



Pistacia terebinthus BİTKİSİNDEN LİPAZ ENZİMİ

SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Zübeyde BAYER ALTUNTAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Temmuz - 2016

Pistacia terebinthus BİTKİSİNDEN LİPAZ ENZİMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Zübeyde BAYER ALTUNTAŞ

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmenliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
Olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Temmuz - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Zübeyde Bayer Altuntaş'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı *Pistacia terebinthus* Bitkisinden Lipaz Enzimi Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

21/07/2016

Üye : Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Prof. Dr. İsmail ÖZMEN

Üye : Doç. Dr. Kazım UYSAL

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../2016 gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 23 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Danışman

Zübeyde Bayer ALTUNTAŞ

Öğrenci

***Pistacia terebinthus* BİTKİSİNDEN LİPAZ ENZİMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Zübeyde BAYER ALTUNTAŞ
Biyokimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2016
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Lipazlar (triasilgliserol açilhidrolaz, EC. 3.1.1.3), hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon reaksiyonlarını katalizleme yeteneklerinden dolayı endüstride geniş bir uygulama alanına sahiptir. Son yıllarda ise lipazların kullanım alanlarının ve yerinin artması sebebiyle lipaz saflaştırma çalışmaları büyük önem kazanmıştır. Bu çalışmada menengiç (*Pistacia terebinthus*) meyvesinden lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Menengiç meyvesinin proteinlerinin yağsızlaştırılmasından sonra jel filtrasyon metodu kullanılarak lipaz saflaştırılması yapılmıştır. Çalışma sonucunda menengiç meyvesi lipazının 1,25 kat saflaştırıldığı tespit edilmiştir.

Saflaştırılan lipaz enzimi en yüksek aktiviteyi pH 5.6 ve 45 °C sıcaklıkta göstermektedir. Stabil pH 5.6 iken stabil sıcaklık 30 °C olarak belirlenmiştir.

Menengiç meyvesi lipazının iki hafta boyunca aktivite ölçümleri yapılarak depo kararlılığı belirlenmiştir. 4 °C'de 16. günün sonunda enzim aktivitesinin yaklaşık %85'inin korunduğu gözlenmiştir.

Substrat olarak triolein kullanılan menengiç meyvesi lipazının Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0,2641mM ve 9,107U/dkmg enzim olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Menengiç (*Pistacia terebinthus*) meyvesi, lipaz, saflaştırma, enzim kinetiği ve karakterizasyon.

PURIFICATION OF LIPASE FROM *Pistacia terebinthus* PLANT AND STUDIES OF KINETIC PROPERTIES

Zübeyde BAYER ALTUNTAŞ

MS Thesis, 2016

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Lipase enzymes (triacylglycerol acylhydrolase, EC.3.1.1.3), has wide application in industry because of their ability to catalyze hydrolysis, esterification, transesterification reactions. In recent years, lipase purification work has gained importance due to field and place of the use of lipase. In this study, purification and characterization of lipase enzyme from turpentine (*Pistacia terebinthus*) fruit has been intended.

After deoiled of protein of turpentine fruit, purification of the lipase was performed by gel filtration method. And the end of this study, lipase enzyme was purified 1.25 fold from turpentine fruit.

Purified lipase enzyme shows maximum activity at pH 5,6 and 45 °C. Stable pH and stable temperature has been determined as 5.6 and 30 °C, respectively.

The storage stability of turpentine fruit lipase was determined for two weeks making activity measurements. At 4 °C and at the end of 16 days, enzyme activity has been observed that about 85% protection.

It was calculated the K_M and V_{max} values of lipase from turpentine fruit for triolein as substrate 0.2641mM and 9.107U/dk.mg enzyme, respectively.

Key Words: Turpentine (*Pistacia terebinthus*) fruit, lipase, purification, enzyme kinetics, characterization.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana rehberlik eden, çalışmamın her aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışmam hocam Prof. Dr. Metin BÜLBÜL'e şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Ekrem TUNCA'ya; tezimin deneysel kısmında her an benimle olan çalışma arkadaşlarım Gülay KILAR'a ve Canan MERİÇ'e şükranlarımı sunarım.

Maddi ve manevi destekleri ile her an yanımda olan ve çalışmam süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen her şeyimi borçlu olduğum annem Şerife BAYER, merhum babam Mehmet BAYER ve saygıdeğer aile büyüklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zübeyde BAYER ALTUNTAŞ

KÜTAHYA - 2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. Enzimler	2
2.1.1. Enzimlerin tarihi	2
2.1.2. Enzimlerin yapısal özellikleri	4
2.1.2.1. Aktif bölgeler	4
2.1.2.2. Katalitik etkinlik	5
2.1.2.3. Spesifiklik	5
2.1.2.4. Kofaktörler	6
2.1.2.5. Düzenleme	8
2.1.2.6. Hücre içindeki konumları.....	8
2.1.3. Enzimlerin adlandırılması	8
2.1.4. Enzimlerin sınıflandırılması.....	9
2.1.4.1. Oksido-redüktaz	10
2.1.4.2. Transferaz.....	11
2.1.4.3. Hidrolaz.....	11
2.1.4.4. Liyaz (Sentaz)	12
2.1.4.5. İzomeraz.....	12
2.1.4.6. Ligaz (Sentetaz)	12
2.1.5. Enzimlerin etki mekanizması.....	13
2.1.5.1. Reaksiyon sırasında meydana gelen enerji değişimleri	13
2.1.5.2. Aktif bölgenin kimyası.....	14
2.1.6. Enzim kinetiğine etki eden faktörler	15
2.1.6.1. Sıcaklık	15
2.1.6.2. pH.....	16
2.1.6.3. Enzim konsantrasyonu	16
2.1.6.4. Substrat konsantrasyonu ve michealis-menten denklemi.....	16
2.1.6.5. Zaman	20
2.1.6.6. Reaksiyon ürünleri	20
2.1.6.7. Fiziksel etmenler	21
2.1.6.8. İyonlar	21
2.1.6.9. Hormonlar	21
2.1.6.10. İnhibitörler	22

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.1.6.11. Aktivatörler	24
2.1.7. Enzim aktivitesinin düzenlenmesi	24
2.1.7.1. Allosterik bağlanma bölgeleri	24
2.1.7.2. Enzimlerin kovalent modifikasyonla düzenlenmesi	25
2.1.7.3. Enzim sentezinin indüklenmesi ve baskılanması	26
2.1.8. Enzimlerin aktivite ölçüm yöntemleri.....	26
2.1.8.1. Spektrofotometrik yöntem	26
2.1.8.2. Monometrik yöntem.....	26
2.1.8.3. Thunberg yöntemi	26
2.1.8.4. Polimerik yöntem.....	27
2.1.8.5. Kromatografik yöntem.....	27
2.1.8.6. Kimyasal tayin yöntemi	27
2.1.8.7. Elektrot yöntemi.....	27
2.2. Lipazlar	28
2.2.1. Lipazların genel özellikleri	28
2.2.2. Lipazların sınıflandırılması	28
2.2.2.1. 1,3-Spesifik lipazlar	29
2.2.2.2. Spesifik olmayan lipazlar.....	29
2.2.2.3. Yağ asidi spesifik lipazlar.....	29
2.2.3. Lipazların enzimatik etkisi.....	29
2.2.3.1. Hidroliz	29
2.2.3.2. Sentez.....	30
2.2.4. Lipazların kaynakları	31
2.2.4.1. Mikrobiyel lipazlar.....	31
2.2.4.2. Bitkisel lipazlar	32
2.2.4.3. Hayvansal lipazlar.....	32
2.2.5. Lipazların endüstriyel kullanım alanları	32
2.2.5.1. Gıda endüstrisinde lipazlar.....	32
2.2.5.2. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde lipazlar.....	33
2.2.5.3. Organik sentezlerde lipazlar.....	33
2.2.5.4. Zirai ilaç üretiminde lipazlar.....	33
2.2.5.5. Deterjan endüstrisinde lipazlar.....	33
2.2.5.6. Kozmetikte ve kokulu bileşiklerin üretiminde lipazlar	34
2.2.5.7. İlaç sektöründe lipazlar	34
2.2.5.8. Deri endüstrisinde lipazlar	34
2.2.5.9. Biyosensör olarak lipazlar.....	34
2.3. Menengiç (Pistacia terebinthus L.)	34
2.3.1. Menengiç (Pistacia terebinthus L.) türünün özellikleri.....	34
2.3.2. Menengiç (Pistacia terebinthus L.) bitkisinin kullanımı ve biyolojik aktiviteleri.	36
3. MATERYAL VE METOD	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	37

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	37
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	37
3.2. Metotlar	38
3.2.1. Menengiç bitkisinin temini ve yağsızlaştırma işlemi	38
3.2.2. Aktivite tayin yöntemi.....	39
3.2.3. Hidroksiapatit ve Sephadex G-100 jel hazırlanması ile jel filtrasyon kromatografisi	39
3.2.4. Saflaştırılan proteinlerin SDS-PAGE ile karakterizasyonu.....	39
3.2.5. Optimum pH çalışmaları.....	39
3.2.6. Optimum sıcaklık çalışmaları	40
3.2.7. Depo kararlılığının tayini	40
3.2.8. Stabil-pH çalışmaları	40
3.2.9. Stabil-sıcaklık çalışmaları	40
3.2.10. K_m ve V_{max} değerleri	40
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	42
4.1. Sonuç.....	42
4.1.1. Menengiç meyvesi lipazının hidrolitik aktivitesinin tayini.....	42
4.1.2. Menengiç meyvesi lipazının saflaştırma basamakları.....	42
4.1.3. Menengiç meyvesi lipazının optimum pH hesaplanması.....	43
4.1.4. Menengiç meyvesi lipazının optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	44
4.1.5. Menengiç meyvesi lipaz enziminin depo kararlılığının belirlenmesi	45
4.1.6. Menengiç meyvesi lipaz enziminin stabil pH aktivitesi	46
4.1.7. Menengiç meyvesi lipazının stabil sıcaklığının belirlenmesi	47
4.1.8. Lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi	48
4.1.9. Menengiç meyvesi lipaz enziminin SDS-PAGE ile karakterizasyonu.....	50
4.2. Tartışma.....	50
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Enzimatik reaksiyonun gösterimi.....	4
2.2. Bir substratın bir enzimin bir yatay etkin bölgesine üç noktadan bağlanması	6
2.3. Bir kimyasal reaksiyonun aktivasyon enerjisi.....	14
2.4. Substrat konsantrasyonunun hıza etkisi	17
2.5. Linewear Burke grafiği	20
2.6. Yarışmalı inhibisyon	22
2.7. Feed-back inhibisyonu	25
2.8. Fosforilasyon ve defosforilasyon gösterimi	25
2.9. Pistacia terebinthus bitkisi Türkiye dağılımı	35
2.10. Menengiç ağacı ve meyvesi	35
4.1. Menengiç meyvesi lipazının optimum pH'sı.	44
4.2. Sıcaklığın menengiç meyvesi lipazına etkisi.	45
4.3. Menengiç meyvesi lipazının depo kararlılığı.	46
4.4. Menengiç meyvesi lipazının stabil pH aktivitesi.	47
4.5. Menengiç meyvesi lipazının stabil sıcaklık aktivitesi.....	48
4.6. Menengiç meyvesi lipazının Michaelis-Menten grafiği.....	49
4.7. Menengiç meyvesi lipazının Lineweaver-Burk grafiği.....	49
4.8. Menengiç meyvesi lipazının SDS-PAGE ile karakterizasyonu.	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler	7
2.2. Özgül atomların ve işlevsel grupların geçici taşıyıcıları olarak görev yapan bazı koenzimler	8
2.3. Enzimlerin Uluslararası Sınıflandırması	9
4.1. Menengiç meyvesi lipazının saflaştırma basamaklarında aktivite değişimi.	42
4.2. Menengiç meyvesi lipazının saflaştırma basamakları	42
4.3. Menengiç meyvesi lipazının optimum pH değerleri.	43
4.4. Menengiç meyvesi lipazının optimum sıcaklık değerleri.	44
4.5. Menengiç meyvesi lipazının depo kararlılığı.	45
4.6. Menengiç meyvesi lipazının stabil pH aktivitesi.	46
4.7. Menengiç meyvesi lipazının stabil sıcaklık aktivitesi.	47
4.8. Menengiç meyvesi lipazının değişik substrat konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri.	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler** K_m V_{max}

Mg

mL

mM

nm

dk

 μg **Açıklamalar**

Michealis Menten sabiti

Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği max hız

miligram

mililitre

milimolar

nanometre

dakika

mikrogram

1. GİRİŞ VE AMAÇ

"Menengiç bitkisinden lipaz enzimi saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi" isimli çalışmamızda öncelikle kuramsal temeller üzerinde duruldu. Bu çalışmamızın amacı alternatif lipaz enzimi kaynakları bulunarak bu bağlamda yapılan araştırmalara katkıda bulunmaktır. Bu kapsamda enzimler, enzimlerin yapısal özellikleri, enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasından bahsedildi.

Enzimlerin etki mekanizmasından bahsederken de reaksiyon sırasında meydana gelen enerji değişimleri ve aktif bölgenin kimyası konularına değinildi.

Elde etmeyi düşündüğümüz enzimi çok yakından ilgilendiren ve sağlıklı bir enzim elde etmek için önemli olan enzim kinetiğine etki eden faktörler üzerinde duruldu.

Çalışmamızı temellendirmek amacıyla lipazlar ve özellikleri hakkında da bazı temel bilgiler verildi. Bu kapsamda lipazların enzimatik etkisi, kaynakları ve lipazın endüstriyel kullanım alanları üzerinde duruldu.

Tezimize konu olan menengiç bitkisi hakkında bilgi vererek, ele alınan materyal ve yapılan çalışmaların metotları hakkında bilgi verildi.

Ulaştığımız bazı değerler sonuç kısmında başlıklar halinde yazılarak tespitleri ortaya konuldu.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Enzimler

Enzimler, canlı kimyasına birebir uyumlu katalizörlerdir. Bu durumda enzimlerin karbon, oksijen, hidrojen ve azottan oluşan hücrelerde (Hammamchi, 2014) süregelen binlerce biyokimyasal reaksiyonu canlılığa zarar vermeyecek şekilde ılımlı koşullarda gerçekleştiren protein yapısında spesifik biyokatalizörler (Uluğ, 2011) olduğu söylenebilir.

Enzimler canlı organizma yapısı açısından son derece hayati öneme sahiptir. Genellikle sentetik ve inorganik katalizörlerden daha fazla katalitik güce sahiptir. Kimyasal tepkimeleri müthiş derecede hızlandırır ve pH sıcaklığının optimum koşulları altındaki sıvı çözeltilerde etkindir. Biyolojik olmayan katalizörlerin çok azı bu özelliklerin hepsine sahiptir (Cox ve Nelson, 2005).

Fizyolojik olaylarda da yer alan enzimlerin hızlarının tespit edilmesi, sağlık ve hastalıkta merkezi bir rol oynar. Enerji oluşturmak amacıyla besinlerin yıkılarak ve kimyasal yapının önlenmesi; proteinlere, zarlara bu onarımın bloklanmasının montajı ve genetik bilgiyi kodlayan DNA ve hücrelerin sürekliliği için enerjinin kullanımının tamamı, özenle düzenlenen enzim davranışları ile mümkün kılınır. Ender görülen fakat sıklıkla sakatlayıcı ve çoğu kez öldürücü olan bir grup kalıtsal hastalık tek bir enzim eksikliğinin bozulmasından sonra ortaya çıkan çok ağır fizyolojik sonuçlara dramatik örnektir.

Şiddetli doku hasarı (örneğin, kalp veya karaciğer infarktusu, eksterimitelerin ezilmesi) veya kontrol dışı hücre üremesini (prostat kanseri gibi) takiben özgül dokular için özgün olabilen enzimler kana salınır. Dolayısıyla kanda yer alan bu hücre içi enzimlerin ölçümü klinisyene tanı ve prognaz (ilerleyiş) tayininde çok değerli bilgiler sağlar (Murray, vd., 2004).

2.1.1. Enzimlerin tarihi

İnsanoğlu enzimin varlığını farketmeden önce bu maddelerin bizlere sunduğu avantajlardan yararlanmıştı. Bira, şarap, ekmek, yoğurt ve peynir gibi fermante gıdaların üretimi çok eski çağlardan beri bilinmektedir. Fermantasyon, organik maddelerin canlı hücreler tarafından anaerobik şartlarda metabolize edilmesi biyodeğişim geçirmesi işlemidir. Bu işlem aslında canlı hücrelerdeki enzimler aracılığı ile meydana gelmektedir (Hammamchi, 2014).

Enzimlerin kronolojik sıralaması aşağıdaki gibidir:

- Enzimler ile ilgili temel bilgiler 1570 yıllarında elde edilmiştir. Pasteur ve Liebig gibi pekçok tanınmış araştırmacıların katkılarıyla enzimlerle ilgili pek çok temel bilgi sağlanmıştır (Peçe, 2014).
- Belirli bir enzimin üzerindeki ilk çalışmayı 1835 yılında İsveçli kimyager S.S. Berzelius yapmış, diastazın nişastayı "in vivo" olarak sülfürik asitten daha yüksek verimde hidrolizlendiğini göstermiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).
- 1836'da Schwan mide suyundan Pepsin'i elde etmiştir.
- 1838 yılında Berzelius, "katalizör" veya "katalizatör" kavramını ortaya atmıştır (Peçe, 2014).
- 1838'de Gagnard ve Schav adlı bilim adamları, birbirlerinden habersiz bir şekilde fermantasyonu incelemiş ve bunun maya denilen bazı makro organizmalar aracılığı ile geldiğini açıklamıştır (Peçe, 2014).
- 1850'li yıllarda Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentlenmesinin "fermentler" tarafından katalizlendiği sonucuna varmış ancak enzimlerin yalnız canlı hücre yapısı içinde görev yapabildiklerini zannetmiştir (Cox ve Nelson, 2005; Keha, ve Küfrevioğlu, 2010).
- 1879 yılında Kuhne, canlı mekanizmadaki katalizörlediğerlerinden ayırmak için "enzim" ifadesini önermiştir.
- 1883 yılında Payen ve Perşon nişastanın çözünür hale gelmesinde malt özütündeki "diastaz enziminin" etkin olduğunu göstermiştir.
- 1885 yılında Blumenthol, peynir yapmak için, ilk defa rennin enziminin özütünü teknolojik aşamada üretmeyi başarmıştır.
- 1897'de Buchner, maya hücrelerinden bazı enzimleri ayırarak yeni bir araştırma sahası oluşturmuştur (Güngör, 2008).
- 1915 yılında Rahm, lipaz ve proteaz enzimlerinin çamaşır yıkama sularında oldukça etkili bir temizleyici olduğunu ortaya koymuştur (Peçe, 2014).
- Enzimoloji alanındaki en önemli gelişme, 1926 yılında J.B.Sumner'in üreaz enzimini "Jack bean" bitkisinden elde ederek, kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasındır.
- 1930-1936 yılları arasında J. Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirerek protein yapısında olduklarını kesin olarak ortaya koymuştur (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).
- 1930'larda 80 adet enzim tanınırken, 1968'lerde bu rakam 1300'e, 1982'de 2000'e yükselmiştir. Günümüzde ise 2500 enzimin var olduğu bilinmektedir (Peçe, 2014).

