Uluslararası Biyokimya Birliği (IUBMB) tarafından Enzim Komisyonu (EC) numarası ile tanımlanmaya başlanmıştır. Buna göre EC numarası 4 rakamlı (ECS x.x.x.x şeklinde) bir numara verilmiştir (Erdoğan, 2020). Bu numaralara göre enzimlerin sınıflandırılmasında;

- Birinci rakam, enzimin içerisinde yer aldığı altı sınıftan hangisinde olduğunu,
- İkinci rakam, enzimin dâhil olduğu alt sınıfı (Subclass),
- Üçüncü rakam, enzimin alt sınıfı (Sub-Subclass),
- Son rakam ise enzimin sub-subclass içerisinde yer alan seri numarasını temsil eder (Sarı, 2017).

Örneğin; lipazlar, bu çerçevede E.C 3.1.1.3 olarak isimlendirilmiştir. Bu çerçevede enzimler katalizlenen tepkime şekline göre 6 sınıfa ayrılmıştır. Bu gruplar; oksido-redüktazlar, izomerazlar, hidrolazlar, liyazlar, ligazlar ve transferazlardan

oluşmuştur (Robinson, 2015). Lipazlar ise hidrolazlar grubu enzimlerin içerisinde yer almıştır.

### **2.2.1. Oksido-redüktazlar**

Redoks, reaksiyonları katalize eden bütün enzimleri kapsar. Dehidrogenaz ismi önerilse de redüktaz da kullanılmaktadır. İndirgenme ve yükseltgenme durumlarını katalize eden enzimler olarak bilinmektedir. Bu enzim grubunda yer alan dehidrogenaz ve oksidaz reaksiyonların düzenlenmesinde rol oynar. Dehidrogenaz hidrojenin taşınmasında ve aktarılmasında rol oynarken oksidaz ise elektronları aktarır ve elektronların kaybedilmesinde etkilidir (Gerze, 2003).

### **2.2.2. Hidrolazlar**

Büyük moleküllerin yıkılmasında, 1 mol (18,01508 gram) suyun iyonları aracılığıyla reaksiyona katılmasını veya diğer grupların suya dönüşmesini katalizleyen enzim grubudur (Akkurt, 2023). Ester, peptid, glikoz ve asitanhidrit gibi bağları hidroliz etmektedir. Alt gruplarında; proteazlar, esteraz ve lipazlar, karbohidrazlar, fosfatazlar ve amilazlar enzimleri yer almaktadır.

### **2.2.3. İzomerazlar**

Optik veya geometrik izomerlerin rasemizasyonunda yer alan enzim grubudur. Yani molekül içerisinde yer alan geometrik veya yapısal ayarlamaları katalizler, İzomerazlar moleküllerde değişim oluşturarak uzaydaki dizilimlerini katalizleme görevini üstlenmektedir. Molekül üzerinde fonksiyonel olarak grupların yer değiştirmesinde etkisi olduğunda enzim mutaz adını almaktadır (Gerze, 2003). İzomerazların alt sınıfları;

- Rasemazlar ve epimerazlar,
- İntramoleküler oksidoredüktazlar,
- Cis-trans izomerazlar,
- İntermoleküler transferazlar,

İntramoleküler liyazlar ve diğçerleridir (İlgün, 2016).

#### **2.2.4. Liyazlar**

Susuz alanda yer alan grupların uzaklaştırılmasını katalize eder. Aldolaz, sentaz ve dehidrataz gibi isimleri bulunmaktadır. Organik bir molekülde yer alan grupların hidrolitik veya oksidatif olmadan ayrılmasını katalizler. Karbon- Azot (C-N), Karbon- Karbon (C,C), Karbon-Oksijen (C-O) benzeri gruplar arasında yer alan tekli bağların kırılmasında rol oynayarak substrattan bir grubun ayrışmasını ya da substrattaki çift bağı oluşturarak bazı grupların ayrılmasını katalize eden enzim grubudur (Bülbül, 2019).

#### **2.2.5. Ligazlar**

İki molekül arasında meydana gelen birleşmeyi katalize etmektedir. Bu birleşme sırasında ihtiyaç duyulan enerjiyi yüksek enerjili (adenozin trifosfat ve Adenozin difosfat gibi) fosfat bileşiklerinden temin ederek substrat moleküllerinin birleşmesini katalize eden enzimlerdir.

#### **2.2.6. Transferazlar**

Transferazlar, metil, amino, fosfat, tek karbonlu, keton veya açil gibi grupların bir maddeden diğçerini aktarımını katalize eden enzim sınıfındadır. Kısacası moleküller arasında hidrojen haricindeki bir atomun veya atom gruplarını katalize eder. Kreatin kinaz, alanin aminotransaminaz ve aspartat transaminaz bu enzim grubunda yer almaktadır. Normal şartlarda önerilen ismi grup-transferazlar ya da verici grup transferaz olarak nitelendirilir (Gerze, 2003).

### **2.3. Lipazlar**

Clause Bernard lipazları 1856'da ilk kez tanımlamıştır. Kan plazması içerisinde yer alan lipoprotein lipazlar, 1943 yılında "temizleyici faktör" olarak nitelendirilmiştir. Enzim gruplarından hidrolaz sınıfında yer alan lipazlar

(Triasilgiliserol ester hidrolaz); bitki ve hayvansal yağların normal şartlarında tersinir hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Lipazların numaralandırılması, “EC 3.1.1.3” şeklindedir. Trigiseritlerin hidrolizini hem katalizler hem de tepkimelerin katalizler bunun sonucunda alkol ve karboksilik asitler ortaya çıkmaktadır. Yani yağ ve yağ asitlerinin su ile parçalanmasına yardımcı olur. Lipazların bileşimi “mono, tri- ve di- olarak üç şekildedir (Bakkal, 2006; Sharma ve ark., 2001).

Lipazlar gerek sulu gerekse de susuz ortamlarda meşakkatli reaksiyonları meydana getiren önemli biyokatalizörler arasında yer bulmaktadır. Bunun nedeni ise substrat aralığının geniş olması, yüksek sıcaklıklara, pH ve organik çözücülere, enantiyoselektivite gibi durumlara karşı kararlı bir pozisyon sergileme yeteneklerindedir. Bu durumundan dolayı da lipazlar, birçok biyoteknolojik (gıda, süt ürünleri, deterjan...) alanda kullanılmakta ve biyokatalizör özelliklerinden dolayı da birçok yeni alanda kullanılmaktadır (Akbulut, 2014). Bu özellikler;

- Sıcakların azalmasıyla esterleşme,
- Transesterleşme
- Hidroliz reaksiyonlarını düşük sıcaklıkta katalize etmeleri,
- Lipazların bölgesel belirleyici özellikleri,
- Ester bağına özgün olması,
- Yüksek oranda substrat seçicilikleri,
- Yan etkisi olan ürünlerin oluşumunu engellemesidir.

Lipazlar yukarıda belirtilen özellikleri ve potansiyel biyokatalizör olmasının sayesinde günümüzde eczacılar, biyokimya mühendisleri, organik kimyacılar gibi birçok bilim insanının tercihi arasında bulunan başlıca enzimlerdendir (Sexana, 1999).

### **2.3.1. Lipazların Yapısı ve Kaynakları**

Lipazların doğal substratı gliserol esterlerdir. Enzimleri kimyasal tepkimelerden farklılaştıran yegâne özelliği seçiciliğidir. Lipazların seçicilik özelliği, enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen etmenler tarafından kontrol edilmesidir. Lipazlar spesifik üç temel grupta

gösterilmektedir. Bunlar; substrat, pozisyon ve stereo seçiciliktir. Lipazlar esteraz enzimlerinin özel bir sınıfı olmakta ve yapı olarak yağlar üzerinde etkilidir. Yağları hidrolize ederek yağları gliserol ve yağ asitlerine parçalamaktadırlar (Öztürk, 2013).

Lipazlar genel olarak “C” ve “N” olmak üzere ikiye ayrılmış olan bir polipeptit zincirinden meydana gelmektedir. Bu kısımlardan N- kısmı, katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzunca bir yağ asidi zincirinin taşıyan hidrofobik bir kanal ve aktif merkezi kapsar (Akoh ve Min, 1998). Lipaz grubunda yer alan enzimlerin farklı düzeylerdeki benzerliklerinin yanı sıra bir pentapeptit “GXSXG” (Glisin-X-Serin-X-Glisin) sıralaması büyük oranda gözlemlenmiştir. Bu tarz serin amino asidinin yapılarının korunması, dönüşmesi ya da yer değiştirmesi veya katalitik aktivitenin son bulması hususlarında kataliz için elzem olduğunu göstermiştir (Elmalı, 2017).

Lipazlar katalizör olarak görev yaptığı esterleşme reaksiyonların mekanizma şekli serin hidrolazlara benzetilmiştir. Bu mekanizmanın sonunda iki tane tetrahedral yapıya ara bileşik ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan tetrahedrallerden ilki ara bileşik katalitik üçlüdeki serin rezidisinin asit üzerine çıkan nükleofitik atağı sonucu oluşmaktadır. İkincisinde ise alkol molekülü açıl-enzim kompleksine nükleofil şekilde saldırır ve bu şekilde tetrahedral oluşur. Sonuç olarak bir ester molekülü kaybedilip enzim doğal formunu kazanmış olur (Faiz, 2005). Lipazların molekül ağırlığı yaklaşık olarak “19-60 kDa” ağırlığında. Primer bir yapıda olmasına rağmen çeşitli orijinleri olan lipazların aminoasit sıralarında farklılık sergilediği belirtilmektedir (Hasanzade, 2023).

Lipazların hidroliz, esterifikasyon ve transesterifikasyon olmak üzere üç tip reaksiyonda katalizör görevi vardır. Hidroliz görevi, ortamın su oranı ele alındığında, suyun fazla olduğu ortamlarda meydana gelen olaydır. Reaksiyonda ester hidrolizi baskındır. Esterifikasyon, susuz veya oranca düşük su ortamlarında meydana gelir. Transesterifikasyon ise ester yapısında bulunan asit bölümlerinin yer değiştirmesi ile meydana gelmektedir (Divakar, 2007). Lipazlar, su ve yağ yüzeylerinde etki gösteren aktif olduğu bölgede serin bulunan hidrolozlardandır. Lipazların üçlü yapısına bakıldığında ise alfa-Beta hidrolaz katlanması içerdiği bilinmektedir. Lipazların büyük

bir bölümü hücre dışı salgılanan ve ağırlığı 19-60 kDa arasında değişen asidik glikoproteinler olarak görülmektedir (Villeneuve ve ark., 2000).