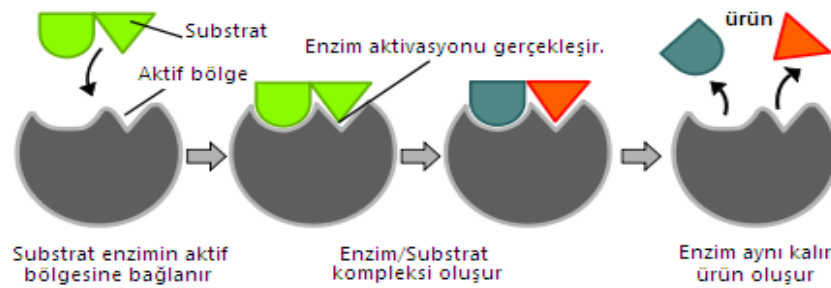
- Bugün tespit edilen enzimlerin çoğu saf bir şekilde elde edilerek kinetikleri incelenmiş ve bunların 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Fakat genetik çalışmalar sonucunda henüz tespit edilmemiş birçok enzimin olduğu bilinmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

2.1.2. Enzimlerin yapısal özellikleri

Enzimler kimyasal reaksiyonların hızını arttıran ve katalizledikleri reaksiyon esnasında ürüne katılarak harcanmayan protein katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu olan ve ribozim olarak adlandırılan RNA'lar ile karıştırılmamalıdır. Bu RNA'lar özellikle fosfodiester bağlarının yıkımı ve sentezi sırasında enzimler gibi davranabilirler. Bu tip RNA'lar ile protein katalizörlerden daha az karşılaşılır (Cox ve Neson, 2005; Champe vd., 2007).

2.1.2.1. Aktif bölgeler

Enzimlerin aktivite göstermesi için mutlaka gerekli olan, organik madde veya metal iyonundan oluşan enzimin fonksiyonel kısımlarına aktif bölge denir. Enzimle katalizlenen reaksiyonlarda; reaksiyon, enzim molekülündeki bu aktif bölge denen bir cep veya yuva içinde meydana gelir (Champe vd., 2007; Adam ve Yiğitoğlu, 2012; Bülbül, 2014). Aktif bölgeye bağlanarak enzimde aktivite gösterdiği moleküle substrat denir. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonu katalizleyerek üç boyutlu bir yüzey oluşturan amino asit kalıntılarıyla oluşmuştur (Cox ve Nelson, 2005; Champe vd., 2007). Substratın enzimin aktif bölgesine bağlanması ile enzim-substrat (ES) kompleksi oluşur ve bu daha sonra enzim-ürün (EP) kompleksine dönen yapıdan enzimin ayrılması ile ürün elde edilir (Adam ve Yiğitoğlu, 2012; Bülbül, 2014).



Şekil 2.1. Enzimatik reaksiyonun gösterimi.

2.1.2.2. Katalitik etkinlik

Enzimlerin hücrelerde az miktarda bulunması doku özütü veya sıvılardaki enzim miktarının ölçümünü güçleştirir. Fakat bir enzimin katalitik etkinliği, bunun ölçümü için duyarlı ve özgün bir sonda sağlanmaktadır. Her enzim molekülü binlerce veya daha çok substrat molekülünün ürüne dönüşümünü çok kısa bir sürede katalize etme yeteneğine sahiptir.

Bir doku özütü veya sıvı örneğindeki bir enzimin miktarını belirlemek için, örnekteki enzim tarafından katalize edilen reaksiyonun hızı ölçülür. uygun koşullar altında tepkimenin ölçülen hızı var olan enzim miktarı ile orantılıdır. Var olan moleküllerin sayısı veya enzimin kütleini belirlemek güç olduğundan sonuçlar enzim üniteleri (birimleri) olarak ifade edilir. Bu yolla, farklı özütlerde bulunan enzimin bağıl nicelikleri karşılaştırılabilir. Uluslararası Biyokimya Birliği, bir dakika içinde tepkimeye giren substrat veya oluşan ürün miktarını mikromol (μmol ; 10^{-6} mol) olarak tanımlar (Murray vd., 2004). Bir enzimin ürüne dönüşmüş substrat molekülü sayısına "turnover sayısı" denir (Champe vd., 2007).

2.1.2.3. Spesifilik

Enzimler oldukça benzer yapıdaki substratlar arasında ayırım yapabilen çok özgül moleküllerdir (Cox ve Nelson, 2005). Enzimler başlıca dört tür spesifite gösterir.

a. Mutlak spesifite

Mutlak spesifitede enzim yalnız kendine uyumlu bir tek substrata etki eder. Bu tip enzimlerin sayıları oldukça sınırlıdır. Örneğin üreaz, karbonik anhidraz ve fumaraz bu gruba girer.

b. Nisbi spesifite

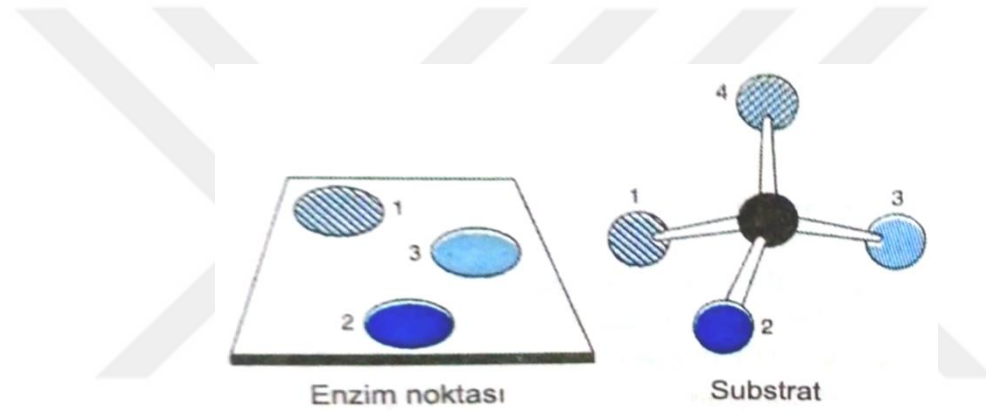
Bir enzimin birden fazla substrata karşı gösterdiği tercihtir. Bu tür enzimlere proteolitik enzimler, glikodazlar ve esteraz enzimleri örnek gösterilebilir.

c. Sterospesifite

Bir enzimin sadece glukozun D veya L izomerleri gibi belli optik izomerlere etki etmesidir. Bu durumu Murray ve arkadaşları (2004, s.76-77) şu şekilde açıklamaktadır:

"Substaratların çoğu enzimlerle en az üç bağ kurar. Bu "üç noktadan bağlanma" başka her yönden bakışlımlı olan moleküle bir asimetri kazandırır. Şekil 2.2, bir enzim yerine üç noktadan bağlanmak üzere olan ve üç ayrı grup bağlı bir karbon atomu ile temsil edilen bir substrat molekülünü göstermektedir. Bu enzim bölgesine sadece bir taraftan yaklaşılabiliyor ve

sadece enzim bölgeleri ile bunların tamamlayıcısı olan atomlar tepkime verebiliyorsa (gerçek enzimler için geçerli olan varsayımlardır) bu molekül ancak tek bir yolla bağlanabilir. 1. ve 4. atomların aynı olması halinde dahi bu tepkime sadece 1. ve 2. noktalarda bağlanan atomlarla sınırlanabilir. Substrat molekülünün uzayda döndüğünü hayal edersek, bu molekül ancak tek bir konuşa sahipse, yatay enzim bölgesinin bir tarafına üç noktadan bağlanabilecektir. Sonuçta 1. ve 4. atomlar, birbirlerinin aynı olmalarına karşın substrat enzime bağlandığında birbirlerinden uzaklaşır. Dolayısıyla kimyasal bir değişim, 1. atomu kapsarken 4. atoma karışmayacak veya bunun aksi görülebilecektir. Enzimlerin etkin bölgeleri şekil 2.2'de sunulduğu gibi yatay düzlemler olmamakla beraber bu şekil, örneğin optik olarak etkinsiz pirüvattan enzimle kataliz edilen bir indirgeme sonucu neden D,L-laktat değil de L-laktat üretildiğini açıklar."



Şekil 2.2. Bir substratın bir enzimin bir yatay etkin bölgesine üç noktadan bağlanması.

d. Bağ Spesifikliği

Bir enzimin peptit ve glikozidik bağlar gibi belirli bağ türlerinde etkin olmasına denir. Kimotripsin enzimi, aromatik halkalı amino asitlerde oluşan peptit bağının hidrolitik parçalanmasını sağlar (Ünaldı ve Yöntem, 2011; www.mustafaaltinisik.org.uk).

2.1.2.4. Kofaktörler

Bazı enzimler, enzimatik reaksiyon için protein yapısı meydana getiren amino asit kalıntılarından başka bileşene ihtiyaç duymazlar. Bazıları ise protein olamayan kofaktörler diye adlandırılan bir ek kimyasal bileşene ihtiyaç duyarlar. Genellikle görülen kofaktörler arasında Zn^{+2} ve Fe^{+2} gibi metal iyonları ile koenzim diye bilinen NAD^+ , FAD veya CoA gibi organik moleküllerdir. Kofaktörün rolü, enzim proteinin üç boyutlu yapısını değiştirerek bu enzimi aktive etmektedir. Böylece enzimin substrat ile bağlanmasını ve karşılıklı etkilerini arttıran bir yapı şekline dönüştürmektedir. Kofaktör ikinci bir substrat gibi reaksiyonun tümüne katılır.

Kofaktörler; enzimlerin aksine ısıya dirençlidirler. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine haloenzim denir. Enzimin protein yapısında aktive olması için koenzim gerektiren inaktif parçasına ise apoenzim denir. Kofaktörlü enzimlerin, bu bileşik veya metal iyonlarına farklı derecelerde afiniteleri vardır. Bu faktörler diyalizle uzaklaştırılabilir. Fakat apoenzim-koenzim bağlanması kovalent bağlarla gerçekleştiyse diyalizle uzaklaştırılmaz. Bu tip koenzime ise "prostetik grup" denir. Örneğin "stokram C" deki "hem" grubu enzimin peptit zincirine kovalent bir bağla bağlıdır. enzime gevşek olarak bağlanmış koenzimlerle enzim arasındaki etkileşimler enzim-substrat etkileşmesine benzer. Reaksiyonlardan sonra enzimlerden ayrılarak bir başka metabolizma olayında yer alabilirler (Champe vd., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Adam ve Yiğitoğlu, 2012; www.mustafaaltinisik.org.uk).

Çizelge 2.1. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler.

Kofaktörler	Enzimler
Cu^{+2}	Sitokrom oksidaz
Fe^{+2} ve Fe^{+3}	Sitokrom oksidaz, katalaz, peroksidaz
K^{+}	Piruvat kinaz
Mg^{+2}	Heksokinaz, glukoz 6-fosforaz, piruvat kinaz
Mn^{+2}	Arginaz, ribonükleotit redüktaz
Mo	Dinitrogenaz
Ni^{+2}	Üreaz
Se	Glutasyon peroksidaz
Zn^{+2}	Karbonik anhidraz, alkol dehidrogenaz, karboksipeptidaz A ve B

Çizelge 2.1 deki enzimlerde metal iyonlarının substrat ve enzim arasında köprü görevi görerek koordinasyon kompleksi oluşumu ile birbirine bağlanması ve kendilerinin katalitik bir fonksiyon görmesi açısından iki çeşit işlevi vardır. Mesela, katalaz enziminin demir atomları, hidrojen peroksidin parçalanmasında katalitik merkez görevini yüklenmiştir. Aynı özelliği demir tuzları da H_2O_2 'nin bozunması reaksiyonunda göstermektedir. Fakat bu özellik enzimin protein kısmı tarafından daha da arttırılır.

Koenzimler genellikle elektronlar, belirli atom veya fonksiyonel grupların transferini gerçekleştirir. Çizelge 2.2 de görüldüğü gibi B vitaminlerini oluşturan bu bileşikler hayvan organizmaları tarafından sentezlendiğinden diyetle alınmaları gerekir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Çizelge 2.2. Özgül atomların ve işlevsel grupların geçici taşıyıcıları olarak görev yapan bazı koenzimler.

Koenzim	Transfer edilen kimyasal grup örnekleri	Memelilerde besinsel öncül
Biyositin	CO ₂	Biyotin
Koenzim A	Açıl grupları	Pantotenik asit ve diğer bileşikler
5'Deoksi adenzil kobalamin (koenzim B ₁₂)	H atomları ve alkil grupları	Vitamin B ₁₂
Flavin adenin dinükleotit	Elektronlar	Riboflavin (vitamin B ₁₂)
Lipoat	Elektronlar ve açıl grupları	Diyette şart değildir
Nikotinamid adenin dinükleotit	Hidrit iyonu (:H ⁻)	Nikotinik asit (Niyasin)
Piridoksal fosfat	Amino grupları	Pridoksin (vitamin B ₆)
Tetrahidrofolat	Tek-karbonlu gruplar	Folat
Tiyamin pirifosfat	Aldehitler	Tiyamin (vitamin B ₁)

2.1.2.5. Düzenleme

Enzimler ürünlerin oluşma hızı ve hücrelerin gereken ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde aktive ya da inhibe ederek enzimin aktivitesini düzenleyebilirler (Champe vd., 2007).

2.1.2.6. Hücre içindeki konumları

Enzimler hücrelerde spesifik organellere lokalizedirler. Bu izolasyon sonucu reaksiyon substrat veya ürün için yarışan diğer reaksiyonlardan korunur, reaksiyon için uygun ortam sağlayarak ve hücrelerdeki binlerce enzimi hedefe uygun şekilde organize eder (Champe vd., 2007; Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

2.1.3. Enzimlerin adlandırılması

Enzimler aktif veya inaktif oluşlarına göre adlandırılırlar. İnaktif bir enzim adlandırılırken substratın sonuna "jen" eki getirilir. Tıpkı pepsinojen gibi. Aktif durumdaki enzimde ise enzimlerin çözdükleri yahut parçaladıkları substratın sonuna -az veya -olitik takısı getirilir. Örneğin yağları parçalayan enzimlere lipaz (lipolitik enzim), nişastayı parçalayanlara amilaz (amilolitik enzim) ve proteinleri parçalayanlara ise proteaz (proteolitik enzim)

denilmektedir. Bazen enzimin kaynağı kullanılarak "pankreatik lipaz" gibi detaylı isimlerde verilir (Ası, 1999; Hammamchi, 2014).

2.1.4. Enzimlerin sınıflandırılması

Gün geçtikçe bilinen enzimlere bir yenisinin eklenmesi ve aynı enzime bazen substratın, bazen katalize edilen reaksiyonun bazen de farklı yöntemlerle farklı isimlerin verilmesi sonucunda birçok yanlışlıklar ortaya çıkmıştır. Bunu üzerine Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) her enziminaltı sınıfa bölünerek birçok alt grup içerdiği bir isimlendirme sistemi geliştirmiştir. IUBMB isimleri net ve bilgi vericidir ancak bazen genel kullanımı zorlaştırmaktadır (Ası, 1999; Champe vd., 2007).

Bu sınıflandırılmaya göre yapılan adlandırılmaya sistematik adlandırma denir. Bu adlandırmaya göre her enzimin sistematik bir kodu vardır. Bu kod E.C. (Enzyme Commission) harflerinden sonra artarda gelen dört rakamdan oluşur. Dizide yer alan birinci rakam, enzimin hangi sınıfa dahil olduğunu göstermektedir. İkinci ve üçüncü rakamlar alt ve daha alt sınıfları açıklamaktadır. Dördüncü rakam ise üçüncü sayı ile ifade edilen alt sınıftaki seri numarasını belirlemektedir. Örneğin E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz sınıfında bulunduğunu; 7, bir fosfat grubunun transferini; 1, bu transferin alkol grubuna olduğunu sonuncu 1 rakamı ise bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimlerin ilki olduğunu göstermektedir. Bu bu koda sahip enzim ATP:D-hekzokinaz 6-fosfotransferaz enzimidir ve hekzokinaz geleneksel ismiyle bilinir. Uluslararası enzim sınıflaması çizelge 2.3 de verilmiştir.

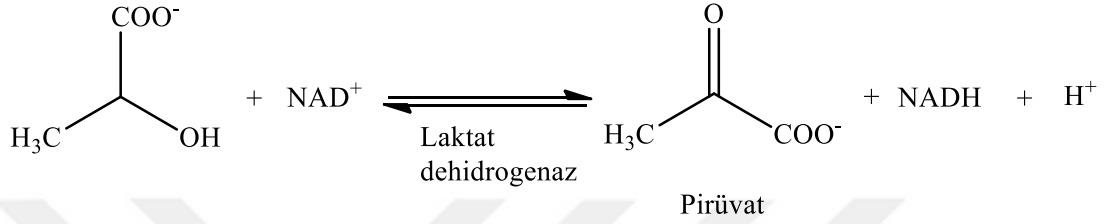
Çizelge 2.3. Enzimlerin uluslararası sınıflandırması.

No	Sınıf	Katalizlenen Tepkime Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların tansferi (hidrit iyonları ve H atomları)
2	Transferazlar	Grup transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değişmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

2.1.4.1. Oksido-redüktaz

İndirgenme -yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Laktat, katalaz, peroksidaz ve monooksijenaz bu gruptandır.

Örnek:



Bu enzimler kendi içinde beşe ayrılırlar:

a. Dehidrogenazlar:

Elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler. Elektron akseptörü olarak NAD(P)^+ kullanılır.

b. Oksidazlar:

Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler. Elektron akseptörü olarak moleküler oksijen kullanılır.

c. Redüktazlar:

Substratı bir redüktör ile indirgeyen enzimlerdir. Mesela asetaldehit redüktaz, asetaldehit alkole redükler.

d. Transhidrogenazlar:

Moleküller arasında hidrojen taşıyarak onu redükler.

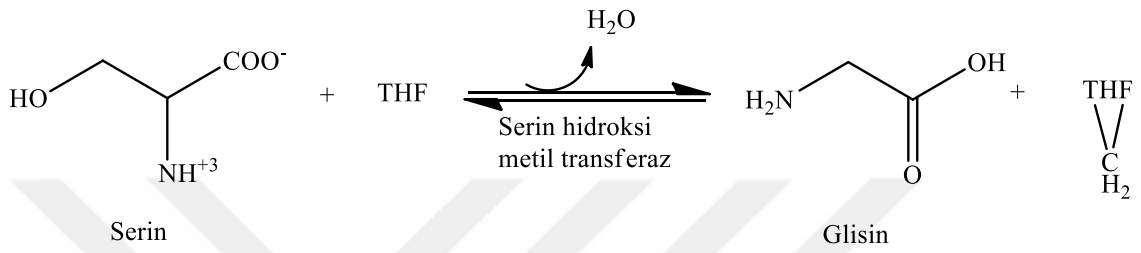
e. Hidroksilazlar:

Substratına bir hidroksil ya da su molekülü katan enzimlerdir. Mesela; fenilalanin hidroksilaz enzimi fenilalanine bir hidroksil grubu katarak onu tirozine çevirir (Champe vd., 2007; Yücel, 2008; Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

2.1.4.2. Transferaz

İki substrat arasında hidrojen dışındaki C-, N-, ve P- taşıyan grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan "kinaz" enzimleri bu gruptadır. Bu grup içindeki dekarboksilazlar karboksilik asitlerden CO₂ molekülünün çıkmasını sağlarlar.

Örnek:



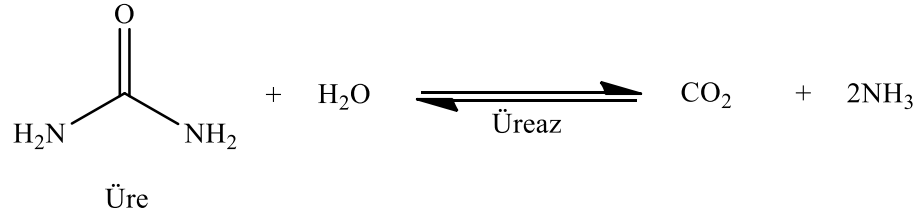
Transferazlarda kendi içinde beşe ayrılırlar:

- Bir C'lu grupları transferini yapanlar.
- Aldehit veya keton gruplarını transferini yapanlar.
- Asil gruplarının transferini yapanlar.
- Şeker gruplarının transferini yapanlar.
- Diğer transferaz enzimleri (Ası, 1999; Champe vd., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

2.1.4.3. Hidrolaz

Bağlara su ekleyerek moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür yahut P-N bağlarına bir H₂O molekülü katılarak hidrolizini katalizler. Bütün proteolitik enzimler ve estera, fosfotaz, glikozidaz, nükleaz ve tez konumuz olan lipaz gibi enzimler bu gruptadır (Champe vd., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

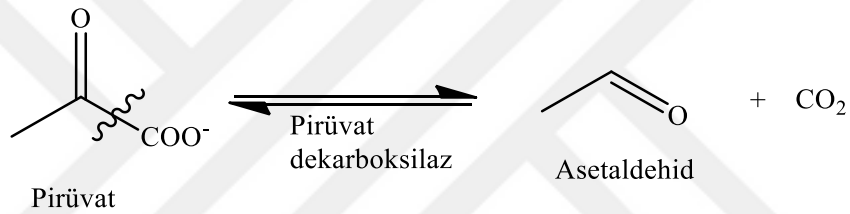
Örnek:



2.1.4.4. Liyaz (Sentaz)

Bu enzimlerin reaksiyonlarında ATP kullanılmaz. C-S, C-C ve belirli C-N bağlarının yıkımını katalizleyen enzimlerdir. Çift bağ oluşumunu sağlayarak H₂O, NH₃ ve CO₂ ekleyip çıkarırlar (Champe vd., 2007; Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

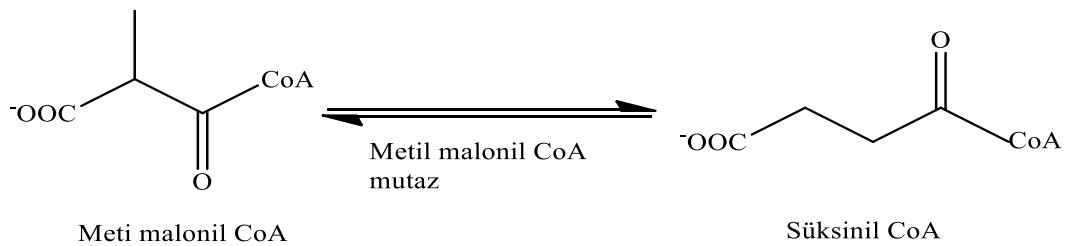
Örnek:



2.1.4.5. İzomeraz

Optik veya geometrik izomerlerin rasemizasyonu katalizleyerek molekül içi düzenleme yaparlar. Hekzofosfat, izomeraz, fosfogluco izomeraz, metil malonil CoA mutaz bu gruptandır (Champe vd., 2007; Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

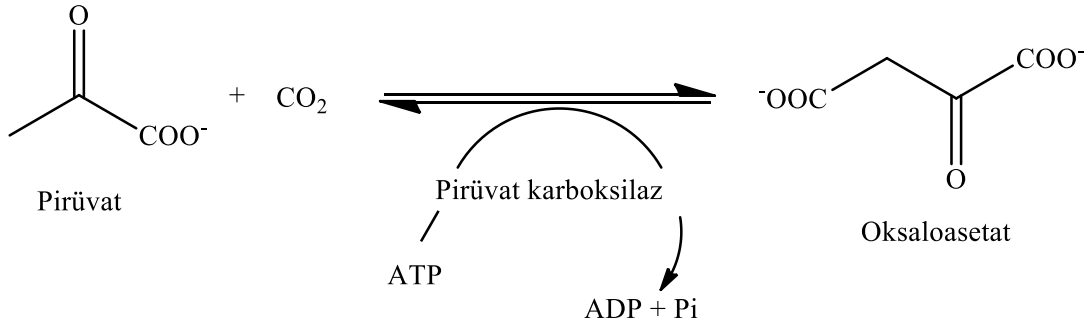
Örnek:



2.1.4.6. Ligaz (Sentetaz)

ATP ve GTP gibi yüksek enerjiye sahip fosfat bileşiklerinin fosfat bağının kopmasıyla gözlenen enerjinin yardımı ile iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Champe vd., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2010). Amino asitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesi bu gruba örnek olabilir (Yücel, 2008).

Örnek:



2.1.5. Enzimlerin etki mekanizması

Enzimlerin kataliz mekanizmaları ile kimyasal tepkime mekanizmaları birbirine benzemesine rağmen inorganik ya da organik katalizörlerin aksine enzimler çok yüksek substrat özgülüğü ve harika bir katalitik etkinlik gösterir (Murray, 2004).

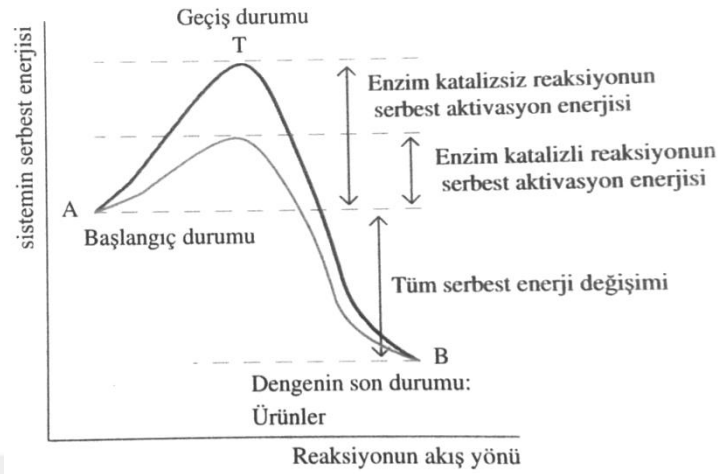
Enzimlerin etki mekanizması iki açıdan ele alınabilir. Birincisinde, kataliz reaksiyon sırasında oluşan enerji değişimi açısından değerlendirilir. İkincisindeyse aktif bölgenin kimyasal açıdan katalizi nasıl hazırladığı anlatılır (Champe vd., 2007).

2.1.5.1. Reaksiyon sırasında meydana gelen enerji değişimleri

Kimyasal reaksiyonların hepsinde reaktan ile ürünleri ayıran bir enerji bariyeri bulunmaktadır. Bu bariyer serbest aktivasyon enerjisi olarak adlandırılır.

a. Serbest Aktivasyon Enerjisi

Serbest aktivasyon enerjisi, substratın serbest enerjisi ile bunun ürüne geçiş döneminde kazandığı enerjileri arasındaki farktır. Şekil 2.3'te substratın ürüne dönüşümü esnasında yüksek enerjiye sahip bir ara ürünün oluştuğu geçiş durumu belirtilmiştir (Adam ve Yiğitoğlu, 2012).



Şekil 2.3. Bir kimyasal reaksiyonun aktivasyon enerjisi.

b. Reaksiyonun Hızı

Reaksiyonun başlayabilmesi için aktivasyon enerjisini aşmaya yetecek kadar enerjiye sahip olmalıdır. Enzimsiz bir reaksiyonda molekülün yalnızca küçük bir kısmı bu kadar yüksek bir enerjiye sahip olabilir. Reaksiyonun hızı bu tip enerji bariyerini aşabilen moleküllerin sayısıyla belirlenir. Dolayısıyla serbest aktivasyon enerjisinin düşmesiyle orantılı olarak molekül geçiş durumunu aşar ve buna bağlı olarak reaksiyonun hızı artar.

c. Alternatif Reaksiyon Hızı

Enzimler alternatif bir reaksiyon yolu sağlayarak serbest aktivasyon enerjisini düşürürler ve reaksiyonun hücre içindeki şartlarda daha hızlı ilerlemesini sağlarlar. Enzim substrat ve ürünün serbest enerjisini değiştirmez ve bunun sonucunda reaksiyon dengesinin de değişmez.

2.1.5.2. Aktif bölgenin kimyası

Bölüm 2.1.2.1'den de anlaşılacağı üzere aktif bölge sadece substratın bağlanacağı basit bir cep ya da yuva değil, aksine substratın ürüne dönüşümünü hızlandıran ve birçok mekanizmayı yürüten karmaşık moleküler bir mekanizmadır (Champe vd., 2007). Burada enzimlerin kataliz etkinliğinden sorumlu birçok faktörden bazıları ele alınacaktır.

a. Geçiş Durumu Stabilizasyonu

Enzim, substratı geçiş durumunda kararlı hale getirerek ürüne çevrilebilecek reaktif ara ürün konsantrasyonunu büyük ölçüde artırır. Bunun sonucunda reaksiyon hızlanır.

b. Diğer Mekanizmalar

Aktif bölge, geçiş durumunu oluşturan sağlayan katalitik grupları barındırır. Bu gruplar bir kısım enzimlerde amino asit kalıntılarının proton alıp verdiği genel asit baz katalizine katılırken diğer bir kısımdaysa kataliz geçişi bir kovalent enzim-substrat kompleksinin oluşmasını sağlar (Champe vd., 2007).

2.1.6. Enzim kinetiğine etki eden faktörler

Enzim kinetiği, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarını ve reaksiyon koşullarını değiştirmenin etkisini inceler. Enzimlerin katalitik mekanizmalarını, metabolizmadaki görevlerini, aktivitelerinin kontrol ediliş yöntemini ve bir ilaç yahut zehrin enzimi nasıl inhibe edebildiğini görebilmek için enzimlerin kinetiklerinin çalışılması gerekmektedir (Ünaldı ve Yöntem, 2011; Bülbül, 2014).

2.1.6.1. Sıcaklık

Sıcaklık artarken tepkime hızı da artar. Ancak bu artış sadece çok dar bir sıcaklık aralığında gözlenir. Tepkimenin hızı başlangıçta sıcaklık artışına bağlı olarak artar. Bu durumun nedeni tepkici moleküllerin kinetik enerjilerindeki artıştır. Diğer yandan enzimdeki bu kinetik enerji artışı, en sonunda, enzimin yapısında bulunan zayıf hidrojen ve hidrofobik bağların yıkılmasını sağlayan enerjiyi aşar. Bu sıcaklıkta denatürasyon gözlenir ve oluşan çökeleğin katalitik etkinliği yok olur. Bu enzimin kararlı ve katalitik olarak uygun bir kan formasyonda bulunduğu sıcaklık sınırı genelde içinde yer aldığı hücrelerin sıcaklığına bağlıdır -ve hafifçe bunu aşar-. Vücut sıcaklığını 37 °C'ta sürdüren insandan alınan enzimler, 45-55 °C sıcaklıklarına kadar genellikle kararlı bir haldedirler. Doğal sıcak su kaynaklarında veya okyonus tabanındaki hipertermal akıntılarda yaşayan mikroorganizmalardan temin edilen enzimler 100 °C veya daha üstü sıcaklıklarda kararlı olabilirler. Fakat ısıya maruz kalma süresi de oldukça önem taşır. Mesela, oda sıcaklığındaki birkaç saatlik süre, 100 °C'de birkaç saniyelik süreden daha yıkıcı etki yapabilmektedir. Bu sebeple canlı dokulardan elde edilen enzimler, soğuk oda, buzdolabı, derin dondurucu gibi yerlerde muhafaza edilir.

Her enzim belli bir derecede en verimli bir hız ile çalışır. Her enzim için ayrı olabilen bu en verimli sıcaklık derecesine optimal sıcaklık derecesi denir. Optimal sıcaklık genel olarak

hayvanlarda 36-37 °C'lerde iken bitkilerde bu sıcaklık 50-55 °C'lere kadar yükselebilir. Bu optimum sıcaklığın üzerinde protein yapısındaki enzim denatüre olur.

Optimum sıcaklığa ulaşınca kadar sıcaklıktaki her 10 °C'lik artışta enzimatik aktivitede 1,1-5,3 katı kadar bir artış görülür. Sıcaklıktaki her 10 derecelik artışa karşılık reaksiyon hızının artışına Q_{10} veya sıcaklık faktörü denir.

İnsan gibi homeotermik organizmalar beden sıcaklığının ancak çok dar aralıklarda değişmesine dayanabilir. Bu durumda tepkimeye ait enerji engelini aşabilmek için gerekli duyulan kinetik enerjiye sahip moleküllerin sayısındaki artış homeotermik organizmalar açısından oldukça kısıtlı bir fizyolojik seçenek oluşturduğundan akla enzimlerin tepkime hızlarını nasıl arttıracacağı sorusu gelmektedir. Bu noktada ise enzimlerin tepkimeye ait enerji engellerini düşürme ve yerel tepkici derişimlerini artırma becerileri devreye girmektedir (Murray vd., 2004; Ünalı ve Yöntem, 2011; www.mustafaaltinisik.org.uk).

2.1.6.2. pH

Her enzimin aktivitesinin maksimum olduğu pH değeri vardır. Bu pH değerlerine enzimin optimal pH'sı denir. Bu değerlerin altında ve üstünde aktivite düşer (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

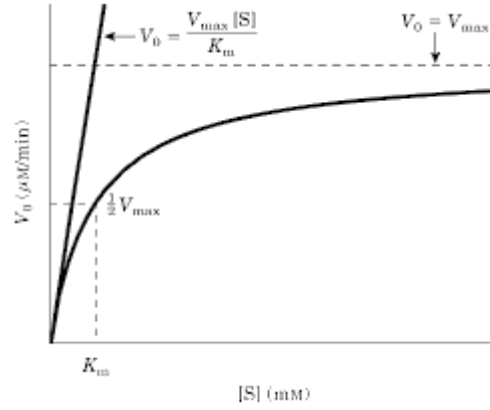
2.1.6.3. Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı ortamda bulunan enzim miktarı ile doğru orantılı olarak artar (Ünalı ve Yöntem, 2011).

2.1.6.4. Substrat konsantrasyonu ve michealis-menten denklemi

Sabit enzim konsantrasyonunda reaksiyonun hızı belli bir aşamaya kadar substrat konsantrasyonu ile artmaktadır. Bu durumdaki artışta ise reaksiyon hızını değiştirmemektedir. Bu durum reaksiyon kinetiklerinin iki fazlı olduğunu göstermektedir.

Enzimatik reaksiyon ilk durumda birinci dereceden bir kinetik gösterirken ikinci durumda ise sıfırıncı dereceden bir kinetik gösterir. Hız, substrat konsantrasyonunun artması ile maksimum hıza yaklaşır. Bu maksimum hızda artık enzimin substrat ile doydugu anlaşılır. Bu hız maksimum hız denir ve V_{max} ya da V_M ile gösterilir. Optimal sıcaklık ve optimal pH gibi sabit şartlarda bir enzim miktarı ile değişik substrat konsantrasyonları arasındaki enzimatik reaksiyon hızının grafiği şekil 2.4'tedir (Yücel, 2008; Ünalı ve Yöntem, 2011; Murray vd., 2004).