1990-1995 yılları arasında lipazların çözünürlük değerlerinde üzerinde yapılmış olan birçok araştırmada, substratlarda boyut ve sıralama bakımından farklılıklar olsa dahi çoğunluğunun birbiriyle benzer özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda ise lipazların üçlü yapısının hidrojen bağlarıyla sabitleştirilmiş olduğu görülmüştür (Jaeger ve Reetz, 1998). Safılaştırılmış birçok lipaz enziminde %12 ila %15 arasında karbonhidrat içerdiği görülmektedir. Bakteriler, memeliler ve fundal kaynaklı lipazların primer yapıları belirlenmiş ve aminoasit sayıları 270 ila 641 arasında değişiklik göstermiştir. Bütün lipazlarda “ $\alpha/\beta$ -hidrolaz katlanması” şeklinde tanımlanan karakteristik bir katlanma biçimi ortaya koymaktadır. Lipazların iç kısmında sekiz farklı  $\beta$  zincirinden ( $\beta 1$ -  $\beta 8$ ) oluşmaktadır. Merkezi  $\beta$ -tabakası ve bunu çevreleyen altı adet  $\alpha$ -heliks zincirinden oluşmaktadır (Jaeger, 1998).

Genel olarak bitkisel kaynaklardan, hayvansal dokulardan, mikrobiyal ve mikro organizmalardan temin edilmektedir. Bitkisel lipazlar, bitkilerin kökünde, kabuğunda ve katman dokusunda yer almaktadır. Hayvansal lipazlar ise vücut ve doku sıvılarında yer almaktadır. Pek çok mikroorganizma türünün bünyesinde ise doğal halde bulunurlar. Bu mikroorganizma türlerinden en çok kullanım alanı bulan mikrobiyal kaynaklı olanlardır. Bu durum sebebi; kolay üretilmesi ve çoğu hidrolik ve sentetik tepkimeyi katalize edebilmesinden kaynaklıdır. Lipaz enzimleri açısından zenginlik besleyen pankreas, hayvansal lipazların elde edilmesinde önemli bir alandır. Yağ oranı yüksek olan bütün bitkilerde (örneğin; ayçiçeği, zeytin vb.) lipaz enzimi bulunmaktadır (İlgün, 2016).

Mikrobiyal lipazlar, çoğunlukla bakteri ve mantarlardan oluşmaktadır. Mikroorganizmaların genetiklerine ve üretim safhalarına kolay müdahale edilebildiğinden dolayı bakteriyel lipazlarda diğer lipazlara oranla daha çok çalışma yapılmaktadır. Bakteriyel lipazlar yapısı bakımından, lipoprotein ve glikoproteindir. Fungal lipazlar ise düşük maliyet, substrat spesifilikleri ve pH kararlılıkları gibi aktivitelerinin yüksek olmasından kaynaklı olarak bakteriyel lipazlara göre çok

kullanılır ve araştırma konularına çoğunlukla limon, ekme ve toprak gibi alanlardan üretilen mantarlardan yararlanılarak kullanılır (Göven, 2023).

Bitkisel lipazlar mikrobiyal lipazlardan sonra en çok kullanılan lipazlardır. Yüksek oranda triaçilgliserol içeren bu lipazlar bitkisel kaynaklı dokulardan üretilir fakat triaçilgliserolleri hidrolize hızları diğer lipazlara oranla düşüktür. Kullanımlarının yaygın olma sebebi ise kolay bulunabilmeleri, oda sıcaklığında yüksek oranlı aktiviteye sahip olması ve maliyetinin düşük olmasıdır. Bitkisel kaynaklı lipazların fizyolojik karakterleri tam anlamıyla açıklanamamıştır (Akkurt, 2023).

Hayvansal lipazlar diğer lipazlara göre daha az çalışma alanına sahiptir. Çoğu memeli, balık ve böcekten lipaz enzimi saflaştırılmıştır. Hayvansal lipazlara örnek olarak bağırsak lipazı, karaciğer lipazı ve pankreas lipazı verilebilir. Daha çok ticari uygulamalarda kullanım alanı bulmakta fakat temin edilme zorluğu ve endüstriyel potansiyelin artmasından ötürü diğer lipaz kaynaklarına yönelim hayvansal lipazlara oranla daha çok olmuştur (Mehta ve ark., 2017).

### **2.3.2. Lipazların Biyoteknolojik Açıdan Önemi ve Kullanımı**

Enzim teknolojisinin gelişim göstermesi, bu alanda kullanılan ürünlerin kullanım sahalarında oluşan çeşitlilik ve iktisadi değerlerinde artış yaşanması gibi gelişmelerden dolayı biyoteknolojinin endüstriyel enzimler üzerinde yürütülen çalışmalar daha da önemli olmaktadır. Literatürde bulunan verilere bakıldığında biyoteknolojide kullanımda olan enzimlerin ortalama %25'i lipazlardan oluşmaktadır (Mutlu, 2006). Bu alanda lipazların kullanımı gıda katkı maddesiyle deterjanların imalatı safhasında görülmektedir. Bu sebepten ötürü lipazlar biyoteknoloji alanında önemli bir katalizör olarak yer almaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998).

Lipazlar biyoteknolojik gelişmelerde ve endüstriyel alanda kullanımı lipazların enzim endüstrisindeki değerine olumlu katkı sağlamaktadır. Bu alanda lipaz enzimleri biyotransformasyonla ve biyoteknoloji araçları olarak görülmekte ve kullanılmaktadır. Biyoteknolojide genel olarak tercih edilen lipazlar çoğunlukla mikroorganizma kaynaklardan olan mantarlardan elde edilmektedir. Lipaz oluşturan mikroplar doğaya

yaygın bir biçimde dağıldıklarından bu alanda kullanılan ve ön plana çıkan özellikleri bulunan lipazları üreten mikropları belirlemek amacıyla doğal yaşam alanlarının araştırılması önem kazanmaktadır (Hasanzade, 2023).

### 2.3.3. Endüstriyel Açıdan Lipazların Önemi ve Kullanımı

Enzim teknolojisinin ilerlemesi, ekonomik değerlerinin yüksek olması ve farklı kullanım alanları gibi sebeplerden dolayı endüstriyel enzimleri kapsayan alanlarda çalışmalar yapmanın önemi artmıştır. Bu alanda kullanılan enzimlerin büyük oranı mikrobiyal kaynaklıdır (Parabhu ve ark., 1999). Endüstriyel alanda lipazların değerli ve tercih edilmesi (Hasanzade, 2023);

- Önemli biyokatalizör olmaları,
- Hem sulu hem de organik sistemlerde çeşitli tepkimelerdeki gereksinimleri,
- En iyi komoselektivite, regiyoselektivite ve stereoselektivite ortaya koyabilmeleri,
- Doğal çözücülüklerdeki stabil özellikleri,
- Mikroorganizmalarla beraber kullanıldığında yüksek sayıda ve kolay bir üretim alanı oluşturmaları,
- Çoğu lipazın yapısal özelliklerinin bilinir olması,
- Kofaktöre ihtiyaç duymaları,
- Yan tepkimeleri katalize etmemeleri gibi sebeplerden dolayıdır.

Lipaz sınıfı enzimlerin endüstriyel alanda kullanımı temel olarak, süt endüstrisi, kozmetik sanayisi ve bazı peynirlerin üretilmesinde vazgeçilmez önem taşımaktadır. Bunun yanında katı-sıvı yağ üretimi, tereyağına aroma vermede, ziraat ilacı imalatında, çikolata endüstrisinde ve karamellerin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak “petrol endüstrisinde ve atık yağ hidrolizinde” biodizel üretiminde önemli rol oynamaktadır (Gül, 2013). Lipazlar, gıda, deterjan, biyomedikal uygulamalar, biyodizel, biyosensörler ve parfüm sanayi, kozmetik, deterjan, organik kimya, deri sanayisi, zirai kimya, çevre yönetimi vb. birçok endüstriyel sahada kullanım alanı bulmaktadır.

### 2.3.3.1. Gıda Endüstrisinde Lipazlar

Sıvı ile katı yağlar ve yağ asitleri gıda ve gıda endüstrisinin önemli parçalarındandır. Lipaz enzimi, trigliseridlerdeki fiziksel özellikleri, tadı ve besin değeri; gliserol omurgasında yer alan yağ asitlerini değiştirerek, zincir uzunluğunu ve doyma derecesini değiştirmektedir. Bu değişim hem lipitleriz özelliklerini etkilemekte hem de talep edilen lipitlerin oluşturulmasında önemli bir katkı oluşturmaktadır. Bu şekilde elde edilen gıda ürünleri endüstri piyasasında önemli role sahiptir (Sharma ve ark., 2001).

Gıda maddelerinin tüketim ömrünü kısaltan mikroorganizmaların bazı gıda toksinlerini hızlıca saptamakta lipazın bir gösterge olarak gıda endüstrisinde kullanılabileceği görülmüştür. Ayrıca gıdalarda çürümelere sebep olan piskotrof organizmaları üzerindeki etkilerin giderilmesinde lipazların kullanımı önemli hale gelmiştir (Kuo, 2002). Lipazların gıda alanında kullanımı, yiyecek ürünlerine hacimli bir yapı kazandırmasının yanı sıra lezzetinde, kokularında ve daha kısa halkalı yağ asitlerinin alkol esteri üzerinde olumlu bir etki oluşturularak ve ürünlere takviyesi sağlanmıştır (Öztürk, 2002).

### 2.3.3.2. Süt Endüstrisinde Lipazlar

Lipaz enzimleri süt ve süt ürünleri endüstrisinde, süt yağını hidrolize etmek amaçlı yaygın bir kullanım alanı mevcuttur. Süt ürünlerinden olan peynirin aromasını artırmak, peynirin olgunlaşma süresini kısaltmak, peynir benzeri gıdaların imalatı, tereyağı ve krema lipozini ve kaymak hidrolizi gibi alanlarda kullanımı görülmektedir. Bunun yanı sıra lipaz enzimi, kremanın tadını ve şekerleme ile karamelin tereyağlı dokusunu oluşturmak amacıyla ve kahve kremasında süt tadını ortaya çıkarmak içinde kullanılmaktadır (Onat ve ark., 2002).

Süt endüstrisinde kullanılan lipazların süt ve süt ürünlerine eklenmeden önce kısa zincirli olan C<sub>6</sub> ve C<sub>4</sub> asitlerini uzaklaştırırken keskin ve fresh aromayı ortaya çıkartır. Daha sonra orta zincirli C<sub>14</sub> ve C<sub>12</sub> yağ asitlerinin üründen uzaklaştırılmasıyla sabun benzeri bir tat oluşturmaktadır. Sıradan kimyasal tepkimemeler yerine “serbest

yağ asitleri, asetoasetat,  $\beta$ -keto asitleri, metil ketonları, aroma asitleri ve laktonlar vb.” diğler aroma içeriklerinin karışımını başlatan basit kimyasal tepkimler gelmektedir (Saxena v ark., 2008).