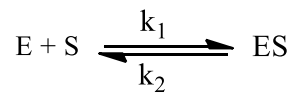


Şekil 2.4. Substrat konsantrasyonunun hızı etkisi.

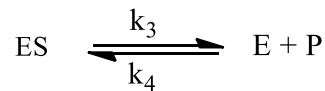
Enzimatik reaksiyon hızının maksimum olduğu durumda enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat konsantrasyonuna Michealis-Menten sabitesi denir ve bu sabit K_m ile gösterilir. Bir enzimin K değeri ile enzimin substratına olan ilgisi anlaşılabilir. K_m küçükse enzimin substratına ilgisi fazla büyükse ilgisi azdır.

$$K_m = \frac{V_M}{2} \text{ 'dir.}$$

Yukarıda da bahsedildiği üzere substrat ($[S]$) konsantrasyonu ile enzimatik reaksiyon arasındaki ilişki iki basamakta incelenir. Enzimin (E) ilk aşamada enzim substrat (ES) kompleksi meydana getirmek amacıyla substratı ile göreceli hızlı tersinir bir basamakta birleştiği idda edilir:



Sonra ES kompleksi ilk duruma göre yavaş olan ikinci bir basamakta yıkılarak serbest enzim ve reaksiyon ürünü (P) verir:



İkinci tepkimenin daha yavaş olmasından dolayı tüm tepkimenin hızı sınırlanır. Tüm hız bu basamaktaki tepkimeye giren türlerin yani ES 'nin derişimi ile orantılıdır.

Enzim, S ile k_1 hız sabiti ile birleşerek ES kompleksinin oluşturur. Burada iki durum söz konusudur. ES kompleksi ya E ve S 'a ayrılır ya da E ve P 'ne dönüşür. E ve P 'den k_4 hız sabiti ile

tekrar ES kompleksine dönüşme olasılığı olsa da bu durum çok düşük düzeyde olduğu için ihmal edilir. Buna göre reaksiyonda ürün oluşum hızı;

$$V = k_3[ES] \text{ şeklindedir.}$$

ES kompleksinin oluşma ve parçalanma hızı;

$$ES = k_1[E][S]$$

$$ES = k_1[ES] + k_3[ES] \text{ ise } ES = (k_2 + k_3)[ES] \text{ şeklinde yazılır.}$$

ES kompleksinin yapım ve yıkım hızı eşit olursa reaksiyonun kararlı olduğu söylenebilir. Bu durumda [ES] derişimi ile ilgili eşitlik yazılabilir.

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

Burada [ES]'i yalnız bırakırsak eşitlik,

$$[ES] = k_1[E][S] / (k_2 + k_3) \text{ şeklinde olur.}$$

Eşitliği yeniden düzenlersek;

$$[ES] = [E][S] / ((k_2 + k_3) / k_1) \text{ şeklinde olur.}$$

Bu eşitlikteki sabitlerin tek bir terimde toplamak için, $K_m = (k_2 + k_3) / k_1$ şeklinde yazılabilir. Burada K_m 'e Michealis sabitesi adı verildiğinden daha önce bahsedilmişti. Bu sabit yerine konulduğunda;

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \text{ şeklini alır.}$$

Yukarıdaki eşitlikte yer alan [E] ve [S] terimleri incelendiğinde herhangi bir andaki S konsantrasyonu, başlangıçtaki ile aynı alınabilir. Çünkü enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonundan çok küçük olduğunda reaksiyon boyunca S konsantrasyonu değişmediği kabul edilebilir. Ancak serbest haldeki enzim konsantrasyonu, toplam enzim konsantrasyonu ile [ES] arasındaki farka eşittir.

Yani;

$$[E] = [E_T] - [ES] \text{ 'dir.}$$

Bir önceki eşitlikte [E] yerine konulursa;

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{K_m} \text{ elde edilir. Eşitlik [ES] için çözümlerse}$$

$$[ES] = [ET] \frac{[S]}{[S] + K_m} \text{ eşitliği elde edilir.}$$

$[Et] = [ES]$ doyunluk halinde reaksiyon maksimum hızda yürüyeceği için

$V_{max} = k_3[Et]$ olacaktır. Tüm bu eşitliklerden;

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \text{ eşitliği}$$

yani Michaelis-Menten eşitliği elde edilir. Kısaca bu eşitlik substrat konsantrasyonu değiştiği takdirde enzim ne şekilde hareket edeceğini tarif eder (Cox ve Nelson, 2005; Ünalı ve Yöntem, 2011; Bülbül, 2014).

a. Michaelis-Menten Kinetiğinin Sonuçları

- **K_m'nin Özellikleri**

K_m -Michaelis Sabiti- belirli bir enzimin ve substratın değerini göstererek o enzimin substratına ilgisini belirtir. K_m, sayısal anlamda reaksiyon hızının 1/2 V_{max}'a eşit olduğundaki substrat konsantrasyonunu gösterir. Enzimin konsantrasyonu K_m değerine etki etmez.

Sayısal olarak K_m değeri küçükse enzimin substrata ilgisi yüksektir. Çünkü, enzimin yarı doyunluğa erişmesi yani 1/2 V_{max} hızına ulaşması için düşük konsantrasyondaki substrat yeterlidir.

Sayısal olarak K_m değeri büyükse enzimin substrata ilgisi azdır. Çünkü enzimin yarı doyunluğa ulaşması için yüksek konsantrasyondaki substrata ihtiyaç duyulmaktadır (Champe vd., 2007).

- **Hız ile Enzim Konsantrasyonu Arasındaki İlişki**

Bütün substrat konsantrasyonlarında reaksiyonun hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örneğin enzim konsantrasyonu yarıya indirilirse reaksiyon ilk hızı (V₀) orijinalin yarısına iner (Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

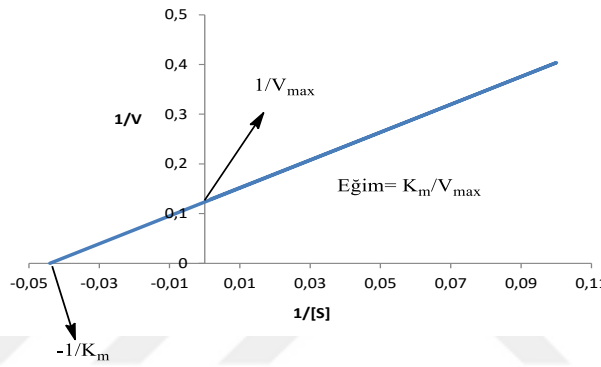
- **Reaksiyonun Basamağı**

Substrat konsantrasyonu, K_m'den çok küçük olduğu durumda, reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonu ile kabaca orantılıdır. Buna göre reaksiyon hızının substrata göre birinci basamak olduğu söylenir. [S], K_m değerinden çok büyük ise hız V_{max} değerine eşit ve sabittir. Buna göre reaksiyon hızıyla substrat konsantrasyonu birbirinden bağımsızdır ve substrata göre sıfırıncı basamakta olduğu söylenir (Champe vd., 2007).

b. Lineweaver-Burke Grafiği

Reaksiyon hızı V_0 , $[S]$ 'ye karşı çizilecek olursa hiperbolik eğrinin yüksek substrat konsantrasyonlarında hafif eğimi nedeni ile V_{max} değerine erişim zamanını saptamak her zaman mümkün değildir. Fakat, $1/V_0$, $1/[S]$ 'ye karşı çizilecek olur ise düz bir çizgi elde edilir (Şekil 2.5). Bu grafiğe Lineweaver-Burke grafiği denir. K_m ve V_{max} hesaplamalarında enzim inhibitörlerinin etki mekanizmalarının saptanmasında kullanılır.(Champe vd., 2007). Bu grafiğin denklemi;

$$1 / V_0 = K_m / V_{max}[ES] + 1 / V_{max} \text{ şeklindedir.}$$



Şekil 2.5. Lineweaver Burke grafiği.

2.1.6.5. Zaman

Reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin birleşip ters yönde bir reaksiyon oluşturmaları, zaman içerisinde enzimin aktifliğini kaybetmesi, reaksiyonu önleyici durumların oluşması ve substratın bitmesi gibi etmenler nedeniyle reaksiyon hızı zaman içerisinde düşer. Bu sebeple enzimler ile ilgili yapılan çalışmalarda genelde substrat miktarının %10 kadar harcanması süresinde tamamlanmaya çalışılır (Ası, 1999).

2.1.6.6. Reaksiyon ürünleri

Reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin birleşerek ters yönde bir reaksiyon oluşturmaları durumunda reaksiyon hızı düşer. Reaksiyon ürünlerinin bir bölümü ise substratla yapısal benzerlik gösterebilir, böylece aktivite yine azalır (www.mustafaaltinisik.org.uk).

2.1.6.7. Fiziksel etmenler

Bazı ışınlar kuvvetli çalkalama gibi fiziksel etkenlerde enzimatik aktiviteye etki eder. Örneğin UV ışını tükrük amilazının aktivitesini azaltırken kırmızı ve mavi ışıklar ise tam tersine aktiviteyi artırır (Ünaldı ve Yöntem, 2011).

2.1.6.8. İyonlar

Enzimlerin yaklaşık %25'i etkinliklerini korumak için kendilerine sıkı bir şekilde bağlı olan metal iyonlarını içermektedir. Metal iyonlarının katalitik etkileri, genelde karbonil bağında bulunan elektronlar yahut alkollerde bulunan oksijendeki elektron çiftleri ile kompleks yapıp fonksiyonel grubu polarize ederek yönlendirmektir. Metal iyonları yapısal etkiyede sahiptir.

Metal iyonları enzimatik reaksiyonlarda beş temel mekanizmada etki eder.

1. Metalo enzimlerde bulunan bu iyonlar, katalize doğrudan katılırlar. Mesela, stokromdaki demir iyonunun değer değiştirmesi ile elektron transferi gerçekleşir.
2. Metal iyonları enzimler üzerinde biçimsel bir değişikliğe yol açarak aktif olan tersiyer yahut kuarterner yapıyı sürdürmeyi sağlar. Mesela Zn^{+2} iyonu, alkol dehidrogenaz enzimidaki aktif olan kuarterner yapıyı sürdürür. Enzimlere bir metalin ilavesi aktif bir şekilde bulunan enzimi inaktif bir şekle dönüştürebilir.
3. Bir enzimin substratı, metal-substrat kompleksi(MS) olabilmekte ve enzim sadece MS kompleksine bağlanabilmektedir. Mesela çoğu fosfat transferi reaksiyonlarında enzimin gerçek substratı Mg^{+2} -ATP-4 kompleksidir.
4. Bir enzim metalle enzim - metal kompleksi(EM) oluşturduğunda substrata bağlanarak EMS kompleksi ile ürün oluşturur.
5. Bir metal, ürünle kompleks yaparak ürünün substrata dönüşümünü engelleyip reaksiyonu hızlandırabilmektedir. Mesela, trigliseridlerin lipazla parçalanması durumunda ortaya çıkan yağ asitleri Ca^{+2} iyonlarıyla çözünmeyen tuzlar şeklinde ortamdan uzaklaştırıldığında lipaz enzimi uyarılır.

Metaller tepkimeye giren türlerin doğasını değiştirince bütün tepkimenin denge sabitini de değiştirmiş olurlar (Murray vd., 2004; www.mustafaaltinisik.org.uk).

2.1.6.9. Hormonlar

Bazı hormonlarda enzimin aktifliği üzerinde etki ederler. Örneğin progesteron, androjenik ve östrojenik hormonlar glutamat DH enziminin aktifliğini azaltmaktadır (Ünaldı ve Yöntem, 2011).

2.1.6.10. İnhibitörler

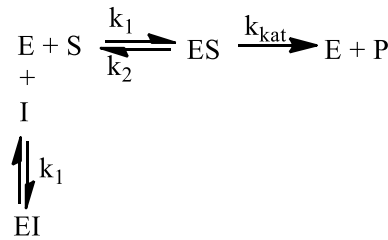
Enzimlerin hücre içi ve hücre dışı aktiviteler bazı bileşiklerin etkisiyle azalır ya da yok edilir. Bu olaya inhibisyon adı verilir. Bu bileşiklere de inhibitör denilir. Enzimlerin inhibitörleri Çoğunlukla küçük molekül ağırlığındaki bileşikler yahut iyonlardır. Enzimler neredeyse bütün hücresel süreçleri katalizlediğinden enzim inhibitörleri de buna bağlı olarak farmakolojik açıdan büyük öneme sahiptir. Enzim aktivitesinin inhibisyonu geri dönüşümlü (reversible) ve geri dönüşümsüz (irreversible) olarak iki sınıftan oluşur (Cox ve Nelson, 2005; Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

a. Geri Dönüşümlü İnhibisyon

Bu inhibisyon türünde enzimle inhibitör etkileşimi bir denge reaksiyonu içindedir. Yani kaybolan aktivite yeniden kazandırılabilir. Bu tip inhibisyonlar kinetik olarak incelenebilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Ünalı ve Yöntem, 2011).

• Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon

Geri dönüşümlü inhibitörün yaygın bir tipidir. Yarışmalı inhibitörler genellikle substrata benzeyen ve enzim ile enzim-inhibitör kompleksi (EI) oluşturmak için enzimle birleşen bileşiklerdir. Bu bileşiklerin moleküler geometrisi dikkatle incelendiğinde substratın hangi kısmının enzimle birleştiği hakkında bilgi alınabilir (Şekil 2.6) (Cox ve Nelson, 2005).



Şekil 2.6. Yarışmalı inhibisyon.

Substrat konsantrasyonu artırılarak yarışmalı inhibitörün etkisi ortadan kaldırılabilir. Böylece reaksiyon hızı inhibitör olmadan gözlenen V_{max} değerine ulaşır. Aynı zamanda yarışmalı inhibitör etkisi ile yükselen K_m değeri de $1/2 V_{max}$ 'a erişir (Champe vd., 2007).

Bu tip inhibitörlerin işleyiş mekanizmaları tıbbi tedavi yöntemlerinde de kullanılmaktadır. Aktif merkezdeki yarışmayı temel alan tıbbi tedavi, antifrizde bulunan bir

çözücü olan metanolü almış olan hastaların tedavisinde kullanılır. Karaciğer alkol dehidrogenaz enzimi birçok dokuya zarar vererek metanolü formaldehide çevirir. Gözler formaldehide oldukça duyarlı olduğundan metanol alımının sonucunda körlük oluşur. Etanol, alkol dehidrogenaza alternatif bir substrat olduğu için metanol ile etkin bir biçimde yarışır. Etanol bir substrattır ve etkisi yarışmalı inhibitöre benzer. Ayrıca etanolün derişimi uzun bir sürede enzimle astaldehide çevrilirken azalacaktır. Metanol zehirlenmesi için tedavi, birkaç saat kan dolaşımında kontrollü derişimini sürdürecektir bir hızda etanolün yavaş yavaş intravenöz infüzyonudur. Böbrekler metanolün zararsız bir şekilde atılımını yaparken tehlikeyi azaltarak formaldehit oluşumunu yavaşlatır (Cox ve Nelson, 2005).

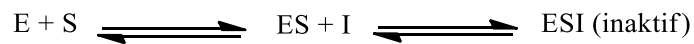
- **Yarışmasız (Non-Kompetitif) İnhibisyon**

İnhibitör ve substrat enzimin farklı bölgesine bağlanınca yarışmasız inhibisyon meydana gelir. Yarışmasız inhibisyonda inhibitör ya serbest enzime ya da enzim substrat kompleksine bağlanarak reaksiyonun ilerlemesini engeller.

Yarışmasız inhibisyon, substrat konsantrasyonu artırılarak engellenemez. Bu yüzden yarışmasız inhibitörler reaksiyonun V_{max} 'ını azaltırlar. Aynı zamanda yarışmasız inhibitör varlığında veya yokluğunda aynı K_m 'yi gösterir (Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

- **Yarışmayan (Un-Kompetitif) İnhibisyon**

Burada inhibitör, enzim-substrat kompleksi oluşmasını engellemez. Bilakis bu kompleks ile bileşik yaparak inaktif hale getirir. Reaksiyon ürün vermez ve substrat konsantrasyonunun artırılması bir işe yaramaz.



Bu tip inhibisyonda inhibitör madde serbest enzim yerine sadece ES kompleksine bağlanır. İnhibisyon sonucunda V_M ve K_m değeri azalır (Ünaldı ve Yöntem, 2011).

b. Geri Dönüşümsüz İnhibisyon

Geri dönüşümsüz inhibitörler bir enzimle birleşerek yahut enzimin aktivitesi için esansiyel olan bir işlevsel grubu bozarak veya bilhassa kararlı kovalent olmayan bir yapıyı oluşturan bileşiklerdir (Cox ve Nelson, 2005). Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna bir örnektir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

2.1.6.11. Aktivatörler

Aktivatörler enzimatik reaksiyonu hızlandırır. Bilhassa mangan, nikel, klor ve magnezyum iyonları enzimlerin aktifliğini arttıran iyonlardır. Bir kısım aktivatörler, enzimin substrat ile birleşmesini kolaylaştırırken, diğer bir kısmı ise enzimin aktif yüzeyinin etkinliğini yükselterek reaksiyon hızını arttırmaktadır. Örneğin panzehirler, enzime bağlı olan zehri kendilerine bağlarlar. Böylece enzim serbest kalır ve enzimatik reaksiyonlar normal seyrinde devam eder (Yücel, 2008).

2.1.7. Enzim aktivitesinin düzenlenmesi

Organizmada gerçekleşen sayısız metabolik işlevin düzenlenmesinde, enzimlerin metabolik hızlarının düzenlenmesi önemli rol oynar. Daha önceki konularda enzimatik reaksiyonların hızlarının hangi şartlarda değiştiğine değinilmiştir. Tüm bu faktörler enzimin aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca özelleşmiş düzenleyici etkileri olan bir takım enzimler allosterik efektörlere ya da kovalent modifikasyonlara cevap verir yahut enzimin sentez hızlarında değişimler gösterir.

2.1.7.1. Allosterik bağlanma bölgeleri

Allosteriklik, genel anlamda, bir proteinin biyolojik aktivitesinin, bazı moleküllerin o proteine bağlanarak üç boyutlu yapısında değişiklik oluşturması sonucunda değişebilmesidir. Allosterik enzimlere bağlanarak aktivitelerini etkileyen bileşiklere modülatör veya efektör adı verilir. Bu moleküller substratın bağlandığı aktif bölgeye değil de farklı bir yere yapışır. Eğer modülatörün etkisi aktiviteyi arttırıcı, pozitif yönde ise aktivatör; aktiviteyi azaltıcı, negatif yönde ise inhibitör adını alır. Allosterik enzimler birden fazla modülatör bileşik tarafından etkilenebilirler. Bunlara multivalon (çok değerlikli) allosterik enzim denir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

a. Homotropik Efektörler

Substratın efektör görevi yapması sonucu oluşan etkiye homotropik etki denir. Genellikle allosterik bir substrat pozitif efektör olarak fonksiyon gösterir (Champe vd., 2007).

b. Heterotropik Efektörler

Burada efektör substrattan farklı olabilir. Örneğin şekil 2.7'de gösterilen feed-back inhibisyonunda A'yı B'ye dönüştüren enzim son ürün E'yi bağlayan bir allosterik yere sahiptir. E'nin konsantrasyonu artarsa (örneğin, sentezlendiği kadar hızlı tüketilmediği için) metabolik yoldaki ilk enzim inhibe edilir. Feed-back inhibisyon substrat moleküllerinin bir reaksiyonlar

serisi boyunca akışı ile hücrenin metabolik yolun ürüne ihtiyacını kontrol eder (Champe vd., 2007).



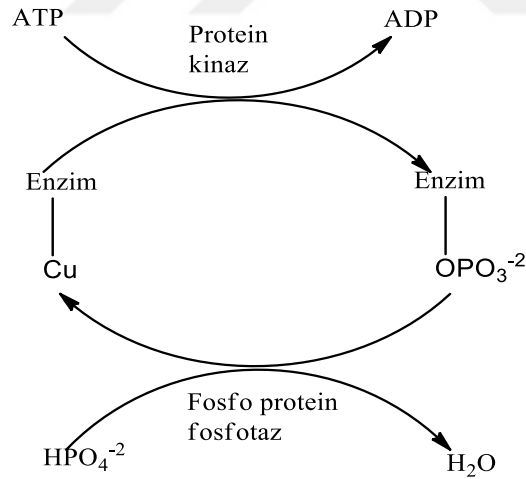
Şekil 2.7. Feed-back inhibisyonu.

2.1.7.2. Enzimlerin kovalent modifikasyonla düzenlenmesi

Birçok enzim kovalent modifikasyonla yani enzimdeki serin, treonin veya tirozin artıklarına fosfat grubu eklenip çıkarılması ile düzenlenir (Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

a. Fosforilasyon ve Defosforilasyon

Fosforilasyon reaksiyonları fosfat verici olarak adonizin trifosfatı (ATP) kullanan protein kinaz adı verilen bir enzim ailesi tarafından katalizlenir. Fosforillenen enzimlerden fosfat grupları fosfoprotein fosfotazların etkisi ile kopartılır (Şekil 2.8) (Champe vd., 2007).



Şekil 2.8. Fosforilasyon ve defosforilasyon gösterimi.

b. Enzimin Fosforilasyona Cevabı

Enzimin türüne göre, fosforillenmiş şekli enzimin fosforillenmemiş şekline göre daha fazla veya daha az aktif olabilir. Örneğin, glikojen fosforilazın (glikojeni yıkan enzim) fosforillenmesi aktivitesini artırırken, glikojen sentaza (glikojen sentezleyen enzim) fosfat eklenmesi aktivitesini azaltır (Champe vd., 2007).

2.1.7.3. Enzim sentezinin indüklenmesi ve baskılanması

Hücreler genelde enzim sentezleme hızlarını değiştirerek içlerinde bulunan enzim miktarını düzenleyebilir. Protein sentezinde görülen artış (indüksiyon) veya azalma (baskılama) enzim moleküllerinin etkisinden ziyade, aktif bölge sayısındaki değişikliğe sebep olur. Bu değişiklikler, saniyeler veya dakikalar içinde gelişen aktivitedeki allosterik değişikliklere göre daha yavaştır (Champe vd.,2007).

2.1.8. Enzimlerin aktivite ölçüm yöntemleri

Enzimlerin aktivite ölçümlerinde kaybolan substrat veya oluşan ürün miktarı kullanılır. Hücrelerde enzim proteinlerinin miktarını saptamak oldukça güçtür. Bu sebeple harcanan substrat veya meydana gelen ürün miktarı ile yorum yapılır. Bunun tespitinde ise kullanılan yöntem pratik olmalıdır (Yücel, 2008).

2.1.8.1. Spektrofotometrik yöntem

Birçok enzim substratı, ürünü veya koenzimi, görülen ışıktaki yahut ultraviyole ışıktaki bir tepe değeri göstermesiyle absorbans vermektedir. Bu durumda ya substratın kaybolması ya da ürünün oluşması gibi koenzimdeki değişiklik spektrofotometreden belirlenir. Bu yöntem kolay, basit ve hassas olduğundan diğer metotlara göre daha çok kullanılmaktadır. Bu metotta optik dansite değişimi, belli miktarda enzim ünitesini verir. Çoğu enzimin aktivite tayininde bu metot kullanılmaktadır.

2.1.8.2. Monometrik yöntem

Bir bileşeni gaz olan enzimlerin aktivitesini ölçmekte kullanılan bir metottur. Mesela; oksidazlar ile oksijen alınımı ve dekarboksilazlar ile karbon dioksit salınımı bu metot ile tayin edilir.

2.1.8.3. Thunberg yöntemi

Birçok dehidrogenaz enziminin aktivitesi bu yöntem ile ölçülür. Metilen mavisi elektron akseptörü olarak kullanılır. Bu bileşik okside durumunda renkli, redükte durumundaysa renksizdir. Enzim aktivite tayin ortamına belirlenen ölçüde metilen mavisi eklenir. Gözle renk kaybolma süresi saptanır. Deneyi havanın oksijeninden korumak için "Thunberg tüpü" denilen özel bir tüpte çalışılır.

2.1.8.4. Polimerik yöntem

Çoğu enzimin substratı optikçe aktiftir. Üründe optik aktivite değişmesi görüldüğü takdirde bu yönteme başvurulur. Substratın aktif ve ürünün optikçe aktif olduğu durumlarda da bu yöntem kullanılmaktadır. Substrat ile ürün optikçe inaktifse, bu yöntemin uygulanması doğru değildir.

2.1.8.5. Kromatografik yöntem

Diğer yöntemler ile bir ölçme yapılamadığı takdirde bu yöntem kullanılır. Enzim substrat karışımlarından belli zaman aralıklarında örnekler alınır. Burada, substrat ve ürün kromatografi kâğıdıyla veya ince tabaka kromatografisi ile ayırt edilir. Bazı durumlarda radyoaktif substrat kullanıldığından ayırım bitiminde leke, ya ince tabaka kromatografisinde olduğu gibi kazınacak, yada kağıt kromatografisinde olduğu gibi kesilerek sayım şişelerine konulacaktır. Radyoaktivitenin miktarı sayacıta sayılarak tayini yapılır. Bazı enzim aktivitelerinde ürünün meydana getirdiği lekenin büyümesiyle enzim ile ilgili bilgiye ulaşılır.

2.1.8.6. Kimyasal tayin yöntemi

Çoğu enzim tepkime başladıktan sonra belli aralıklarda karışımdan numune alınarak ürün ve substratın kimyasal yöntemle miktarı belirlenir. FISKE ve SUBBAROW kolorimetrik yöntemi ile inorganik fosfat tayinini gerçekleştirmiştir. Fosforilaz, fosfotaz, nükleotidaz enzimlerinin aktiviteleride aynı yöntemle elde edilir. Pirofosfat (Ppi) bağı, 1N HCl ve 100 °C'de 10 dakika kaynatılarak kırılmakta ve inorganik fosfat oluşmaktadır. İnorganik fosfatın miktarıysa, kolorimetrik yöntemle belirlenmektedir. Bu yöntemle ATP ve ADP'nin karıştığı kimi kinaz ve sentetaz reaksiyonlarındaki enzim aktivitesi bulunur.

2.1.8.7. Elektrot yöntemi

Yöntem cam elektrotlarda reaksiyon ortamında oluşan ürünlerin ölçülmesi nedayanmaktadır. Yöntemde amperometrik enzim elektrotları kullanılmaktadır. Metotta enzim stokiyometrik ilişki içerisinde hedef molekülü veya substratı ile karşılaştığında bir elektroaktif maddeyi üretir veya tüketir. Amperometrik çevirici ise buelektroaktif maddenin elektrot yüzeylerinde reaksiyon vermesine sebep olur. Bu sırada elektrotlar arasındaki akım ölçülür (Yücel, 2008).

2.2. Lipazlar

2.2.1. Lipazların genel özellikleri

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolaz; EC.3.1.1.3) bitkisel ve hayvansal yağları normal şartlarda serbest yağ asitlerine, diaçilgliserollere, monoacilgliserollere ve gliserole hidrolizleyen enzimlerdir. Ayrıca bu hidrolitik reaksiyon tersinirdir ve azalan su miktarı ile organik çözücüler varlığında lipazlar çeşitli esterifikasyon, interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları için etkili katalizörlerdir. Lipazlar serin hidrolazlar sınıfı içinde yer aldığından hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Yücel, 2008; Uluğ, 2011; Suseela L. vd., 2014).

Lipazlar, yağ sindiriminde yer alırlar. Yağların vücuttaki sindirimi, lipazlar ile safra salgısı yardımıyla yapılır. Safra salgısı yağları emülsiyon haline getirirken enzimin çalışmasını sağlar. Yağların tam sindirilmemesi halinde ishal ve esansiyel yağ asidi eksikliği görülebilir. Yağ asitleri hücredeki zar yapısında görev alır. Lipaz eksikliğinde ortaya çıkabilen hastalıklar safra taşları, eklem ağrıları ve karaciğerde lipaz eksikliğidir (Türk, 2008).

Lipazların katalitik aktiviteleri substrat emülsiyonunun yağ-su geçiş fazında gerçekleşir ve enzimatik reaksiyonun hızı, oluşan yüzey alanına bağlıdır. Lipazların spesifitesi yağ asitlerinin zincir uzunluğuna, doymuşluk derecesine, yağ asidinin pozisyonuna ve substratın fiziksel durumuna uygundur. 4-10 karbonlu yağ asitleri daha uzunlarına göre daha hızlı hidroliz olur ve yağın yapısından ayrılarak serbest hale geçerler (Öztürk, 2006; Uluğ, 2011; Kıran vd., 2006).

Lipazlar mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlardan elde edilirler (Yapaşan, 2008). Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler süt, gıda, deterjan, tekstil, ilaç, kozmetik ve biyodizel gibi çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Lipazlar ev ve endüstriyel çamaşırların yıkanması ayrıca bulaşıklar için deterjana katılarak yağların giderilmesi, tıkalı olan boruların açılması için kullanılmaktadır. Lipazların temizleme gücü, deterjanlarla beraber daha iyi bir etkiye sahip olmaktadır. Ayrıca proteaz, amilaz, selülozün deterjanlara eklenmesi ile temizleme güçleri arttırılabilmektedir (Akköse, 2013).

2.2.2. Lipazların sınıflandırılması

Lipazlar gliseridleri hidrolizleme kabiliyetlerine göre üç temel gruba ayrılabilirler (Kartal, 2004; Yılmaz, 2010).

2.2.2.1. 1,3-Spesifik lipazlar

Nötral yağları eşdeğer konumda olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Tepkime bitiminde triaçilgliserollerden yağ asitleri 1,2 (2,3)-diaçilgliserollerle ve 2-monoaçilgliseroller meydana gelir. 1,2 (2,3)-diaçilgliseroller ve 2-monoaçilgliseroller, kimyasal açıdan kararsızdır ve sırasıyla 1,3-diaçilgliserollere ve 2- monoaçilgliserollere izomerleşir. Bunun sonucunda meydana gelen izomerler tekrar substrat olarak kullanılabilir ve sonuç olarak 1,3-bağlarına spesifik lipazlar da spesifik olmayanlar gibi triaçilgliserolleri gliserol ve serbest yağ asitlerine kadar parçalayabilirler. Pankreas, *Aspergillus niger*, *Preudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-spesifikler (Sökmen, 2005; Yılmaz, 2010).

2.2.2.2. Spesifik olmayan lipazlar

Bu sınıftaki lipazlar, triaçilgliserollerin bütün pozisyonlardaki açıl gruplarını seçimsiz olarak ayırabilirler. Reaksiyon sonucunda yağ asitleri ve gliserin oluşurken, ana ürün olarak mono- ve di-açilgliseridler oluşur. *Penicillium cyclopium* A ve B, *Geotrichum candidum*, *Candida cylindracea* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girerler (Demirkan, 2008).

2.2.2.3. Yağ asidi spesifik lipazlar

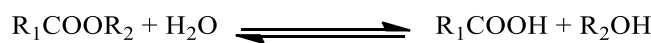
Bu grup lipaz enzimleri, açilgliserollerdeki bazı yağ asitleri için spesifik olduğundan sadece bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar (Sökmen, 2005).

2.2.3. Lipazların enzimatik etkisi

Lipazlar farklı türdeki reaksiyonlarda biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Hidrolitik enzimlerin tersine, farklı noktalardan türeyen lipaz enzimleri polar olmayan organik çözücülerde gayet kararlıdır (Demirkan, 2008; Yılmaz, 2010). Lipazların katalizlediği reaksiyonlar iki temel başlıkta toplanabilir.

2.2.3.1. Hidroliz

Lipazın su kullanılarak triaçilgliserolün ester bağlarını bölmesine hidroliz denir (Uluğ, 2011).

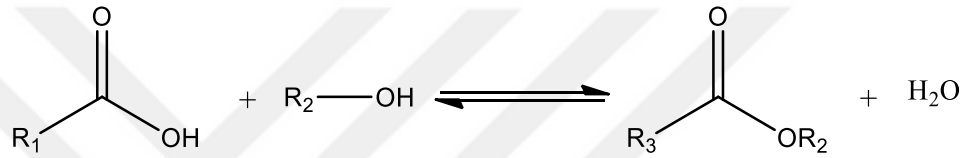


2.2.3.2. Sentez

Sentez reaksiyonları esterifikasyon ve transesterifikasyon olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

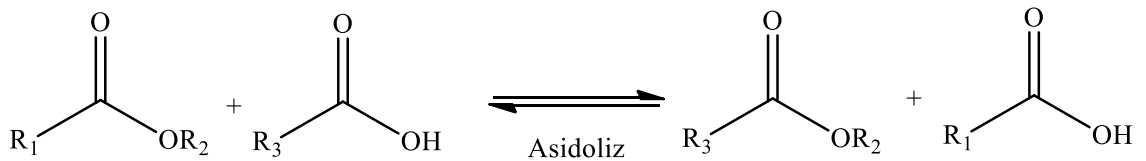
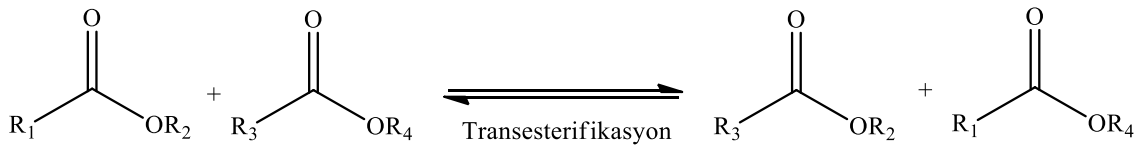
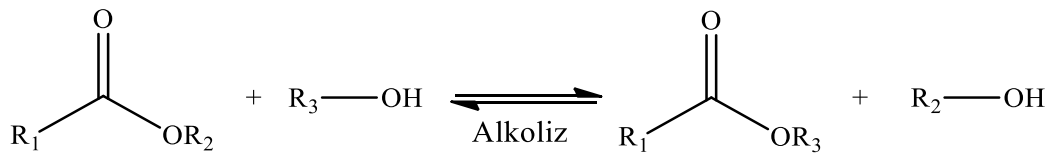
a. Esterifikasyon

Hidroliz olayının tersine esterifikasyon denir. Su aktivitesinin düşük olduğu durumlarda gerçekleşir (Uluğ, 2011). Ester sentezi asit yahut baz kataliziyle kimyasal olarak yapıldığı halde, enzim teknolojisinin kullanımı, ılımlı koşulların avantajları, azalmış bölge reaksiyonları ve spesifitesi gibi avantajları nedeniyle önerilmektedir (Sökmen, 2005).



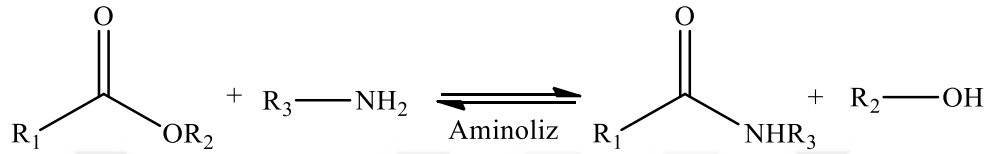
b. Transesterifikasyon

Bir ester ve bir alkol (alkoliz), bir ester ve başka bir ester (interesterifikasyon) veya bir ester ve bir asit (asidoliz) arasındaki grupların yer değiştirmesi işlemine transesterifikasyon denir (Yılmaz, 2010). Transesterifikasyonla bitkisel ve hayvansal yağların modifikasyonunda lipazların kullanımı, ılımlı şartlar, indirgen bölge reaksiyonları ve spesitive avantajlarından dolayı tercih edilir. Çok ucuz yemek stoklarından (feedstocks) kakao yağı analoglarının üretimi buna örnektir (Sökmen, 2005).



c. Doğal Olmayan Substratların Katalizi

Villeneuve ve arkadaşlarına (2000) göre, lipaz enzimleri karboksilik asit esterlerinin hidrolizi ve sentezinin katalizini sınırlamaz. Alkol ve sudan başka komponentleri de nükleofil olarak tanımlar. Lipazlar böylece seçicilik ile organik çözücülerde aksimoliz, transesterifikasyon, aminoliz gibi çeşitli tepkimeleri katalizleme kabiliyetindedirler (Yılmaz, 2010).