### **2.3.3.3. Kozmetik Sanayisinde Lipazlar**

Lipaz enzimi, temizleme, sürfaktanlar, aroma, yumuşatma ve renk verme gibi amaçlarla, kozmetik ve parfüm sanayisinde başlıca yapı bileşeni olarak kullanılabilir. Bu alanda kullanılan sürfaktan monoçilgliseroller, gliserolün ve diaçilgliseroller lipazlar aracılığıyla katalize olan esterifikasyon tepkimeleri neticesinde oluşmaktadır. Lipazlar aracılığıyla üretilen kozmetiklerin ana bileşenlerini, karışık asit poliesterler ve açilgliserol ester yağ asitleridir (Pandey ve ark., 1999).

### **2.3.3.4. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar**

Lipaz kullanımının yaklaşık %32’si deterjan endüstrisinde gerçekleşmektedir. Bu sektörde kullanılan lipazlar çevreci olarak öne çıkmaktadır. Yağları hidrolize edebilmelerinden dolayı çamaşır ve ev temizlik ürünlerinde katkı maddesi olarak yer almaktadır. Düşük ısıda bile deterjanın aktifliğini muhafaza etmesi gereksiz enerji ihtiyacını sürkülle etmektedir. Kumaş tarzı ürünlere bulaşan yağ lekelerinin içerisindeki trigleseritlerin çıkartılmasındaki zorluk sebebi ile lipazlar kullanılmaktadır. Sebebi ise alkali ph’da yüksek işlevselliğe sahip olmalarından ve anyonik yüzey aktif maddeleri deterjanların içerisinde kullanılmaktadır (Kojima ve ark., 1994).

Eski dönemlerde kimya endüstrisinde deterjanlar için katkı maddesi oluşturması amacıyla lipaz bakımından doygun olan sığır ve domuz pankreası kullanılmaktaydı. Deterjanların içerisinde yer alan lipazlar lekelerle karşı doğal bir temizleme sağlamaktadır. Deterjan sektörünün yanında temizleyici özelliklerinden dolayı lipazlar tercih edilmektedir. Bu durumda endüstriyel enzimlere olan talebi artırmaktadır. Kuru temizleme, boruları tıkayan yağ atıklarının çözülmesinde kontak lens temizliğinde ve deri yüzeylerinin temizlenmesinde çevreci bir yaklaşımla

varlığını sürdürmektedir. Kumaşların içerisinde yer alan lifli yapıdaki yağları çözerek hem daha yumuşak bir yapı oluşturmakta hem de bozulmalara engel olarak eski canlı renklerinde kalmasına olanak sağlamaktadır.

### **2.3.3.5. Biyosensör Olarak Lipazlar**

Bünyesinde biyolojik bir sensörü barındıran ve fizokimyasal bir çevirici ile bütünleştirilmiş analitik cihazlara biyosensör (biyoalgıcı) denilmektedir. Biyosensörlerin amacı, analiz edilecek olan madde miktarıyla orantılı bir biçimde sürekli bir sayısal elektriksel sinyali üretmektir. Biyosensörler, biyokimyasal, biyolojik, elektronik ve kimyasal bileşenlerden meydana gelmektedir (İlgün, 2016). Lipazların bir biyosensör olarak kullanılmasındaki temel etken, numune içerisinde yer alan triaçilgliserolden gliserol üretmesi ve ortaya çıkan gliserolün miktarını oluşturmaktır. Biyosensörlerin bileşenleri içerisinde, enzimler, antikorlar, hücreler ve hücre özütleri yer almaktadır. Kullanım alanlarından bazıları, katı-sıvı yağ endüstrisi, gıda teknolojisi ve klinik uygulamalar sayılabilir. Bunun yanı sıra gıda, içecek, tıptaki uygulamalar, pestisit ve kirlilik kalıntılarının analizini yapmakta da kullanılmaktadırlar.

### **2.4. Tez Çalışmasında Yer Alan Keten Tohumunun Özellikleri**

Keten tohumu, insanlık tarihi açısından yetiştirilen mahsuller arasından en eskilerdendir. İlk yetiştirilme tarihi milattan önce altı binli yıllara dayanmaktadır. Keten tohumu Latince “çok kullanışlı” anlamına gelen *Linum Usitatissimum*'dur. Yetiştirilme alanları ağırlıklı olarak Arjantin, Çin, Hindistan, Amerika ve Kanada'dır. Giyim sektöründe elyaf üretimi amacıyla ABD'de kullanılmıştır (Wang ve ark., 2007). Yenilebilir keten tohumu, yağ içerikli bir tohum ve tahıl olmakla beraber en eski ekilebilir üründür. Günümüzde ise fonksiyonel bir gıda ürünü haline gelmiştir (Şenkal, 2022).

Keten tohumunun tüm parçaları farklı ticari alanlarda kullanılmaktadır. 20. yüzyılın sonlarına kadar kâğıt ve keten bezi üretiminde görülürken keten tohumu yağı ve oluşan alt ürünleri hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda sağlık

konularına faydaları sebebiyle diyet ve hastalık gibi alanların ilgisini çekmiştir. Linaceae familyasında yer alan bu ürünün %52'si zengin omega-3 yağ asidi içeren ALA kaynağıdır (Sharav ve ark., 2014). Keten tohumunun kütesinde %51 ila %55 arasında ALA, %32 ila %45 arasında yağ varken %15 ila %18 linoleik asitten oluşmaktadır (Prasad, 2009). Soğuk havayı seven yağlı bir üründür. Reaksiyonlar sonucu ketenin yapısına göre uygun olmayan işleme ve saklama durumlarında keten tohumunun yağ oksidasyonu keten tohumunun besin değerini düşürürken tadında da bir değişime sebep olmaktadır. Keten tohumunun içeriğinde;

- Lignanlar
- Fenolik asitler
- Antosiyanin pigmentleri
- Flavonlar
- Fitik gibi biyoaktif bileşikler içermektedir.

Keten tohumundan farklı ürünler elde edilmektedir. Bunlardan biri de keten tohumu yağıdır. Keten tohumundan yağ elde etmenin değişik yöntemleri mevcuttur. Keten tohumundaki ekstraksiyonun türü, yağın miktarını ve kalitesini etkilemektedir. İçerisindeki nem oranı da farklı yöntemlerde yağ çıkarılmasında etki eder. Keten tohumunun hasadından sonra %12 ile %13 arasında nem oranı bozulmasına engel olurken kurutulması için ise %8'in altında bir nem oranı gerekmektedir (Denghan-Manshadi ve ark., 2020).

Lif bakımından zengin olan keten tohumunda %30 diyet lifi, %40 yağ, %20 protein, %4 kül ve %6 nem içermektedir. Keten tohumundaki yağın %50'si PUFA'dan oluşmaktadır (Şenkal, 2022). Keten tohumu yağında çoklu doymamış yağ asitleri, vücut tarafından EPA (eikoza pentaenoik asit) ile DHA'ya çevrilen uzun zincirli bir omega-3 yağ asidi olan ve ALA'ca zengin bir bitkisel üründür (Nasrabadi ve ark., 2019). KTY havyalarda ve insanlarda ALA'nın EPA'ya çevrilmesi sebebiyle potansiyel bir antiinflamatuvar olmakta ve araştırmaların ilgi odağını kendine çekmektedir. KTY'de 8 ya da 9 amino asit kalıntısından oluşurken içeriğinde siklolinopeptitler içermektedir. Son olarak KTY içerdiği zengin alfalinoetik asit sayesinde, insanlarda sinir ve beyin doku tamirinde, kalp ve damar hastalıklarında,

bağışıklığı düzenlemede ve tümörün gelişimi ile yayılımını önleme gibi birçok sağlık alanında etkili bir mahsuldür (Thomson ve ark., 1996; Dođaner, 2021).



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışma sürecinde kullanılan malzemeler aşağıda belirtilmiştir.

- Pepton
- Et Ekstraktı
- Bakto Sayton
- NACI (Sodyum Klorür)
- Bakto Agar ve Bakto Tripton
- Asetik Asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
- Trikloroasetik Asit ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ )
- $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Sodyum Asetat)
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Borik Asit)
- $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  (Amonyum Sülfat)
- Tris-HCl
- HCl (Hidrolik Asit)
- BSA, BCA, Trosin
- Sodyum Karbonat
- Sodyum Tartarat
- Sodyum Bikarbonat
- Bakır Sülfat
- Akrlamit
- Bis Akrlamit
- Tris
- SDS [ $(\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa})$ ]
- APS [ $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ]
- TEMED
- Gliserol
- Bromfenol mavisi
- Glisin
- Metanol

- Coomassie parlak mavisi
- Distile Su
- Messler Reaktifi
- Diyaliz Bandı
- Mavi Bant Süzgeç Kâğıdı
- DEAE Sefaroz Anyon Değiştirici

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma sürecinde kullanılan cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

- Su banyosu
- Santrifüj cihazı
- Hassas terazi
- Manyetik karıştırıcı
- UV Spektrometre
- pH metre
- SDS-PAGE Elektroforez cihazı
- Çalkalayıcı
- Etüv
- Otoklav

### 3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

Çalışma sırasında kullanılan çözelti ve tamponların hazırlanma yöntemleri aşağıda detaylandırılmıştır.

Sodyum-Borat 1 (0.01mol/l; pH:9,3):

- Sodyum-borat tamponu en küçük hacmiyle çözülmüştür.
- Çöktürmeden sonra diyaliz tüpleri şartlandırılmış, toplam çökelti (P4) ve %80'lik çöktürme çözeltiye (ÇÇ) diyaliz uygulanmıştır.

Sodyum-Borat 2 (0.01mol/l; pH:10.5): Yüksek Yüksek protein değerleri için örnekler, 1/20 oranında seyreltilerek ölçülmüştür.

Sodyum-Borat 3 (0.01mol/l; pH:9.3):

- Santrifüj işlemi öncesinde ve sonrasında örneklerin protein ve aktiviteleri belirlenmiştir.
- 30 mL Ç3, 3 litre tampon çözeltiliye karşı bir gece boyunca diyalize bırakılmıştır.

Tris-HCl Tamponu:

- pH aralığı 4-10 olacak şekilde değiştirilmiştir.
- Aktivite Tayin Yöntemi 2 kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

SDS-PAGE Çözeltileri:

Molekül ağırlığı tayini için SDS-PAGE yöntemi uygulanmıştır.

Örnek Hazırlama:

- Molekül ağırlığı belirlenecek numunenin 10 µL'si, 10 µL 2A Örnek Tamponu ile karıştırılmıştır.
- Karışım tüpü, 5 dakika boyunca 100°C'de kaynatılmış ve soğutulduktan sonra buzdolabına yerleştirilmiştir.
- Marker örnekleri de benzer şekilde işleminden geçirilmiştir.

Jel Hazırlama:

- %10'luk Ayırıcı Jel Çözeltilisi:
- 1,67 mL Monomer çözeltilisi
- 1,25 mL 4X Ayırıcı Tamponu
- 1,97 mL distile su
- 50 µL %10 SDS Çözeltilisi

- 30 µL %10 APS Çözeltisi
- 10 µL TEMED (polimerizasyon için) eklenmiştir.
- Karışım, cam plakalar arasına 3/4 oranında doldurularak donması beklenmiştir.