2.2.4. Lipazların kaynakları

Lipazlar daha öncede belirtildiği üzere hayvan, bitki ve mikroorganizma kökenlidir.

2.2.4.1. Mikrobiyel lipazlar

Mikrobiyel lipazlar da daha çok bakteri ve mantar kaynaklıdır.

a. Bakteriyel Lipazlar

Bakteriyel lipazlar, bitkisel ve hayvansal kaynaklı lipazlara göre daha fazla araştırma konusu olmuştur. Bu durum, mikroorganizmaların kolay yetiştirilebilmeleri, üretim ve genetiklerine kolaylıkla müdahale edilebilmesinden kaynaklanmaktadır.

Bu tip lipazların bazıları glikoprotein ve bazıları da hücre lipoprotein yapısındadır. Bu organizmaların gelişmesi için gereken besin kaynakları karbon (yağ, şeker ve çeşitli karbon kaynakları), azot, fosfor kaynakları ve mineral tuzları içerir (Patil vd., 2011; Uluğ, 2011).

b. Fungal Lipazlar

Fungal lipazlar da çalışmalar 1950'lerin başında başlamış, Lawrence ve daha sonra Brockerhoff ve Jonson tarafından bu enzimler çeşitli yönlerden tartışılarak kapsamlı olarak incelenmiştir (Hammamchi, 2014).

Fungal lipazlardüşük maliyetli ekstraksiyonu, termal ve pH kararlılığı, substrat spesifikliğı ve organik çözücülerdeki aktivitelerinden dolayı bakteriyel lipazlardan daha yararlıdır (Patil, 2011). Genellikle çalışmalarda toprak, limon, ekmek gibi yerlerden elde edilen mantarlar kullanılmıştır (Demirkan, 2008).

2.2.4.2. Bitkisel lipazlar

Çok miktarda triaçilgliserol içeren ya da gelişen fidan dokularından elde edilir. Lipazlar bitkilerde enerji depolayan dokularda bulunur. Oda sıcaklığında yüksek aktiviteye sahip olmaları, kolay bulunabilmeleri ve pahalı olmamaları nedeniyle endüstri alanlarında bitkisel kaynaklı lipazlar da kullanılır. Bitkisel kaynaklı lipazlar, hayvan ve mikrobiyel kaynaklı lipazlara göre daha düşük bir hızla triaçilgliserollerini hidroliz ederler. Lipazların bitkilerdeki regülasyonu, lokalizasyonu ve tam olarak fizyolojik rolleri halen açık değildir (Sökmen, 2005; Patil, 2011).

Bitkisel kaynaklı lipazlar lipidlerin biyotransformasyonu için biyokatalizör olarak son zamanlarda oldukça önem kazanmıştır. Bitkisel lipazlar substrat seçiciliği gösterirler. Hint yağı bitkisi lipazının trisinoleine, palmiye yağı lipazının trikoprini veya trilavrine karşı ilgisi fazladır (Sökmen, 2005).

2.2.4.3. Hayvansal lipazlar

Hayvansal lipazlar zengin bir kaynağa sahip olmalarına rağmen mikrobiyel lipazların kullanılabilirliği nedeniyle daha az çalışılmıştır. Bu duruma rağmen birçok böcek, balık ve memeliden lipaz izole edilmiştir. Hayvansal lipazlar, biyolojik sistemde yağların sindiriminde önemli rol oynamaktadır (Walton vd., 1984; Patil vd., 2011).

2.2.5. Lipazların endüstriyel kullanım alanları

Enzim teknolojisinin gittikçe gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının farklılığı ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeni ile biyoteknolojinin endüstriyel enzimleri ilgilendiren alanında yapılan çalışmalar büyük önem kazanmıştır. Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin birçoğu mikrobiyel kaynaklı olduğu halde bitkisel kaynaklı enzimlerde kullanılmaktadır.

2.2.5.1. Gıda endüstrisinde lipazlar

Gıda endüstrisinde lipazlar çok geniş kullanım alanlarına sahiptir. Mandıra ürünlerinde güzel koku geliştirilmesinde (Yılmaz, 2010), tereyağına aroma kazandırma işleminde, çikolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanlarına sahiptir (Kıran vd., 2006). Lipazlar, peynirin tadını süt yağının serbest yağ asitlerine hidroliz ederek artırır. Farklı kaynaklardan elde edilen lipazların her biri de peynire farklı karakteristik bir tat verir (Kumar vd., 2005; Türk, 2008).

2.2.5.2. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde lipazlar

Zift (ağaç sakızı) ve odunun hidrofobik bileşenleri (başlıca trigliseridler ve mumlar) kağıt hamuru ve kağıt üretiminde farklı problemlere yol açar. Bu kağıt hamurundaki zifti ortamdan uzaklaştırmak için lipaz kullanılmaktadır. Japonya'daki Nippon Kağıt Endüstrisi, trigliseridlerin %90'dan fazlasını hidroliz etmek için *Candida rugosa* mantar lipazını kullanarak üretimini arttırmıştır (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001; Yılmaz, 2010).

2.2.5.3. Organik sentezlerde lipazlar

Organik kimyada lipazlar katalizör olarak kullanılmaktadır. Substrat farklılıklarına göre etki gösterdikleri için sentetik kimya da büyük avantaja sahiptirler (Ghosh vd., 1996; Yılmaz, 2010). Öztürk'e (2006) göre, lipazların katalizlediği tepkimelerde organik çözücü kullanılması, çözücü açısından suya göre dört temel avantajı vardır. Bu avantajlardan birincisi, alkol veya asitlerin rasemik karışımları enantiyomerlerinde çözünmeden önce esterifiye olmamaya ihtiyaç duymamalarıdır. İkincisi bu enzimlerin, organik çözücülerde sudan daha kararlı olmaları, üçüncüsüyse organik çözücülerde çözünmediklerinden tekrar kullanılabilimleri için immobilizasyona gerek duymamaları ve aktif durumlarındaki filtrasyonlarıyla toplanabilmeleridir. Son olarak substrat ve ürünlerin sulu solüsyonda kararsız olmaları sebebiyle organik çözücüde reaksiyon ürünün meydana gelmesi ve izolasyonu açısından gerekli olmasıdır (Yılmaz, 2010).

2.2.5.4. Zirai ilaç üretiminde lipazlar

Lipazlar bitkilerdeki böcek ve haşarelere karşı herbisid olarak kullanılan bazı enantiomerik ilaçların üretiminde kullanılmaktadır (Sökmen, 2005).

2.2.5.5. Deterjan endüstrisinde lipazlar

Giyisilerimizi kirlüten etmenlerin en önemlileri proteinler, yağlar ve nişastadır. Bu lekeleri yüksek sıcaklıkta kimyasal deterjanlar ile gidermek mümkündür. Ancak lipazlar sayesinde daha az mekanik enerjiyle istenilen temizlik sağlanır. Ayrıca çimen, kan, süt ve ter lekelerini çıkarmada biyolojik olmayan deterjanlar ile kıyaslandığında çok daha etkili olduğu bilinmektedir (Kıran vd., 2006). Deterjanlarda kullanılan lipazlar üç açıdan avantajlıdır. Birincisi, düşük substrat sipsifitesine sahiptirler ve değişik bileşenlerdeki yağları hidrolizleyebilirler. İkincisi, yüksek pH (10-11) ve yüksek sıcaklıklara (30-60 °C) dirençlidirler. Üçüncüsü ise zarar verici surfaktantlara ve enzimlere dayanabilirler (Cardenas vd., 2001). Bu üç özellik deterjan endüstrisindeki önemi nedeniyle lipazların bu endüstrideki pazar payını arttırmaktadır.

2.2.5.6. Kozmetikte ve kokulu bileşiklerin üretiminde lipazlar

Lipazlar koku ve tat veren maddeleri (esterleri) sentezlediklerinden kozmetik ve parfüm endüstrisinde kullanılır (Türk, 2008).

2.2.5.7. İlaç sektöründe lipazlar

Kimyasal yöntemle üretilmeyen yeni ilaçların sentezlenmesinde ve kiral bileşiklerin eldesinde lipazlardan faydalanılır. Bunun dışında angiotensin-I dönüştürücü enzimler, antiinflamatuar ilaçlar ve β -blokerlerin üretiminde de lipazlardan faydalanılır (Sökmen, 2005).

2.2.5.8. Deri endüstrisinde lipazlar

Lipazlar deri yüzeyinde ve içinde bulunan yağlardan arındırarak deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemlere uygun hale getirir. Derilerin işlenmesi maksadıyla bazı proteinler parçalanarak deriden uzaklaştırılır (Kıran vd., 2006).

2.2.5.9. Biyosensör olarak lipazlar

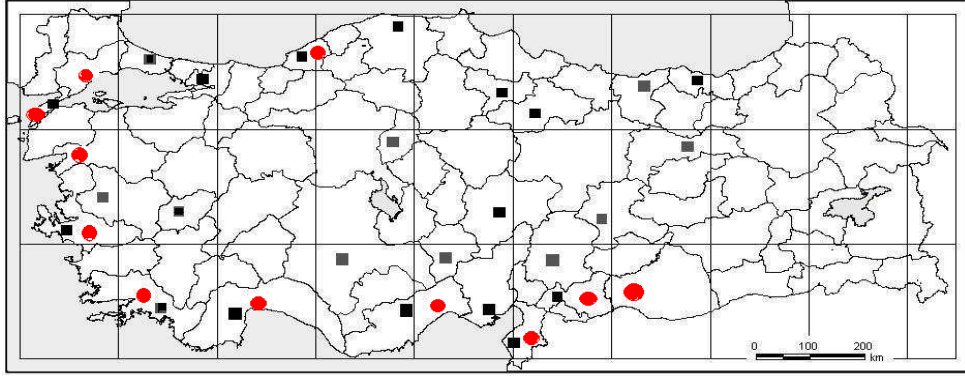
Enzimatik biyosensörler yahut biyolojik mikro aygıtlar yiyecekte, yağ sanayinde, kimyasal tanılarda trigliseridleri kantitatif olarak belirlemek için kullanılabilir (Rakhimov, 1986; Haalck vd., 1991).

Lipazlar glikoz oksidazlalar kombinasyonunda pH/oksijen elektrotlarında immobilize edilebilir ve lipid biyosensörü olarak görev yaparlar (Yılmaz, 2010).

2.3. Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.)

2.3.1. Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) türünün özellikleri

Pistacia terebinthus bitkisi Anacardiaceae ailesinin bir üyesi olup Türkiye'nin batı ve güneyinde geniş bir alanda yetişir ve menengiç adıyla bilinir (Özcan vd., 2009). Menengiç bitkisi yörelere göre çedene, çitlenbik, çıtlık, çitemik ve bıttım gibi çeşitli isimlerle anılmaktadır. Örneğin; Elezığ yöresinde çedene; Adana'nın Kozan ilçesinde çıtmık; Antalya'nın Akseki ilçesinin Kuyucak Beldesinde çöfre veya sakızlak (Kaya, 2012); yine Antalya'nın Korkuteli ilçesinde çitlenbik veya çitemik olarak bilinir. Ancak son dönemde bilim insanları menengiç kahvesinin sağlık açısından önemine sıklıkla değindiklerinden "menengiç" ismi de oldukça yaygınlaşmıştır. Şekil 2.9.'da menengiç bitkisinin yetiştiği bölgeler kırmızı renkle belirtilmiştir.



Şekil 2.9. *Pistacia terebinthus* bitkisi Türkiye dağılımı (Yanık, 2013).

Menengiç bitkisinin kırmızımsı mor renkli çiçekleri Mart ve Nisan aylarında açar. Küçük küremsi meyveleri olgunlaşınca yeşilden mavi renge dönüşür. Tohumları Ağustos-Eylül aylarında olgunlaşır (Şekil 2.10). Soğuğa ve kuraklığa karşı dayanıklı olan bu ağaç türü drenajı iyi, kuru, sıcak, kireçli ve kayalık alanlarda daha iyi yetişir. En iyi gelişmeyi alkali topraklarda gösterir. Fazla boylanmaz, büyüme hızı düşüktür ve ışık isteği oldukça yüksektir (Kaya, 2012; Yıldız, 2013).



Şekil 2.10. Menengiç ağacı ve meyvesi.

Menengiç ülkemizin doğal bitki örtüsünün bir parçasıdır. Tarımı yapılmaksızın doğal olarak kendiliğinden yetişen bir bitkidir. Aşıl原因 olarak antep fıstığına dönüştürülebilir. Bu amaçla kullanılabilecek yaklaşık 66 milyon kadar Pistacia ağacı vardır (Sidar, 2011; Kaya, 2012).

2.3.2. Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) bitkisinin kullanımı ve biyolojik aktiviteleri

Dünyanın farklı yerlerindeki menengiç ağaçlarının çeşitli bölümlerinden birçok açıdan faydalanılmaktadır. Türkiye'deyse arkeolojik bulgular sonucu menengicin eski çağlardan itibaren gıda olarak tüketildiği bilinmektedir. Bitkinin genç sürgün ve meyvelerinin gıda olarak kullanıldığı bilinmektedir (Sidar, 2011; Kaya, 2012). Olgun meyvelerinin sıkılması sonucu elde edilen yağ, yemeklik yağ olarak kullanılmaktadır. Meyveli yapraklarından ise meyve turşusu yapılmaktadır (Yıldız, 2013). Meyveler aynı zamanda iştah açıcı özelliği açısından özel köy ekmeklerinde, kahve ve çay olarak tüketilmektedir (Çalar, 2013).

Menengiç ağacının dallarından sarkan menengiç sakızı dahilen idrar ve solunum yolları antiseptiği olarak kullanılır. Bal kıvamındaki esmer sarı yahut yeşilimsi renkli, özel, hoş kokulu olan bu sakız memleketimizde elde edilmemektedir (Yıldız, 2013).

Menengiç tohumlarının kavrulması ile elde edilen kahvesi halk tıbbında balgam söktürücü, solunum ve idrar yolları antiseptiği, göğüs yumuşatıcı, vücut içindeki yaraları tedavi edici, ayak terlemelerini önleyici, kolesterol düşürücü ya da önleyici, regl söktürücü ve böbrek kumlarının dökülmesine yardımcı olması gibi pek çok özellikleri açısından kullanılmaktadır (Kaya, 2012).

Birçok biyolojik aktiviteye sahip olan menengiç, yapısında bulunan flavanoidler sebebiyle antimikrobiyel, anti-inflamatuar, antiparaziter ve sitotoksik etkilere sahiptir. Ayrıca aterioskloeroziste ve lipid profilinin düzeltilmesinde azalmalara ve antioksidan aktivitede önemli bir role sahip olduğu bilinmiştir (Altındağ, 2013).

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Asetik asit, metanol, aseton, amonyum sülfat, gum arabic, sodyumdeoksikolat, sodyumhidrojenkarbonat (NaHCO_3), sodyumdihidrojenfosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyumhidrojenfosfat (Na_2HPO_4), sodyumdodesilsülfat (SDS), gliserol, Tris (tris(hidroksimetil)aminometan), N,N-metilenbisakrilamid, N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED), bromfenolblue, glisin, 2--merkaptotanol, diyaliz torbası (D-95272), Sephadex G-100, hidroksiapatit, Coomassie Brilliant Blue R250, Coomassie Brilliant Blue G250, Sigma-Aldrich, Merck ve Fluka firmalarından temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan menengiç ve zeytinyağı ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

✓ Soğutmalı Santrifüj	: Sigma K30
✓ Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	: DAIHAN MSH-20A
✓ Etüv	: BINDER
✓ Analitik Terazî	: SHIMADZU ATX220
✓ Spektrofotometre	: SHIMADZU UV1700 PharmaSpec
✓ Elektroforez Tankı	: HEALTEC MiniGES Elite300
✓ Elektroforez Güç Kaynağı	: HEALTEC Elite300
✓ Mikropipetler	: BIOHIT Proline
✓ Saf Su Cihazı	: Merck Millipore
✓ Öğütücü	: Ev tipi
✓ Buzdolabı	: Ev tipi
✓ Peristaltik Pompa	: Ismatec RegloDigital
✓ pH Metre	: SCHOTT Lab850
✓ Vortex	: Heidolp ReaxTop

3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1) 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunu hazırlamak üzere; 5,4603 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sodyumdihidrojenfosfat) tartılıp pH'ı 1,0 M NaOH ile 7,0 ye ayarlandı ve hacmi 300 mL tamamlandı.

2) %10'luk gum arabic çözeltisini hazırlamak üzere; 18 g gum arabic tartılarak 180 ml suda çözüldü. Üzerine 21 mL zeytinyağı ile 15 g buz ilave edildi.

3) Sodyumdeoksikolat çözeltisini hazırlamak üzere; 0,8 g sodyumdeoksikolat tartılarak 50 mL saf suda çözüldü.

4) Tris çözeltisini hazırlamak üzere; 0,6058 g tris tartıldı ve pH'ı 7,0 olarak 1 M HCl ile ayarlanarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

5) 0,05 M NaH_2PO_4 tamponunu hazırlamak üzere; 15,601 g NaH_2PO_4 tartıldı. 1,0 M NaOH ile pH 7,0 ayarlanarak hacmi 2000 mL'ye ayarlandı.

6) 1,0 M Tris-HCl pH 8,8 çözeltisini hazırlamak üzere; 12,114 g tartılarak yaklaşık 60 mL de çözüldükten sonra pH 8,8'e 1,0 M HCl ile ayarlandı. Son hacimi 100 mL'ye tamamlanarak 4°C'de saklandı.

7) 1,0 M Tris-HCl pH 6,8 çözeltisini hazırlamak üzere; 12,114 g tartılarak yaklaşık 60 mL de çözüldükten sonra pH 6,8'e 1,0 M HCl ile ayarlandı. Son hacimi 100 mL'ye tamamlanarak 4°C'de saklandı.

8) 6X Numune yükleme çözeltisini hazırlamak üzere; %60 griserol, 300 mM Tris-HCl pH 6,8, 12 mM EDTA, %12 SDS, 864 mM β -merkaptoetenol ve %0,05 bromofenol blue kullanıldı. 10 mL hazırlamak amacıyla; 6 mL griserol, 3mL 1 M Tris-HCl pH 6,8, 0,035 g EDTA 1,2 g SDS, 60 mL β -merkaptoetenol, 0,05 g bromofenol blue karıştırılarak 6X numesi hazırlandı.

9) %40 Akrilamid hazırlamak üzere; 19,48 g akrilamid, 0,52 g bis-akrilamid 50 mL saf suda çözüldü.

10) %10 Amonyum persülfat hazırlamak üzere; 0,1 g amonyum persülfat 1 mL dH_2O 'da çözüldü.

11) %10 SDS için; 4 g SDS 40 mL dH_2O 'da çözüldü.

12) Boyama çözeltisi için; %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250, %50 metanol ile %10 asetik asit karıştırıldı.

13) Yıkama çözeltisi için; %10 metanol, %7 asetik asit olacak şekilde hazırlandı.

14) 0.01 M NaOH çözeltisi için; 0,1 g NaOH tartılarak hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

3.2. Metotlar

3.2.1. Menengiç bitkisinin temini ve yağsızlaştırma işlemi

Antalya yöresinde yetiştirilen menengiç ağaçlarından toplanan tohumun 50 gramı öğütücü yardımıyla homojenize haline getirilmiştir. Daha sonra yağsızlaştırma adı verilen tohumdaki proteinlerden yağın uzaklaştırılması işleminde çözücü olarak soğuk aseton

kullanılmıştır. Yağsızlaştırma işlemi soğuk bir ortamda 4°C’de 30 dakika boyunca buz banyosunda karıştırıcı ile karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu işlem sonucunda elde edilen homojenatın çeker ocakta kurutulmasıyla aseton uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bir beher içerisine konulmuş ve üzerine 1:6 (v/w) oranında 0,1M fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edilerek 12 saat boyunca buz dolabında karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu şekilde enzimlerin çözeltiye geçmesi hedeflenmiştir. Daha sonra süzgeç kâğıdıyla süzülerek süpernatant aktivite tayininde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

3.2.2. Aktivite tayin yöntemi

Lipazın aktivitesini tayin etmek için %10’luk gum arabic’den 10 mL, sodyumdesikolat’dan 2 mL ve 0,05M tris tamponun’dan 4 mL alınarak karıştırılmış ve sıcaklık 37°C sabitlenerek pH 7’ye ayarlanmıştır. Üzerine 1 mL enzim ilave edilerek 5 dakika boyunca karıştırılıp pH düşüşü gözlenmiştir. Süre bitiminde 0,01 M NaOH ile pH 7,0’ye ayarlanarak harcanan NaOH miktarı kaydedilmiştir.

3.2.3. Hidroksiapatit ve Sephadex G-100 jel hazırlanması ile jel filtrasyon kromatografisi

3 g hidroksiapatit, 0,1M ve pH’ı 7,0 olan fosfat tamponu içerisinde karıştırılarak kolona aktarılmıştır. Homojenat kolona yüklenerek bir behere toplanmıştır.

2 g Sephadex G-100 100 mL, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde yarım saat karıştırılarak dekante edilmiştir. Dekante işleminden sonra 24 saat bekletilerek yavaş yavaş kolona yüklenmiştir. Kolon dengeleninceye kadar kolondan tampon geçirilmiştir. Hidroksiapatitten geçirilen homojenat kolona yüklenerek üçer mL’lik fraksiyonlar halinde tüplere toplanmıştır.

3.2.4. Saflaştırılan proteinlerin SDS-PAGE ile karakterizasyonu

%12’lik ayrıştırma jeli üzerine %3,75’lik yığma jeli ilave edilerek numuneler kuyuya yüklenmesinin ardından 100V’da ortalama 150 dk’da yürütülmüştür. Boyama işlemi için; %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250 çözeltisi hazırlanmıştır. %10 metanol ve %7’lik asetik asit kullanılarak elde edilen renksizlendirme çözeltisi yıkama işleminde kullanılmıştır. Jel tamamen temizleninceye kadar yıkama işlemi devam etmiştir.

3.2.5. Optimum pH çalışmaları

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerlerini tespit etmek için 0,1M’lık sodyum asetat pH’sı 4 4,4 4,8 5,2 5,6 0,1 M’lık sodyumdihidrojen fosfat pH’sı 6,8 7,2 7,6 8,0

8,8 9,2 0,1M'lık sodyum bikarbonat pH'sı 9,6 10,0 10,4 10,8 11,2 0,1M'lık disodyum hidrojen fosfat pH'sı 11,6 12,0 12,4 12,8 13,2 arasında tamponlar hazırlanmıştır. Bu tamponlardaki aktivite değerlerine göre optimum pH tespit edilmiştir.

3.2.6. Optimum sıcaklık çalışmaları

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı tespit etmek için 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C'lerde 13 farklı çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda en yüksek hidrolitik aktiviteyi veren sıcaklık bulunmuştur.

3.2.7. Depo kararlılığının tayini

Jel kromatografisi sonunda elde edilen enzimlerden yüksek hidrolitik spesifik aktivite gösteren enzim tüpleri bir araya toplanmıştır. Buzdolabında 4°C'de çalışma boyunca saklanarak iki gün arayla aktivite tayini yapılmıştır. Bu şekilde enzim aktivitesinin kararlılığı tespit edilmiştir.

3.2.8. Stabil-pH çalışmaları

Jel kromatografisi sonunda hidrolitik spesifik aktivite değerleri birbirine yakın olan tüpler bir araya toplanarak bir havuz oluşturulmuştur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği stabil pH'ı belirlemek amacı ile pH değerleri 4,8; 5,2; ve 5,6 olan 0,1M'lık sodyumasetat ile pH değerleri 6,4 ve 6,8 olan sodyumdihidrojenfosfat tamponları hazırlanmıştır. Bu tamponlarla havuzdan alınan enzimlerin aktivite ölçümleri beş gün süreyle daha önceden belirlenmiş olan optimum sıcaklıkta bakılmıştır. Menengiç tohumu lipazının stabil olduğu pH değeri tespit edilmiştir.

3.2.9. Stabil-sıcaklık çalışmaları

Jel kromatografisi işleminden sonra hidrolitik spesifik aktivite değeri birbirine yakın olan tüpler bir araya toplanmıştır. Lipaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği stabil sıcaklığı tespit etmek için 5, 20, 30, 40, 50°C, 60°C sıcaklıklarında 7 gün boyunca optimum pH da aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların sonunda en yüksek aktiviteyi veren stabil sıcaklık bulunmuştur.

3.2.10. K_m ve V_{max} değerleri

Jel kromatografisi işlemi sonunda birbirine yakın yüksek hidrolitik spesifik aktivite gösteren enzimler bir havuzda toplandı. K_m ve V_{max} kinetik sabitlerini bulunmak amacıyla

substrat olarak kullanılan trioleinin farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100, 200, 500 μL) ve sabit hacimlerde havuzdaki enzimler kullanılması ile aktivite tayini yapılmıştır.

Hız değerleriyle substrat konsantrasyonu arasında çizilen Michaelis-Menten grafiği yardımı ile K_m ve $V_{\max}$ değerleri tespit edilmiştir.



4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Sonuç

4.1.1. Menengiç meyvesi lipazının hidrolitik aktivitesinin tayini

Lipaz enziminin hidrolizlediği yağ asitlerinin NaOH ile titrasyonuna dayanan titrimetrik bir yöntem kullanılarak enzimin hidrolitik aktivitesi belirlendi. (Nasa, 1988).

Titrimetrik yöntem ile lipaz aktiviteleri belirlenen homojenat ve jel filtrasyon sonrasındaki elüatın enzimatik aktivite değerleri çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Menengiç meyvesi lipazının saflaştırma basamaklarında aktivite değişimi.

Saflaştırma Basamağı	Aktivite (EU/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg.protein)
Homojenat	8	1,716
Jel fraksiyon	10	2,146

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi jel fraksiyonu, ham ekstrakt çözeltisine göre hidrolitik spesifik aktiviteyi yaklaşık 1,25 kat arttırmıştır.

4.1.2. Menengiç meyvesi lipazının saflaştırma basamakları

Titrimetrik yöntemle lipaz aktiviteleri belirlenen homojenat ile jel filtrasyondan elde edilen elüatın enzimatik aktivite değerleri çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Menengiç meyvesi lipazının saflaştırma basamakları.

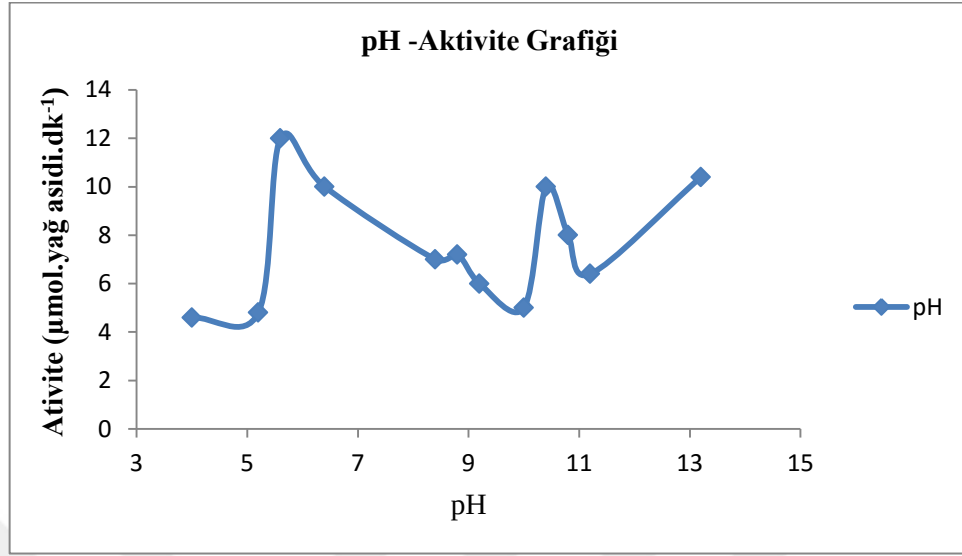
İŞLEM	Aktivite (EU/ml)	Toplam Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)
Homojenat	8	95	4,66	442,7	760	1,716
Sephadex G-100	10	3	4,66	13,98	30	2,146

4.1.3. Menengiç meyvesi lipazının optimum pH hesaplanması

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerlerini belirlemek amacı ile pH'sı 4-4,4-4,8-5,2 ve 5,6'da 0,1M sodyum asetat tamponları, pH 6,4-6,8-7,2-7,6 ve 8,0'de 0,1M sodyumdihidrojen fosfat tamponları, 8,4-8,8 ve 9,2'de tris tamponları, pH'sı 9,6-10,0-10,4-10,8 ve 11,2'de 0,1 M sodyumdihidrojenkarbonat tamponları pH 11,6-12,0-12,4-12,8 ve 13,2 0,1 M sodyumhidrojenfosfat tamponları hazırlandı ve jel filtrasyon kromatografisinde hidrolitik spesifik aktivitesi yüksek olan enzimlerin bir araya toplanarak oluşturulan enzimleri, farklı pH aralıklarında hazırlanan tamponlarla aktivite değerlerine bakılarak aktivitesi belirlendi. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 5,6 sodyum asetat olarak belirlendi (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1).

Çizelge 4.3. Menengiç meyvesi lipazının optimum pH değerleri.

PH	Aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi.dk}^{-1}$)	PH	Aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi.dk}^{-1}$)
4	4,6	9,2	6
4,4	2,2	9,6	4,4
4,8	3,2	10	5
5,2	4,8	10,4	10
5,6	12	10,8	8
6,4	10	11,2	6,4
6,8	2,4	11,6	2
7,2	2,8	12	2,6
7,6	2,4	12,4	2,8
8	3,2	12,8	4,2
8,4	7	13,2	10,4
8,8	7,2		



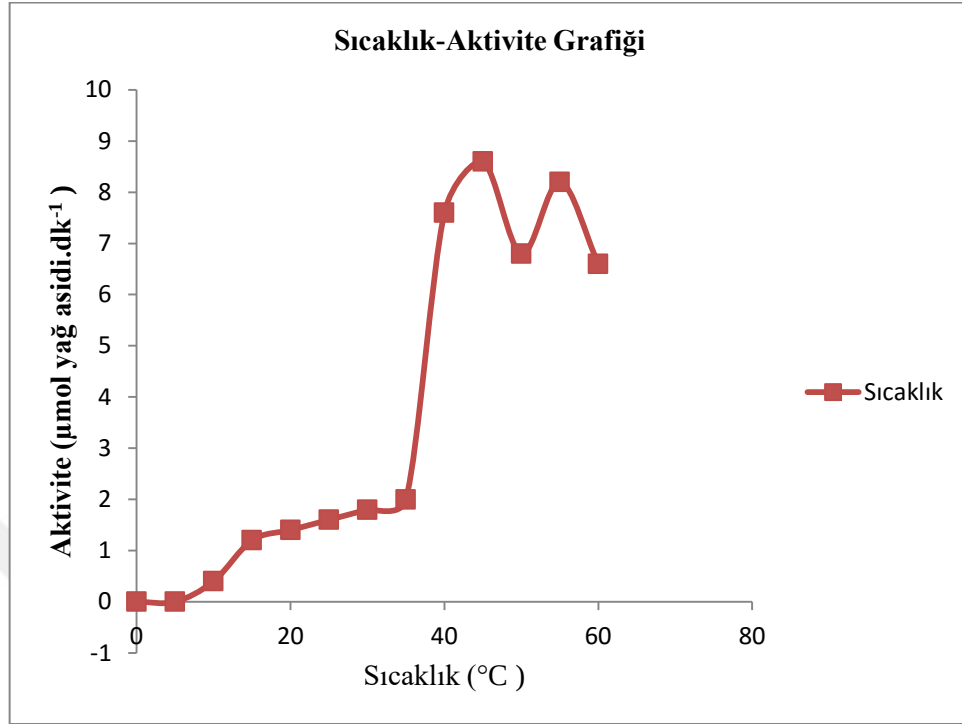
Şekil 4.1. Menengiç meyvesi lipazının optimum pH'sı.

4.1.4. Menengiç meyvesi lipazının optimum sıcaklığının belirlenmesi

Menengiç meyvesinin kolondan toplanan en yüksek aktivitedeki örneklerinden havuz oluşturulup 0-60°C aralığında pH 7,0'de lipaz aktivitesi ölçüldü. Bu ölçümlerin sonunda en iyi hidrolitik spesifik aktivite sıcaklığı 45°C olarak belirlendi (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.2.).

Çizelge 4.4. Menengiç meyvesi lipazının optimum sıcaklık değerleri.

Sıcaklık (°C)	Hidrolitik Spesifik Aktivite (μmol yağ asidi.dk ⁻¹)
0	0
5	0
10	0,4
15	1,2
20	1,4
25	1,6
30	1,8
35	2
40	7,6
45	8,6
50	6,8
55	8,2
60	6,6



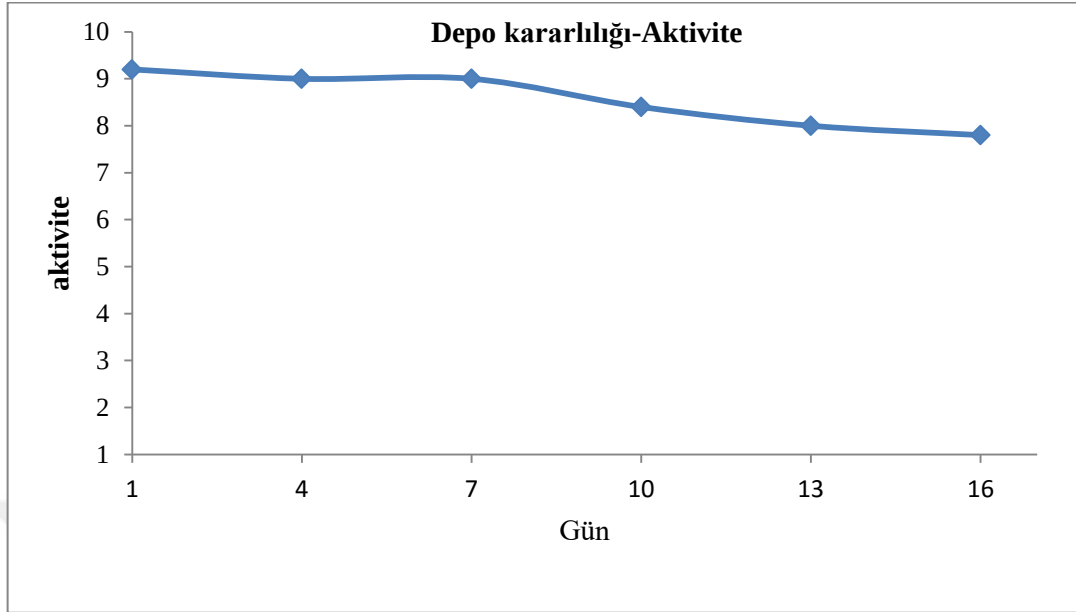
Şekil 4.2. Sıcaklığın menengiç meyvesi lipazına etkisi.

4.1.5. Menengiç meyvesi lipaz enziminin depo kararlılığının belirlenmesi

Menengiç meyvesi ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında Sephadex G-100 kolonundan geçen eluatlar arasında en yüksek aktivite gösteren örnekleri bir araya toplanılarak bu örnekler için 4°C’de ortalama iki hafta boyunca optimum sıcaklık ve optimum pH’da depolama kararlılığı için aktivite tayini yapıldı (Çizelge 4.5. ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.5. Menengiç meyvesi lipazının depo kararlılığı.