#### %3'lük Yığın Jel Çözeltisi:

- 0,2 mL Monomer çözeltisi
- 0,5 mL 4X Yığın Tamponu
- 1,26 mL distile su
- 20 µL %10 SDS Çözeltisi
- 10 µL %10 APS Çözeltisi
- 5 µL TEMED eklenmiştir.
- Karışım, cam plakalar arasına dökülerek tarak yerleştirilmiş ve donması beklenmiştir.

#### Elektroforez:

- Kuyucuklara örnekler enjekte edilmiş ve elektroforez işlemi başlatılmıştır.
- 2 saat sonunda jel, Coomassie Blue Stain çözeltisinde bir gece boyanıp ertesi gün Destain çözeltisinde tutulmuştur.

#### Son Aşama:

Jel, 20 dakika kurutulmuş ve marker ile karşılaştırılarak molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

### **3.4. Yöntem**

Çalışmamıza veri oluşturan araştırma ve deney sürecinde ayırma ve enzim saflaştırma yöntemi olarak; Santrifüjleme ve Diyaliz kullanılmıştır. Saflaştırılmış enzimden molekül ağırlığının belirlenmesinde amacıyla SDS-PAGE yönteminden yararlanılmıştır.

#### **3.4.1. Santrifüjleme**

Kaynaklarına göre enzim saflaştırma ve izolasyonunda farklı enzimler kullanılabilir. Bakterilerin saflaştırılmasında sanitasyon kullanılırken bitkiler için ise ezme gibi yöntemlere başvurulabilir. Enzimlerin hücre içinde ve hücre dışında bulunmasına göre farklı işlemler yapılabilmektedir. Enzimler hücre dışında ise izole için ek bir işleme gerek olmazken hücre duvarının ve zarının yıkımı sağlanmalıdır. Bu durumlar için fiziksel veya kimyasal işlemler uygulanabilir (Angel ve Harris, 1990)

Farklı basamaklarda uygulama yapılabilecek bir işlemdir. İlk basamaktan sonra büyük partiküllerin ve hücre organellerinin ayrıştırılması işleminde başvurulabilir. Amonyum sülfat ile çöktürme işleminden sonra bu işlem yapılabilmektedir. Bu işleme çok defa başvurulabilirken penotürasyonu önlemek amacıyla işlemi yapmak için sıcaklık +4 °C'de iken yapılmalıdır (Duman, 2016).

#### **3.4.2. Diyaliz**

Bu işlem genellikle çöktürme işleminden sonra uygulanmaktadır. Enzimlerle bir alanda yer alan tuzun ve işlenemeyen küçük moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla bu işlem yapılmaktadır. Diyaliz sürecinde selüloz, polietilen ve aseptat gibi yarı geçirgen özellikte bir membran kullanılması ve çoğunlukla bir gece düşük konsantrasyonu tampon çözelti bünyesinde tutularak bu işlem yapılmaktadır (Yaman, 2018).

### 3.4.3. SDS-PAGE

En sık olarak kullanılan elektrofaz çeşididir. Proteinlerin ya da polipeptitlerin molekül ağırlıklarına göre akrilamid elde elektrik akımı etkisi ile hareket ettirilmesi ve sonunda jel içerisinde bunların tespit edilmesini sağlayan tekniktir. Jel, akrilamid ve bisakrilamidinin polimerleşmesiyle oluşur.

## 3.5. Keten Tohumundan Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

### 3.5.1. Besiyerinin Hazırlanması ve Ekim İşlemi

Sıvı besiyeri hazırlığı için öncelikle ekstraktan 3g ve peptandan da 5g alınır. Daha sonra distile olan suyla 1 litrelik sıvı besiyeri oluşturulur. pH, 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile pH 7 olarak belirlenmiştir. Besiyerlerin hazırlanma aşamasında bakto saytondan 5g, bakto triptodan 15g, sodyum klorürden distile su 1 litreye tamamlanmış ve son olarak pH derecesi 7,3'e ayarlanarak yapılmıştır.

Yapılacak olan çöktürme işlemi için 25 g amonyum sülfat barındıran 100 ml çözeltide ve ham homojenatın düzeyi (ml) için eklenen amonyum sülfat miktarı hesaplanarak yapılmıştır. Çöktürme süreci 4°C'de yapılmıştır. Hazırlanan çözeltiliye amonyum sülfat eklenip 30 dakika karıştırıldıktan sonra 30 dakika 20000 devir/dakika hızla santrifüjleme yapılmıştır. Santrifüj işleminden sonra çökelti ve çözelti (süpernatant) kısımları birbirinde ayrılmıştır.

Sıvı besiyeriden iğne kullanılarak alınan bakteriler bölünerek ve zikzaklar yapılarak ekim işlemi yapılmıştır. Yapılan ekim işlemi sonucunda üremenin gerçekleşmesi amacıyla 37°C'deki etüvde ve 48 saat buzdolabında bekletilmiştir. Üretim sonucu saf bir kültüre ulaşılmıştır. Burada yine iğne desteği ile alınan bakteriler besiyeriye eklenerek 24 saat etüvde ve 37°C'de bekletilmiştir. Oluşan örneklerden numune alınarak besiyeriye ekim yapılmış ve 48 saat bekletilen numunelerden önceden hazırlanan sıvı besiyeriye öze ile ekim yapılmış ve oluşturulan uygun şartlarda sporlaşma ve üreme süreci takip edilmiştir.

### 3.5.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Hazırlığı yapılan besiyeri 20000 devir/dakika ve 30 dakika süreci ile santrifüj işlemi yapılmış ve çözelti ile bakteri birbirinden ayırt edilir. Elde edilen ham homojen yapıda olan sıvı kısım amonyum sülfat ile çöktürme işlemi yardımı ile çözelti içerisinde yer alan proteinler ayrıştırılmıştır. Üç bölümde gerçekleşen çöktürme işlemi ilk aşamada %40'lık bir çöktürme işlemi ile sonuçlanmıştır.

İkinci aşama, %70'lik bir amonyum sülfat doyurmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, 100 ml'lik çözelti içinde 44,2 g amonyum sülfat çözülmüştür. İlk aşamada belirlenen amonyum sülfat miktarı ve %40'lık çöktürme işlemi için kullanılan amonyum sülfat miktarı çıkarılmış, ardından %70'lik çöktürme için gereken ek amonyum sülfat miktarı hesaplanmıştır. Çözeltiye eklenen amonyum sülfat 30 dakika boyunca karıştırılmış, ardından 20.000 devir/dakika hızla çözelti 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Bu işlemlerin sonunda çökelti ve süpernatant (çözelti) birbirinden ayrılmıştır. Protein ve aktivite tayini için elde edilen çözeltiler buzdolabına kaldırılmış ve çözeltinin işlemlerine devam edilmiştir.

Çöktürme işleminin son aşamasında, %80'lik amonyum sülfat çöktürme uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada 52,3 g amonyum sülfat, 100 ml çözelti oluşturacak şekilde kullanılmıştır. Elde edilen bu çözeltideki amonyum sülfat miktarı, %70 ve %40'lık çöktürme işlemlerinde kullanılan amonyum sülfatların çıkarılmasıyla, %80'lik çöktürme için gereken amonyum sülfat miktarına ulaşmıştır. Diğer aşamalarda olduğu gibi, 4°C'de gerçekleştirilen bu işlemi takiben çözelti, 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. 24 saat sonra, 20000 devir/dakika hızla 30 dakika süreyle santrifüjleme yapılmış ve sonrasında çökelti ile süpernatant kısmı ayrılmıştır. Elde edilen çözeltiler, protein ve aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere buzdolabına kaldırılmıştır. Aktivite tayini sonucunda, beklenen değerlerin çökeltilerde elde edildiği görülmüş ve işlemler çökeltiler üzerinde devam ettirilmiştir.

### 3.5.3. Aktivite ve Protein Tayini

Bu çalışmada protein ve aktivite ölçümleri yapmak amacıyla iki farklı aktivite tayin yöntemi kullanılmıştır. Örnekler, protein ve aktivite ölçümlerinden önce 48 saat buzdolabında bekletilmiştir.

#### Aktivite Tayin Yöntemleri

1. Aktivite Tayin Yöntemi 1: İlk ölçümlerde kullanılmıştır.

2. Aktivite Tayin Yöntemi 2: pH ve sıcaklık stabilitesi çalışmaları ile optimum koşulların tespiti için kullanılmıştır.

Seyreltme ve Örneklerin Hazırlanması: Yüksek protein değerleri gösteren örnekler, Sodyum-Borat Tamponu 2 (%0.01 mol/l, pH 10,5) ile 1/20 oranında seyreltilerek ölçülmüştür. Bu çalışma kapsamında, 4 erlen içinde ayrılan örneklerden tek tek ölçümler yapılmış ve değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

Ham Homojenat Çalışmaları: Elde edilen veriler doğrultusunda erlenlerdeki örnekler santrifüj edilmiş ve toplanan ham homojenat örnekleri üzerinde protein ve aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ham homojenat hacmi belirlenmiş ve amonyum sülfattan yararlanılarak çöktürme işlemi uygulanmıştır.

Sporlaşma ve Üreme Zamanları: Aktivite ölçümleri, sporlaşma ve üreme için en uygun zamanlar olan 96. ve 156. saatlerde gerçekleştirilmiştir.

Optimum pH Belirlenmesi: Enzim örneğinin aktivitesi, pH 4-10 arasında değiştirilerek Aktivite Tayin Yöntemi 2 kullanılmıştır. Ölçümler sonucunda optimum pH değeri 8,97 olarak belirlenmiştir.

pH Kararlılık Çalışmaları: Tris-HCl tamponu kullanılarak, pH 4-10 arasındaki değişikliklerin enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, lipaz enziminin pH 10 üzerinde bozulma eğilimi gösterdiğini ortaya koymuştur.

Optimum Sıcaklık Belirlenmesi: Enzim örnekleri 20°C ile 80°C arasındaki farklı sıcaklıklara maruz bırakılmış ve Aktivite Tayin Yöntemi 2 ile ölçümler yapılmıştır. Çalışma sonucunda:

- Optimum sıcaklık: 80°C
- Enzimin etkisini kaybettiği sıcaklık: 70°C

Sıcaklık Kararlılık Çalışmaları: Enzim örnekleri, 10°C ile 80°C arasında 15 dakika inkübasyona tabii tutulmuş, sonrasında oda sıcaklığında soğutulmuş ve Aktivite Tayin Yöntemi 2 ile ölçümler yapılmıştır.

- Kararlı sıcaklık aralığı: 30-60°C
- Bozulma eşiği: 70°C

Keten Tohumu Yağı (*Linum Usitatissimum L.*): Keten tohumu yağı örneğinde, enzim aktivitesinin 70°C üzerinde kaybolduğu, ancak 30-60°C aralığında kararlı olduğu belirlenmiştir. Optimum sıcaklık, bu yağ türü için \*\*80°C\*\* olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma, enzimlerin pH ve sıcaklık stabiliteleleri ile optimum şartlarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Lipaz enziminin pH 8,97'de ve 30-60°C arasında kararlı bir şekilde çalıştığı, ancak pH 10 ve 70°C üzerinde aktivitesini kaybettiği görülmüştür. Keten tohumu yağı için belirlenen bu şartlar, ilgili endüstriyel ve bilimsel uygulamalarda yol gösterici olabilir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma 1

Bu çalışma, keten tohumu yağından (*Linum Usitatissimum L.*) elde edilen lipaz enziminin spesifik aktivitesindeki değişimi incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın başlangıcında, sıvı besiyeri hazırlanması ve sterilizasyon işlemleri, 3.5.1 numaralı bölümde belirtilen prosedüre uygun olarak yapılmıştır. Toplam 400 ml sıvı besiyeri hazırlanmış, bu besiyeri 250 ml'lik dört erlene 100'er ml olarak bölüştürülmüş ve otoklavda sterilize edilmiştir.

Steril besiyerine keten tohumu yağı eklenmiş ve inokülasyon işlemi tamamlanmıştır. Hazırlanan erlenler, 37°C'de inkübe edilmek üzere etüve yerleştirilmiş ve mikroorganizmaların sporlanma ve üreme süreçleri gözlemlenmiştir.

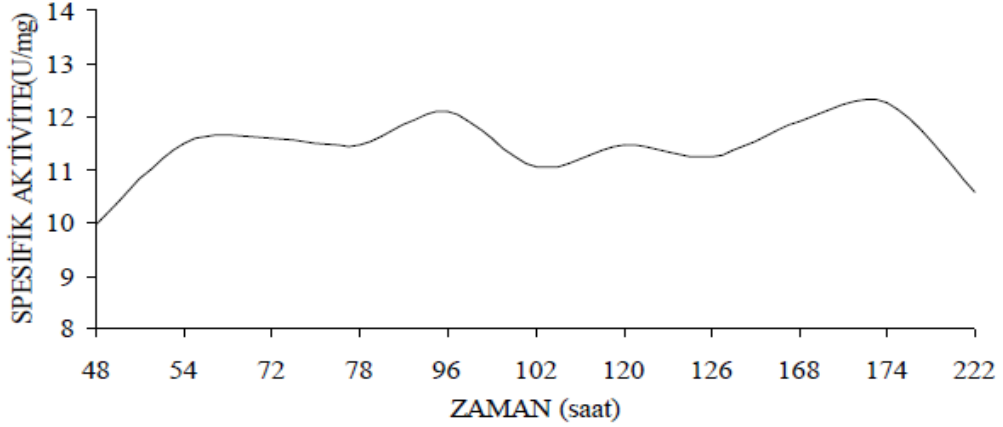
İnkübasyon sürecinin ikinci gününden itibaren, sabah ve akşam olmak üzere 12 saat aralıklarla 5'er ml numune alınmıştır. Bu işlem 156 saat boyunca devam etmiş, son numune alımı bu sürenin sonunda gerçekleştirilmiştir. Alınan tüm numuneler santrifüj edilerek çözelti ve çökelti fazlarına ayrılmış, çözelti fazları protein ve aktivite tayini için 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Protein ve enzim aktivite ölçümleri yapılmadan önce numuneler 48 saat boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Analizler sırasında Aktivite Tayin Yöntemi 1 kullanılmıştır. Protein konsantrasyonlarının yüksek olduğu numuneler, Sodyum-Borat Tamponu 2 (0.01 mol/l; pH: 10,5) ile 1/20 oranında seyreltilerek ölçüm yapılmıştır.

Bu yöntem ve analizler, keten tohumu yağından elde edilen lipaz enziminin spesifik aktivitesinin değerlendirilmesi ve sonuçların doğruluğunun sağlanması için uygulanmıştır.

**Tablo 4.1.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) spesifik aktivite-zaman değerleri

Zaman (saat)	Aktivite (U/ml)	Protein (mg/ml) (1/20)	Spesifik Aktivite (U/mg)
48	159,2	0,718	8,9
60	145,9	0,59	10,5
72	132,3	0,535	10,6
84	120,3	0,528	10,5
96	112,7	0,468	12,3
108	107,8	0,485	10
120	108,9	0,463	10,5
132	106,7	0,475	10,3
144	111,4	0,477	10,9
156	119,1	0,489	12,6
168	115,6	0,521	10,6



**Şekil 4.1.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) spesifik aktivite-zaman eğrisi

Ölçüm sonuçları, Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de sunulmuştur. Çalışma 1'de, 4 ayrı erlenin her birinden alınan örnekler üzerinde tek tek ölçümler yapılmıştır. Sunulan değerler, bu 4 erlendeki örneklerin ortalama değerleridir. Elde edilen sonuçlara göre, yüksek aktivite 96. ve 156. saatlerde gözlemlenmiştir. Bu saat dilimleri, sporlanma ve üreme için en uygun zamanlardır.

## 4.2. Çalışma 2

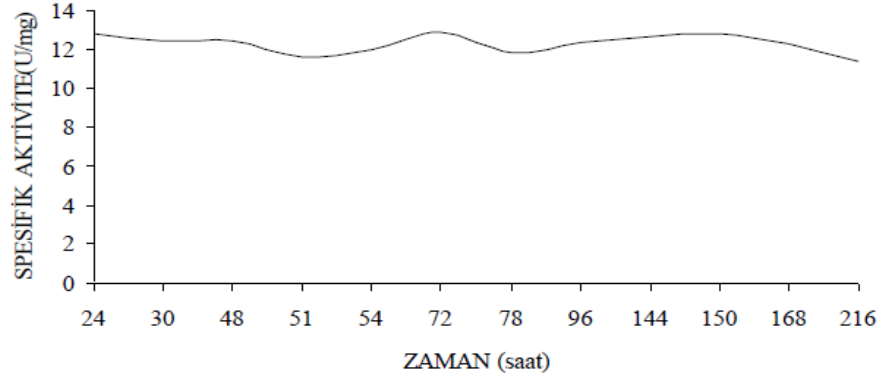
Bu çalışma, keten tohumu yağından elde edilen lipaz enziminin spesifik aktivitesindeki değişimleri incelemeyi amaçlamaktadır. Enzim çözeltisi için amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sırasında besiyeri hazırlığı ve ekim prosedürleri, belirtilen bölümdeki açıklamalara uygun olarak yapılmıştır. 500 ml'lik 42 adet erlenin sterilizasyonu için otoklava alınmış ve sıvı besiyerine keten tohumu yağı eklenerek çalkalama işlemi yapılmıştır. Sporlanma ve üreme süreleri 37°C'deki ortamda izlenmiş, örnekler ise 12 saat aralıklarla alınarak santrifüj edilmiştir. Son olarak, çözeltiler buzdolabında saklanarak analiz edilmiştir. Bu süreç, enzim aktivitesindeki değişiklikleri gözlemlemeyi ve değerlendirmeyi hedeflemektedir.

**Tablo 4.2.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) spesifik aktivite-zaman değerleri

Zaman (saat)	Aktivite (U/ml)	Protein (mg/ml) (1/20)	Spesifik Aktivite (U/mg)
48	103	0,412	12,5
60	92,5	0,378	12,1
72	92	0,376	12,1
84	90,1	0,388	11,2
96	91,6	0,386	11,1
108	99,8	0,390	12,7
120	96,8	0,401	11,2
132	102,1	0,417	12
144	97,6	0,385	12,2
156	99,8	0,389	12,1
168	97,4	0,398	11,2

Tabloda 4.2'de belirtilen verilere göre, erlenlerin ortalama spesifik aktivite değerleri 156 saat sonunda yaklaşık 12 U/mg civarına ulaşmıştır. Ancak, bu saatten sonra spesifik aktivite değerlerinde bir düşüş gözlemlenmiştir. Çalışma 2'nin sonuçları, Çalışma 1'e kıyasla daha yüksek spesifik aktivite değerleri elde edildiğini ve süre

bazında da daha iyi sonuçlar sağlandığını göstermektedir. Bu durum, yapılan yöntemin veya kullanılan koşulların etkinliğini ve enzim aktivitesindeki artışı işaret edebilir.



**Şekil 4.2.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) spesifik aktivite-zaman eğrisi

Bu çalışmada, protein ve aktivite ölçümleri için örnekler 48 saat boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Aktivite tayini için Yöntem 1 kullanılmış ve yüksek protein değerleri için örnekler, Sodyum–Borat Tamponu 2 (0.01 mol/l; pH: 10,5) ile 1/20 oranında seyreltilmiştir. Elde edilen veriler, Tablo 4.2 ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Erlenlerdeki örnekler santrifüj edilerek, ham homojenat elde edilmiş ve protein ve aktivite ölçümleri yapılmıştır. Ham homojenatın hacmi ölçülüp, amonyum sülfat ile çöktürme işlemi uygulanmıştır. Çöktürme işlemi %40, %70 ve %80 konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiş ve her bir çökelti (P1, P2, P3), en küçük hacimde Sodyum–Borat Tamponu 1 ile çözülmüştür. Çöktürmeden sonra diyaliz tüpleri kullanılarak, toplam çökelti (P4) ve %80'lik çökelti çözeltisi (ÇÇ) diyaliz edilmiştir.

P4'ün 5 ml'si, Sodyum–Borat Tamponu 3 (0.01 mol/l; pH: 9,3) ile 1 gece boyunca diyaliz edilmiştir. Nessler reaktifi kullanılarak diyaliz kontrolü yapılmıştır. Ç4X olarak adlandırılan diyaliz örneği, santrifüj edilerek çökelti (P5A) ve çözelti (Ç5X) ayrılmıştır. Ayrıca, Ç3'ün 30 ml'si 3 litre Sodyum–Borat Tamponu 3 ile 1 gece diyalize alınmıştır. Diyaliz kontrolü yine Nessler reaktifi ile yapılmış, ve diyaliz örneği Ç4Y olarak isimlendirilip, santrifüj edilerek çökelti (P5B) ve çözelti (Ç5Y) ayrılmıştır. P5A ve P5B kısımları saf dışı bırakılmış ve örneklerden santrifüj öncesi ve sonrası protein ve aktivite düzeyleri belirlenmiştir. Bu ölçümler Tablo 4.3 ve Şekil 4.2'de

sunulmaktadır. Bu işlem, enzim aktivitesini daha ayrıntılı bir şekilde incelemeyi ve spesifik aktivitenin zamanla nasıl değiştiğini gözlemlemeyi amaçlamaktadır.

**Tablo 4.3.** Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*)’dan elde edilen lipaz enziminin kısmi saflaştırılması (Çalışma 2).

BSM Substrat: Kazein	Hacim (ml)	Protein (1/20) (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Ham Homojenat	124	0,397	96,5	1189	12398	9,8
%40 çöktürme (Ç1)	126,7	0,354	100	969	13199	12,9
%40 çöktürme (P1)	5,9	0,598	75,2	81	498	5,1
%70 çöktürme (Ç2)	129	0,301	81,9	942	11287	11,8
%70 çöktürme (P2)	5,8	0,300	50	48	348	6,9
%80 çöktürme (Ç3)	127	0,299	79,8	800	10547	12,8
%80 çöktürme (P3)	5,8	0,297	42	41,5	279	5,9
Toplam çökelti (P4)	17,5	0,398	39	160	784	4
Diyaliz sonra ve santr,önc (Ç4X)	6	0,201	2	29,8	15,8	0,35
Diyaliz sonr, ve santr,öncsi (Ç4Y)	70	0,032	1,1	50	91,8	1,2
Diyaliz sonr, ve santr,sonra (Ç5X)	4	0,089	1,3	8,1	8	0,6
Diyaliz sonr, ve santr,sonra (Ç5Y)	65	0,014	3	19	228	9,7

Ham homojenatın spesifik aktivitesi 9,8 U/mg iken, %80’lik çöktürme sonucunda çözelti kısmındaki spesifik aktivite 12,8 U/mg olarak ölçülmüştür. Çökelti kısmının %80’lik çöktürme sonrası spesifik aktivitesi ise 5,9 U/mg olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, enzimin çoğunluğunun çözelti kısmında kaldığını ve çöktürme sırasında enzimin büyük ölçüde çökeltiye geçmediğini göstermektedir. Çözeltiye göre çöktürmede 1,5 kat saflaştırma elde edilmiştir. Diyaliz sonrası çökelti ve çözeltinin spesifik aktivitelerinin kaybolması ve saflaştırma sağlanamaması, bu işlemde verimliliğin azaldığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, iki farklı aktivite tayin yöntemi kullanılarak yapılan ölçümler karşılaştırıldığında (Aktivite Tayin Yöntemi 1: Spesifik Aktivite 12,9 U/mg ve Aktivite Tayin Yöntemi 2: Spesifik Aktivite 12,2

U/mg), elde edilen sonuçlar birbirine çok yakın çıkmıştır. Bu da her iki yöntemin de benzer doğrulukla sonuç verdiğini ve kullanım açısından birbirine uygun olduğunu göstermektedir.

#### **4.3. Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*)' dan Elde Edilen Lipaz Enziminin Özelliklerinin İncelenmesi**

Bu çalışmada, çeşitli faktörlerin keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*)'ndan elde edilen lipaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Aşağıda bu faktörlerin enzim aktivitesine etkileri özetlenmiştir.

**Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi:** Optimum pH değeri 8,97 olarak belirlenmiş ve pH kararlılığı çalışmaları sırasında, enzim pH 10'dan sonra bozulma gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan pH aralığı 4-10 arasında yapılan çalışmalarla, lipaz enziminin en iyi aktiviteyi pH 8,97 civarında gösterdiği, ancak pH 10'dan sonra bozulduğu belirlenmiştir.

**Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi:** Enzim aktivitesi, sıcaklık aralığında yapılan çalışmalarla incelenmiştir. 30°C ile 80°C arasında yapılan ölçümler sonucunda, enzimin etkinliği 70°C'den sonra kaybolmuştur. Lipazın optimum sıcaklık değeri 80°C civarındadır. Sıcaklık kararlılığı çalışmasında, enzim örneklerinin 15 dakika boyunca 10°C ile 80°C arasında ısıtıldıktan sonra aktivite tayinleri yapılmış ve 70°C'den sonra enzimin etkinliğinin kaybolduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar, enzim örneklerinin 30-60°C sıcaklık aralığında kararlı olduğunu göstermektedir.

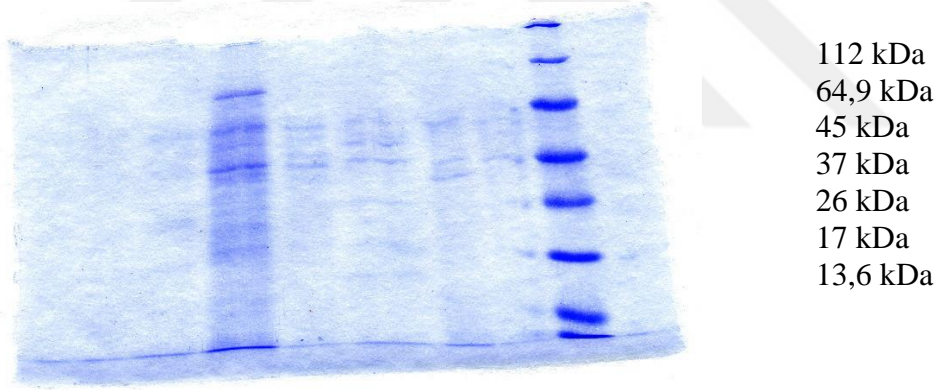
**Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi:** Metal iyonlarının etkisi incelenmiş ve MnCl<sub>2</sub>'nin iyi bir aktivatör olduğu belirlenmiştir. FeCl<sub>2</sub> ve CaCl<sub>2</sub> tuzlarının aktivatör etkisi olmadığı, aksine inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, EDTA ve CuCl<sub>2</sub> inhibitör olarak kullanılmış ve EDTA'nın iyi bir inhibitör olduğu gözlemlenmiştir.

**Reaksiyon Süresinin ve Substrat Konsantrasyonunun Etkisi:** Farklı reaksiyon süreleri (15-85 dakika) ve substrat konsantrasyonları (%1 ile %0.07) kullanılarak

yapılan ölçümler sonucunda, 70 dakikada tüm konsantrasyonlarda aktivite değerleri birbirine çok yakın olmuştur. Bu, 70 dakikadan sonra substrat konsantrasyonlarının aktiviteye etkisinin anlamlı bir değişiklik yaratmadığını göstermektedir.

Molekül Ağırlığı Tayini: SDS-PAGE ile molekül ağırlık tayini yapılmıştır. Önce numune ve örnek tamponu karıştırılarak 100°C’de kaynatılmıştır. Ardından, ayırıcı ve yığın jel çözeltileri hazırlanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. 2 saat süren elektroforez işleminden sonra, Coomassie Blue Stain çözeltisi ile boyama yapılmış ve Destain çözeltisiyle arındırma işlemi tamamlanmıştır. Molekül ağırlığı, marker ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3).

Sonuçlar, enzim aktivitesinin çeşitli faktörlere duyarlı olduğunu ve bu faktörlerin optimizasyonunun enzim aktivitelerini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Bu veriler, enzim kullanımının verimliliğini artırmak için gereken pH, sıcaklık, metal iyonları ve diğer koşulların belirlenmesine yardımcı olacaktır.



**Şekil 4.3.** SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini 2: Keten Tohumu Yağı (*Linum Usitatissimum L.*)

Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) türünden elde edilen lipaz enziminin molekül ağırlığı 45 kDa civarındadır.

## 5. TARTIŞMA

*Linum Usitatissimum L.* elde edilen enzim örneğinin optimum sıcaklık 80°C pH değeri 10,5 tir. Yapılan çalışmada ortaya çıkan lipaz enzimi hidrolaz sınıfında yer almaktadır. R.H. SAMMOUR (2005) te yapılan çalışmasında keten tohumu lipazlarını (*Linum usitatissimum L.*, "Giza 5") inceledi ve sonuçlar bunun optimum pH'ı 4,5 olan bir asit lipaz olduğunu gösterdi. Bu enzim özellikle tohum çimlenmesinden sonraki 36 ila 84 saat arasında aktifti ve sadece çimlenmemiş tahıllarda düşük lipolitik aktivite gösterdi. Ayrıca alt molekül ağırlığı 45kDa olarak belirtmiştir. Lipaz enzimi üretiminin yaptığımız çalışmayla kısmi benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Yapılan çalışmanın bulguları ve sonuçları detaylı bir şekilde ele alınmış ve bu doğrultuda bir inceleme yapılmıştır. Tezde yer alan iki ana çalışma çerçevesinde, Çalışma 1 kapsamında dört farklı erlen için yapılan ölçümler, her bir erlen için ayrı ayrı gerçekleştirilmiş ve gösterilen değerler, bu erlenlerde elde edilen ortalama sonuçlardır. Elde edilen verilere göre, en yüksek aktivite 96. ve 156. saatlerde gözlemlenmiştir. Bu saat dilimlerinin sporlanma ve üreme için en uygun zamanlar olduğu belirlenmiştir. Çalışma 2'de ise, keten tohumu yağı (*Linum usitatissimum L.*) kullanılarak elde edilen lipaz enziminin spesifik aktivitesindeki değişiklikler incelenmiştir. Enzim çözeltisi, amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu çalışmada, sıvı besiyerinden yalnızca 200 ml'si hazırlanmış ve 100 ml'lik 42 adet erlen, sterilizasyon için otoklava alınmıştır. Keten tohumu yağı (*Linum usitatissimum L.*) sıvı besiyerine ekilerek, erlenler 37°C'deki odada çalkalayarak sporlanma ve üreme süreçleri gözlemlenmiştir. Ayrıca, keten tohumu yağı (*Linum usitatissimum L.*) türünden elde edilen lipaz enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık 45 kDa olduğu tespit edilmiştir. Keten tohumu (*Linum Usitatissimum L.*) türünden çalışmalarda farklı verilere ulaşılmış olsa bile Lipazlar gerek sulu gerekse de susuz ortamlarda meşakkatli reaksiyonları meydana getiren önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Bunun sebebi ise substrat aralığının geniş olması, yüksek sıcaklıklara, pH ve organik çözücülere, enantiyoselektivite gibi durumlara karşı kararlı bir pozisyon sergileme yeteneklerindedir. (Akbulut, 2014)

Yapılan çalışmada, metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu inceleme için, metal iyonlarının 1 mM'lik çözeltileri hazırlanmış ve Aktivite Tayin Yöntemi 2 kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub> ve CaCl<sub>2</sub> tuzlarının, keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*)'ndan elde edilen örneklerin aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. MnCl<sub>2</sub> tuzunun, enzim aktivitesini artıran iyi bir aktivatör olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, FeCl<sub>2</sub> ve CaCl<sub>2</sub> tuzlarının aktiviteyi artırmadığı, hatta inhibitör etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir. İnhibitör olarak kullanılan CuCl<sub>2</sub> ve EDTA tuzları arasında, EDTA'nın iyi bir inhibitör olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca R.H. SAMMOUR (2005) te yapılan çalışmasında Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*), yüksek tuz konsantrasyonlarından veya EDTA'dan çok az etkilenmiştir (Şekil 8). Pinyon lipazı ve kanola lipazı, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> ve EDTA ile neredeyse aynı etkiyi göstermiştir (Lin & Huang, 1983; Hammer & Murphy, 1993; Ben Miled ve ark., 2000). Buna karşılık, mısır lipid gövdesi lipazı, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve EDTA ile aktivitesini azaltmıştır (Lin ve ark., 1986). Non-iyonik deterjanlar, Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) azaltmıştır, ancak düşük konsantrasyonlarda bu etki belirgin değildir. Öte yandan, SDS düşük konsantrasyonlarda aktiviteyi neredeyse sıfıra düşürmüştür. Yapılan karşılaştırmada metal iyon etkilerinde benzerlik görülmüştür.

Sonuç olarak yapılan litaretür incelemesinde Keten tohumu yağı (*Linum Usitatissimum L.*) lipaz enzimlerinde çalışmalar az sayıdadır. Bundan kaynaklı yaptığımız çalışmanın değer açısından örnek gösterilecek seviyededir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Enzim Endüstrisinde yer alan ve günümüze gelene kadar daha çok önem kazanan enzim teknolojisinde mikro-organizma kaynakları tercih önceliği mevcuttur. Bu durumun sebebi bu tür kaynakların diğer kaynaklara göre katalitik aktivitelerinin daha yüksek olmasıdır. Bir diğer gerekçe ise farklı bir yan ürüne ihtiyaç duymaması, ucuz ve tüm koşullarda üretilebilir olması etkilidir. Artan enzim teknolojisi ve bu alanda meydana gelen gelişmelerin hızla artması, kullanım alanlarının fazla olması ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olmasından dolayı bu alandaki araştırmalara ilgiyi artırmaktadır.

Clause Bernard lipazları 1856'da ilk kez tanımlamıştır. Kan plazması içerisinde yer alan lipoprotein lipazlar, 1943 yılında "temizleyici faktör" olarak nitelendirilmiştir. Enzim gruplarından hidrolaz sınıfında yer alan lipazlar (Triasilgiserol ester hidrolaz); bitki ve hayvansal yağların normal şartlarında tersinir hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Lipazlar gerek sulu gerekse de susuz ortamlarda meşakkatli reaksiyonları meydana getiren önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Bunun sebebi ise substrat aralığının geniş olması, yüksek sıcaklıklara, pH ve organik çözücülere, ensantiyoselektivite gibi durumlara karşı kararlı bir pozisyon sergileme yeteneklerindedir. Bu durumundan dolayı da lipazlar, birçok biyoteknolojik (gıda, süt ürünleri, deterjan...) alanda kullanılmakta ve biyokatalizör özelliklerinden dolayı da birçok yeni alanda kullanılmaktadır (Akbulut, 2014). Literatürde bulunan verilere bakıldığında biyoteknolojide kullanımda olan enzimlerin ortalama %25'i lipazlardan oluşmaktadır

Yapılan çalışmanın amacı keten tohumu yağından (*Linum Usitatissimum L.*) lipaz enziminin saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesidir. Çalışmanın materyal ve metodu belirlenerek yapılan çalışmanın bulgu ve sonuçları ele alınmış ve bu kapsamda incelenmiştir. İki ana çalışma çerçevesinde yapılan bu tez içeriğinde, çalışma 1 için ayrılan 4 erlen örneğinden alınan örneklerde tek tek ölçümler yapılmıştır. Çalışma boyunca her bir erlenin örneklerinden elde edilen veriler, belirli bir süre dilimi içinde enzim aktivitesindeki değişimi gözlemlemek amacıyla

kaydedilmiştir. Bu ölçümlerin sonucunda, elde edilen değerler, dört erlendeki örneklerin ortalama değerlerini yansıtmaktadır.

Çalışma 1'in bulgularına göre, en yüksek enzim aktivitesinin 96. ve 156. saatlerde olduğu tespit edilmiştir. Bu iki saat dilimi, mikroorganizmaların sporlanma ve üreme süreçlerinin en verimli olduğu zamanlar olarak belirlenmiştir. Sporlanma ve üreme, mikroorganizmaların çoğalmasının ve metabolik aktivitelerinin arttığı dönemlerdir. Bu dönemler, enzim üretiminin de arttığı ve enzim aktivitesinin zirveye çıktığı zamanlardır. Bu bulgular, enzim üretiminin bu zaman dilimlerinde en yüksek verimlilikle gerçekleşebileceğini göstermektedir. Bu saat dilimlerinin, enzimin en yüksek verimlilikle üretildiği ve biyoteknolojik süreçlerin optimize edilebileceği kritik zaman dilimleri olduğu söylenebilir.

Çalışma 2'de, keten tohumu yağı (*Linum usitatissimum L.*) kullanılarak elde edilen lipaz enziminin spesifik aktivitesindeki değişimler incelenmiştir. Bu süreçte enzim çözeltisi, amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulmuştur. Amonyum sülfat kullanılarak yapılan çöktürme işlemi, enzimlerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve enzimlerin belirli bir konsantrasyona yoğunlaşmasını sağlar. Ardından, diyaliz işlemi ile çözeltiden istenmeyen küçük moleküllerin ve tuzların uzaklaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada kullanılan besiyeri, sıvı ortamdan sadece 200 ml hazırlanmış ve bu besiyeri, 100 ml'lik miktarlara bölünerek 500 ml'lik 42 adet erlene konulmuştur. Erlenler, sterilizasyon için otoklava alınmış ve mikroorganizmaların kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak amacıyla bu işlem gerçekleştirilmiştir.

Keten tohumu yağı, sıvı besiyerine ekilmiş ve ardından erlenler, 37°C'deki bir inkübatör odasında, çalkalayıcıda çalkalanarak sporlanma ve üreme süreçleri gözlemlenmiştir. Bu koşullar altında, mikroorganizmaların üremesi ve sporlanması için en uygun ortam sağlanmıştır. Sporlanma ve üreme, mikroorganizmaların çoğalma ve metabolik aktivite gösterme süreçleridir, bu da lipaz enziminin üretimi için önemli bir adımdır. Erlenlerin çalkalanarak bu süreçlerin gözlemlenmesi, enzim üretim sürecinin zamanlamasını ve verimliliğini optimize etmek için kritik bir aşamadır.

Elde edilen veriler doğrultusunda, keten tohumu yağı (*Linum usitatissimum L.*) kullanılarak elde edilen lipaz enziminin spesifik aktivitesi 156. saatin sonunda yaklaşık olarak 12 U/mg civarında ölçülmüştür. Bu saatten sonra enzim aktivitesinde bir azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuç, lipaz enzim üretiminin başlangıçta yüksek bir aktiviteye sahip olduğunu ancak zamanla bu aktivitenin azaldığını göstermektedir. Çalışma 2 sonuçları, özellikle çalışma 1'e kıyasla daha yüksek ve süreye göre daha düzenli bir spesifik aktivite elde edildiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, enzimin büyük bir kısmının çözelti fazında kaldığını ve çöktürme işleminde çözeltiden enzim geçişinin minimal olduğunu göstermektedir. Çöktürme işlemi sırasında çözelti fazındaki enzim, çökeltiye göre 1,5 kat daha saflaştırılmıştır. Ancak çökelti ve çözeltilerin diyaliz işlemi sonucunda, enzim aktivitesinin kaybolduğu ve saflaştırma sağlanamadığı belirlenmiştir. Bu, diyaliz işleminin çözeltiden küçük moleküllerin uzaklaştırılması için etkili olmasına rağmen, lipaz enziminin saflaştırılmasında yeterli olmadığına işaret etmektedir. Yapılan ölçümler, iki farklı yöntemle yapılan saflaştırma ve aktivite tayini sonuçlarını karşılaştırarak, her iki yöntemin de uygun sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur. Aktivite Tayin Yöntemi 1 ile elde edilen spesifik aktivite 12,9 U/mg iken, Aktivite Tayin Yöntemi 2 ile elde edilen spesifik aktivite 12,2 U/mg olmuştur. Bu sonuçlar, her iki yöntemin yaklaşık olarak benzer sonuçlar verdiğini ve her iki yöntemde kullanım açısından geçerli olduğunu göstermektedir. Bu, enzim saflaştırma sürecinde farklı yöntemlerin uygulanabilirliğini ve etkinliğini değerlendirmek açısından önemli bir bulgudur.

Bu çalışmada, keten tohumu yağından elde edilen lipaz enziminin optimum pH ve pH kararlılığı açısından çeşitli incelemeler yapılmıştır. pH aralığı 4 ile 10 arasında değiştirilerek, Aktivite Tayin Yöntemi 2 kullanılarak enzim aktivitesinin değişimi gözlemlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda, enzim örneğinin optimum pH değeri 8,97 olarak belirlenmiştir. Bu, lipaz enziminin en yüksek aktiviteyi pH 8,97'de gösterdiğini ve bu pH koşulunun enzim için en verimli ortamı sağladığını göstermektedir.

Ayrıca, keten tohumu yağından elde edilen lipaz enziminin optimum sıcaklık değeri de belirlenmiştir. Bu sıcaklık, enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık olarak 80°C olarak tespit edilmiştir. Yani, lipaz enzimi, 80°C'ye kadar olan sıcaklık

aralığında en verimli şekilde çalışmaktadır. Bunun yanı sıra, enzim için optimum pH değeri ise 10,5 olarak belirlenmiştir. Bu, lipaz enziminin 10,5 pH değerinde en verimli şekilde işlev gördüğünü ve bu pH'da en yüksek katalitik aktiviteyi sağladığını göstermektedir.

Bu sonuçlar, lipaz enziminin pH ve sıcaklık koşullarına karşı duyarlı olduğunu ve bu parametrelerin enzim aktivitesinin optimize edilmesinde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarında, bu tür optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi, biyokataliz süreçlerinin verimliliğini arttırmak için kritik öneme sahiptir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, keten tohumu yağından (*Linum usitatissimum L.*) elde edilen lipaz enzimi, 70°C sıcaklıkta etkisini kaybetmiştir. Bu, enzimin yüksek sıcaklıklara karşı duyarlı olduğunu ve belirli bir sıcaklık aralığında etkinliğini sürdürebildiğini göstermektedir. Özel olarak, 30-60°C sıcaklık aralığında enzimin kararlı olduğu ve en yüksek aktiviteyi bu aralıkta gösterdiği tespit edilmiştir. Bu, enzimin endüstriyel kullanımı için önemli bir bulgudur, çünkü biyoteknolojik ve endüstriyel süreçlerde bu sıcaklık aralığının enzim aktivitesini en verimli şekilde sürdürebilmesi, çeşitli uygulamalar için ideal bir ortam sağlar.

Bunun yanı sıra, yapılan çalışmada metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri de incelenmiştir.  $MnCl_2$ ,  $FeCl_2$  ve  $CaCl_2$  tuzları, keten tohumu yağı örnekleri ile yapılan deneylerde test edilmiştir.  $MnCl_2$  tuzunun lipaz enzimi için iyi bir aktivatör olduğu belirlenmişken,  $FeCl_2$  ve  $CaCl_2$  tuzlarının aktifleşme sağlamadığı ve hatta inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu, metal iyonlarının enzim aktivitesini arttırabileceği gibi, bazı iyonların ise inhibitör etkiler göstererek enzimin verimli çalışmasını engellediğini göstermektedir. İnhibitör olarak  $CuCl_2$  ve EDTA tuzları kullanılmıştır. Sonuçlar, EDTA'nın iyi bir inhibitör olduğunu ve enzim aktivitesini etkili bir şekilde engellediğini ortaya koymuştur.

Farklı reaksiyon süreleri ve substrat konsantrasyonlarında yapılan ölçümler sonucunda, 70 dakika sonra substrat konsantrasyonlarındaki değişikliklerin enzim aktivitesine etkisi olmadığı görülmüştür. Bu bulgu, belirli bir süre sonra reaksiyonların

dengeye ulaştığını ve daha fazla substrat eklemenin aktiviteyi etkilemediğini göstermektedir.

Sonuç olarak, lipazlar sahip oldukları biyokatalitik özellikleri sayesinde günümüzde eczacılar, biyokimya mühendisleri, organik kimyacılar ve diğer bilim insanları tarafından tercih edilmektedir (Sexana, 1999). Lipazlar, biyoteknolojik gelişmelerde ve endüstriyel alanda önemli bir görev üstlenmektedir ve enzim endüstrisindeki değerine büyük katkı sağlamaktadır. Bu enzimler, biyotransformasyon ve biyoteknoloji araçları olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Biyoteknolojide özellikle mikroorganizma kaynaklı lipazlar, çoğunlukla mantarlardan elde edilmektedir. Lipaz üreten mikropların doğada yaygın bir şekilde bulunması, bu alanda doğal yaşam alanlarının araştırılmasını önemli hale getirmektedir (Hasanzade, 2023).

Lipaz sınıfı enzimler, endüstriyel alanda çok çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Süt endüstrisi, kozmetik sanayi ve bazı peynirlerin üretimi gibi temel alanlarda önemli rol oynarlar. Ayrıca, katı-sıvı yağ üretimi, tereyağına aroma verme, ziraat ilaçları üretimi, çikolata endüstrisi ve karamel üretimi gibi alanlarda da kullanılırlar. Petrol endüstrisi ve atık yağ hidrolizi işlemlerinde biodizel üretimi gibi çevresel alanlarda da büyük öneme sahiptirler (Gül, 2013). Lipazlar, gıda, deterjan, biyomedikal uygulamalar, biyosensörler, parfüm sanayi, organik kimya, deri sanayi, zirai kimya, çevre yönetimi gibi birçok endüstriyel sektörde önemli kullanım alanları bulmaktadır. Bu, lipazların biyoteknolojinin ve endüstrinin pek çok alanında yüksek ekonomik değer taşıyan ve potansiyel biyokatalizör olarak kullanılabilir enzimler olduklarını gösterir.

## KAYNAKLAR

**Aehle W (2004).** *Enzymes in industry production and application industry production and application.* Wiley. VCH Verlag. Weinheim, s: 484.

**Akbulut N (2014).** *Pamuk Tohumundan (Gossypium hirsutum L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.* Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kütahya.

**Akoh, CC, Min, DB, (1998).** *Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification, Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology.* Marcel Deccer, Inc, New York, s: 641-698.

**Angal S, Harris E (1990).** *Protein Purification Applications, Second Edition,* IRL Pres at Oxford University Pres, UK. s: 317.

**Betül A (2023).** *Koyun Pankreasından Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu.* Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. Kütahya.

**Bülbül M (2019).** *Biyokimya.* Gülmat, Kütahya.

**Dehghan-Manshadi A, Peighamardoust SH, Azadmard-Damirchi, S, Niakousari M (2020).** *Effect of infrared-assisted spouted bed drying of flaxseed on the quality characteristics of its oil extracted by different methods.* Journal of the Science of Food and Agriculture, **100(1)**, s: 74–80.

**Divakar S, Manohar B. (2007).** *Use of Lipases in Industrial Production of Esters”, Structure Function and Applications,* Julio Polaina ve Andrew.

**Duman Y. (2016).** Üçlü Faz Ayrımı (ÜFA) ile Geleneksel Enzim Saflaştırma Tekniğinin Karşılaştırılması; ÜFA ile Saflaştırılan  $\beta$ -Galaktosidazın Termodinamik Özellikleri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, **6(3)**, s:107-117.

**Edip K, İrfan K (2000).** *Biyokimya, Aktif Kitabevi,* Erzurum, s: 91-118.

**Elmalı E (2017).** *Papatyadan (matricaria chamomilla l.) Saflaştırılan lipaz enziminin inhibisyon aktivitesinin incelenmesi.* Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Giresun.

**Erdoğan B (2020).** *Bacillus Subtilis Megatherium Bakteri Türünden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi.* Burdur Sağlık Bilimleri Enstisütüsü, Burdur.

**Faiz Ö. (2005).** *Yeni bir termofilik bakterinin, Anoxybacillus gonensis A4, hücre dışı lipaz/esteraz yeteneğinin incelenmesi ve karakterizasyonu*, Trabzon.

**Fuciños P, Abadín CM, Sanromán A, Longo MA, Pastrana (2005).** *Identification of extracellular lipases/esterases produced by Partial purification and preliminary biochemical*, Journal of Biotechnology, **117**, 233-241.

**Gerze A (2003).** *Proteaz Enziminin Bacillus Subtilis Megatherium Ve Bacillus Polymxa Bakteri Türlerinden Kısmi Saflaştırılması Ve Özelliklerinin İncelenmesi*. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.

**Göven F (2023).** *Chia tohumundan (salvia hispanica l.) Lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı. Kütahya.

**Gül ÜD (2013).** *Fungal Lipazlar Ve Endüstride Kullanım Alanları*. AKU J. Sci. Eng. **13** s:1- 8

**Hasanzade S (2023).** *Toprakta İzole Edilen Mikroorganizmalardan Lipaz Enzimi İzolasyonu Ve Karakterizasyonu*. Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. Eskişehir.

**İlgün R (2016).** *Kestane Tohumundan Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi*, Giresun Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun.

**Jaeger KE, Reetz MT (1998).** *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology*. Trends in Biotechnology, **16**, s:396-403.

**Jaeger KE, Reetz, MT (1998).** *Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology*. Tıbtech, **16**, s:396–403.

**Kojima Y, Yokoe M, Mase T (1994).** *Purification and characterization of an alkaline lipase from Pseudomonas fluorescens AK102*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **58(9)**, s: 1564-1568.

**Kuo T (2002).** *Lipid Biotechnology*, New York. s:357.

**Kuzu SB. (20089).** *Kitinaz üreten bacillus izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

**Mehta A, Bodh U, Gupta R (2017).** *Fungal lipases: a review*. Journal of Biotech Research, **8**, s: 58-77.

**Murat D (2021).** Keten Tohumu Yağının Yapısal, Elektronik Ve Yalıtım Özelliklerinin Deneysel Ve Teorik Olarak İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.

**Mutlu D (2006).** *Rasemik Naproksen Esterden Enantiyoseçimli Hidroliz İle S Naproksen Üretiminde Reaksiyon Parametrelerinin İncelenmesi.* Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.

**Nasrabadi N, Maryam Goli SAH, Sedaghat Doost A, Dewettinck K, Paul V der M (2019).** *Bioparticles of flaxseed protein and mucilage enhance the physical and oxidative stability of flaxseed oil emulsions as a potential natural alternative for synthetic surfactants.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **184**, s: 110-489.

**Nelson D. L, Cox, MM (2004).** Lehninger principles of biochemistry, Chapter. W. H. FREEMAN, Fourth Edition.

**Nelson DL, Cox MM (2005).** *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). W. H. Freeman and Company, New York.

**Onat T, Emerk K, Sözmen EY (2002).** *İnsan Biokimyası.* Palme Yayıncılık.

**Orhan Ş (2022).** Deneysel Katarakt Modeli Oluşturulan Cıvciv Embriyolarında Keten Tohumu Yağının Antioksidan Etkisinin Araştırılması. Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı. Afyonkarahisar.

**Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT (1999).** *The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnology Applied Biochemistry* **29** s:119-131.

**Pekin B (1980).** *Biyokimya mühendisliği (Temel ilkeler).* İzmir: Ege Üniversitesi, Kimya Fakültesi Yayınları No 3.

**Polaina J (ed), MacCabe AP (ed). (2007).** *Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications.* Springer, Dordrecht, The Netherlands, s:633.

**Prabhu VA, Tambe SP, Gandhi NN, Sawant SB, Joshi JB (1999).** *Rice bran lipase: Extraction, activity and stability.* Biotechnology Progress. **15** s:1083-1089.

**Prasad K. (2009).** *Flaxseed and cardiovascular health.* Journal of Cardiovascular Pharmacology **54(5)**, s: 369–377.

**Robinson PK (2015).** *Enzymes: principles and biotechnological applications.* Essays In Biochemistry, **59(0)**, s:1–41.

**Sarı B (2017).** *Papatyafan (Matricaria chamomilla L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi.* MS Thesis Fen Bilimleri Enstitüsü. Giresun.

**Saxena RK, Ghosh PK, Gupta R, Davidson SW, Bradoo S, Gulati R (2008).** *Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry,* Current Science Online, **95 (2).**

**Sharav O, Shim YY, Okinyo-Owiti DP, Sammynaiken R, Reaney MJT (2014).** *Effect of cyclolinopeptides on the oxidative stability of flaxseed oil.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **62(1)**, s: 88–96.

**Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001).** *Research review paper: Production, purification, characterization, and applications of lipases.* Biotechnology Advances, **19** s:627-662.

**Singh AK, Mukhopadhyay, M (2012).** Fungal lipaza genel bakış: bir inceleme. *Uygulamalı biyokimya ve biyoteknoloji*, **166**, 486-520.

**Thomson LU, Rickard SE, Orcheson LJ, Seidl MM (1996).** *Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis.* Carcinogenesis, **17**, s: 1373-1376.

**Uludağ YB (2000).** *İmmobilize Glukomilaz ile Maltodekstrinden Glukoz Üretimi.* Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.

**Villeneuve P, Muderhwa J.M, Graille J, Haas MJ (2000).** *Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical,* Journal of molecular catalysis Benzymatic, s:113-148.

**Wang B, Li D, Wang L, Huang Z, Zhang L, Chen XD ve ark., (2007).** *Effect of moisture content on the physical properties of fibered flaxseed.* International Journal of Food Engineering, **3** s:5.

**Wiseman A (1987).** *Handbook of Enzyme Biotechnology.* 2. ed. New York: EUA John Wiley sons.

**Yaman M (2018).** *Peroksidazın Üç Fazlı Ayırma Yöntemi İle Pazıdan (Beta Vulgaris L. var. Cicla) Saflaştırılması.* İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.