Zaman (Gün)	Spesifik Aktivite (U/dk.mg enzim)
1	9,2
4	9
7	9
10	8.4
13	8
16	7,8



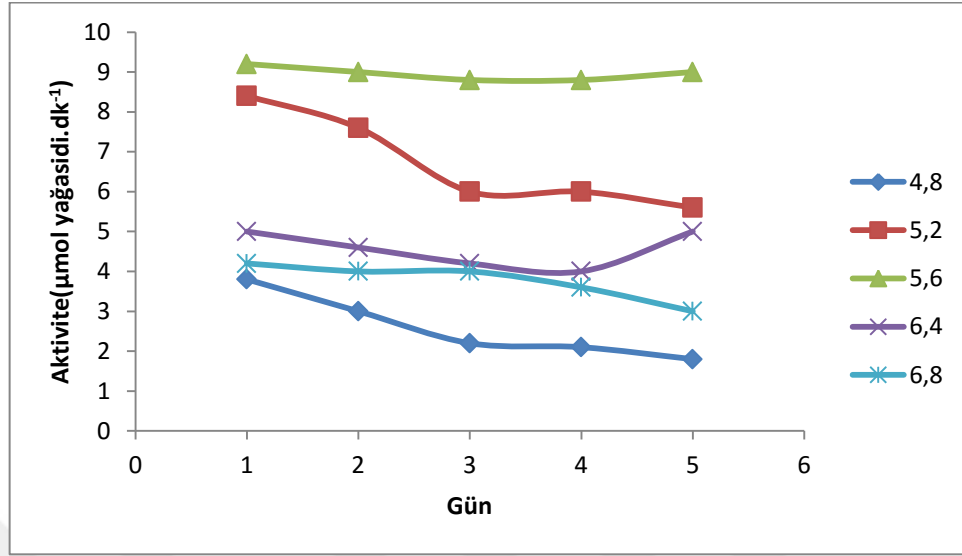
Şekil 4.3. Menengiç meyvesi lipazının depo kararlılığı.

4.1.6. Menengiç meyvesi lipaz enziminin stabil pH aktivitesi

Menengiç meyvesi lipazının stabil pH'ı belirlemek için 0,1M'da PH'ı 4,8-5,2 ve 5,6 sodyum asetat ile 6,4 ve 6,8 olan sodyumdihidrojenfosfat tamponları hazırlanıp beş gün süresince optimum sıcaklıktaki aktivite değerlerine bakıldı ve stabil pH'ın 5,6 olduğu belirlendi.

Çizelge 4.6. Menengiç meyvesi lipazının stabil pH aktivitesi.

pH/Gün	Aktivite($\mu\text{mol yağ asidi. dk}^{-1}$)				
	4,8	5,2	5,6	6,4	6,8
1	3,8	8,4	9,2	5	4,2
2	3	7,6	9	4,6	4
3	2,2	6	8,8	4,2	4
4	2.1	6	8,8	4	3,6
5	1,8	5,6	9	5	3



Şekil 4.4. Menengiç meyvesi lipazinin stabil pH aktivitesi.

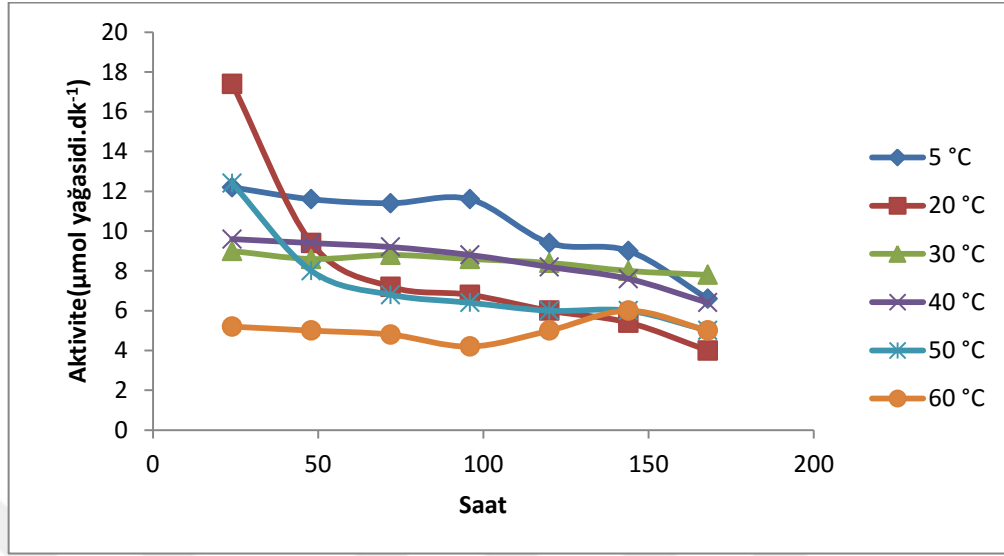
4.1.7. Menengiç meyvesi lipazinin stabil sıcaklığının belirlenmesi

Menengiç meyvesi lipazinin stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla enzim aktivitesi yüksek olan örneklerden havuz oluşturulup optimum pH da etüvlerde sıcaklıklar ayarlanarak dört gün boyunca aktivite tayini yapıldı.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği stabil sıcaklığı belirlemek için 5, 20, 30, 40, 50, 60°C sıcaklıklarında yapılan 6 farklı çalışmada en yüksek hidrolitik aktiviteyi veren stabil sıcaklık 30°C olarak belirlendi (Çizelge 4.7. ve şekil 4.5.).

Çizelge 4.7. Menengiç meyvesi lipazinin stabil sıcaklık aktivitesi.

	Aktivite (μmol.yağasidi.dk ⁻¹)					
Sıcaklık (°C)/saat	5	20	30	40	50	60
24	12,2	17,4	9	9,6	12,4	5,2
48	11,6	9,4	8,6	9,4	8	5
72	11,4	7,2	8,8	9,2	6,8	4,8
96	11,6	6,8	8,6	8,8	6,4	4,2
120	9,4	6	8,4	8,2	6	5
144	9	5,4	8	7,6	6	6
168	6,6	4	7,8	6,4	5	5



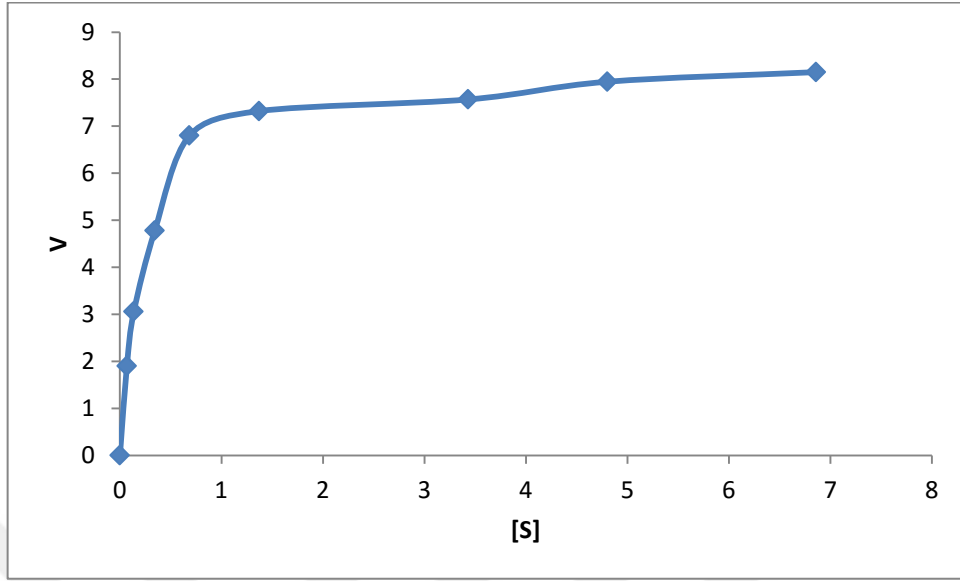
Şekil 4.5. Menengiç meyvesi lipazının stabil sıcaklık aktivitesi.

4.1.8. Lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin delirlenmesi

Menengiç meyvesi lipazına uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek için trioleinin 10, 20, 50, 100, 200, 500, 700, 1000 μ l'lık konsantrasyonlarında denemeler yapılarak uygun derişim belirlendi.

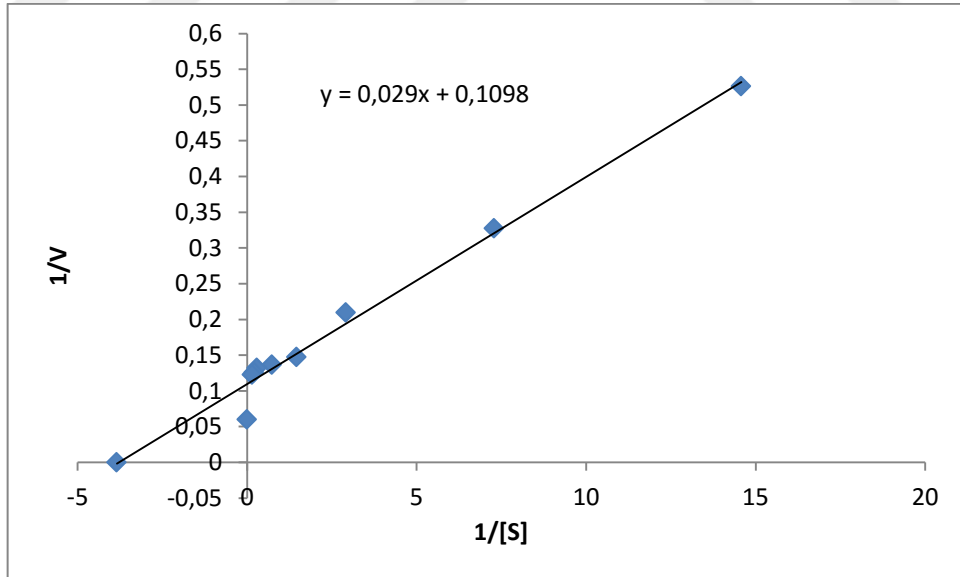
Çizelge 4.8. Menengiç meyvesi lipazının değişik substrat konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri.

[S] (mM)	V (U/dk.mg enzim)	1/[S] ($\times 10^{-3}$) 1/(U/dk.mg enzim)	1/V ($\times 10^{-3}$) 1/(U/dk.mg enzim)
10	1,9	14,57726	0,526316
20	3,056	7,28863	0,327225
50	4,776	2,915452	0,20938
100	6,801	1,457726	0,147037
200	7,321	0,728863	0,136593
500	7,568	0,291545	0,132135
700	7,945	0,208247	0,125865
1000	8,15	0,145773	0,122699



Şekil 4.6. Menengiç meyvesi lipazının Michaelis-Menten grafiği.

Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi amacıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.7).

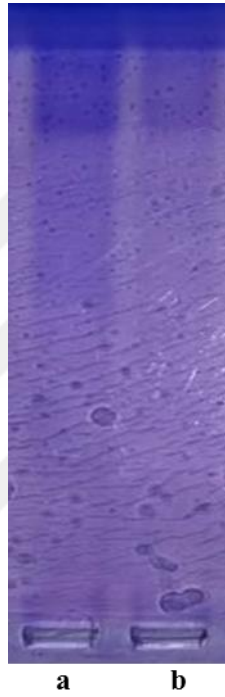


Şekil 4.7. Menengiç meyvesi lipazının Lineweaver-Burk grafiği.

Lineweaver-Burk grafiği sonucunda, Km değeri yaklaşık 0,2641mM ve Vmax değeri ise yaklaşık 9,107U/dk.mg enzim olarak hesaplandı.

4.1.9. Menengiç meyvesi lipaz enziminin SDS-PAGE ile karakterizasyonu

SDS-PAGE için; %12'lik ayrıştırma jeli üzerine %3,75'lik yığma jeli ilave edilerek numuneler kuyuya yüklendi ve 100V'da yaklaşık 2 saat 10 dk yürütülür. Boyama işlemi için; %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250 ile yapıldı. Yıkama işlemi için; %10 metanol ve %7'lik asetik asit ile yapıldı. Bantlar netleştiği zaman fotoğrafı çekildi.



Şekil 4.8. Menengiç meyvesi lipazının SDS-PAGE ile karakterizasyonu (**a:** Standart lipaz enzimi, **b:** Jel filtrasyon kromatografisi).

4.2. Tartışma

Lipazlar (triasilgliserol açılhidrolaz, EC. 3.1.1.3), hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon reaksiyonlarını katalizleme yeteneklerinden dolayı endüstride geniş bir uygulama alanına sahiptir. Son yıllarda ise lipazların kullanım alanlarının ve yerinin artması sebebiyle lipaz saflaştırma çalışmaları büyük önem kazanmıştır. Bu çalışmada menengiç meyvesinden lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Menengiç bitkisinden (*Pistacia terebinthus*) lipaz enzimi saflaştırılması ve kinetik özelliklerin incelenmesi çalışması üç ana aşamadan oluşmaktadır.

Çalışmanın birinci aşamasında menengiç tohumları lipazının ham ekstratını elde etmek için tohum öğütülerek soğuk ekstraksiyon yöntemi ile yağlar proteinlerden uzaklaştırılıp kurutma işlemine tabi tutulmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında jel filtrasyonu yöntemi kullanılarak menengiç tohumu lipazı saflaştırılarak elde edilen enzimin saflığı SDS-PAGE yöntemi ile ortaya konulmuştur.

Çalışmanın son aşamasında ise lipaz enziminin maksimum katalitik performansı için optimum reaksiyon koşulları belirlenerek kinetik sabitler tespit edilmiştir.

Menengiç bitkisinde hidroksiapatit ve Sephadex G-100 kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi yöntemi sonucunda lipaz enziminin hidrolitik spesifik aktivitesinin 2,146 EU/mg.protein olduğu ve ham ekstrat çözeltisine göre jel filtrasyon yönteminin aktiviteyi 1,25 kat arttırdığı tespit edilmiştir.

Menengiç meyvesi lipazının optimum pH'ı 5,6 değeriyle asidik olduğu gözlenmiştir.

Bitkisel kaynaklı tohumlar üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda lipazın optimum sıcaklık değerlerinin 30-80°C arasında değişebildiği belirtilmiştir (Hiol vd., 2000). Menengiç meyvesinin optimum sıcaklık değeri 45°C olarak ölçülmüştür.

Menengiç meyvesi ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında Sephadex G-100 kolonundan geçen eluatlar arasında en yüksek aktivite gösteren örnekleri bir araya toplayıp bu örnekler için 4°C'de ortalama iki hafta boyunca yapılan depo kararlılığı çalışması sonunda aktivitede 1,4 U/dk.mg enzim değerinde bir düşme görülmüş ve enzim kararlılığının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Menengiç meyvesi lipazının stabil pH'ı belirlemek için 0,1M'da PH'ı 4,8-5,2 ve 5,6 sodyum asetat ile 6,4 ve 6,8 olan sodyumdihidrojenfosfat tamponları hazırlanıp beş gün boyunca optimum sıcaklıktaki aktivitelerine bakılarak stabil pH'ın 5,6 olduğu belirlenmiştir.

Menengiç meyvesi lipazının stabil sıcaklığını tespit etmek için enzim aktivitesi yüksek değerde olan örneklerden havuz sistemi oluşturulmuş ve optimum pH etüvlerinde belirli sıcaklıklarda yedi gün boyunca aktivite tayini yapıldı.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği stabil sıcaklığı tespit etmek için 5, 20, 30, 40, 50, 60°C sıcaklıklarında 6 farklı çalışma yapıldı. Bu çalışmalar sonucunda en yüksek hidrolitik aktiviteyi veren stabil sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir.

Menengiç meyvesi lipazının Lineweaver-Burk grafiği ve K_M ve V_{max} değerleri triolein substratı kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,2641 mM ve 9,107 U/dk.mg enzim olarak bulunmuştur.

Elde ettiğimiz enzimin karakteristik özelliklerinden dolayı gıda, deterjan ve kozmetik endüstrinde kullanılabilmektedir. İmmobilizasyon alışması yapılması sonucunda sanayide daha kullanışlı olabilir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adam, B., ve Yiğitoğlu, M. R., (2012), Tıbbi biyokimya, Nobel Yayınevi, 1.Baskı.
- Akköse, S., (2013), İmmobilize lipaz kullanarak değişik bitkisel yağlardan yağ asidi üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Ve Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı.
- Altındağ, S., (2013), Menengiç (*Pistacia terebinthus*) özütünün sazan (*Cyprinus Carpio*, 1758 L.) balıklarının hematolojik ve serum biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Ası, T., (1999), Tablolarla biyokimya Cilt:2, Ankara Üniversitesi.
- Bülbül, M., (2014), Biyokimya, Hilal Ofset, 1.Baskı
- Champe, P. C., Harvey, R. A., ve Ferrier, D. R., (2007), Biyokimya, Çeviri, Nobel Kitabevleri, 3.baskı.
- Çalar, N., (2013), Sakız Ağacı (*Pistacia Lentiscus* L.)'nın *Pistacia* Anaçları (*Pistacia Vera* L., *Pistacia Khinjuk* Stocks , *Pistacia Atlantica* Desf., *Pistacia terebinthus* L.) Üzerine in Vitro Mikroaşılması Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Demirkan, B., (2008), Ceviz (*Juglans regia* L.) tohumu lipazının saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Güngör, K., (2008), Çağla badem (*prunus dulcis*) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Haalck, L., Kallabis, B., Schoemaker, M., Cammann, K., Spener, F. 1991, Lipases for Biosensors. *Fat. Sci. Technol.* 93: 415-416.
- Hamamchi, H., (2014), *Rhodotorula mucilaginosa*'dan lipaz enzimi üretimi ve aktivitesine etkili parametrelerin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sodra, L., Comeu, L. C., (2000), Purification and characterizat on of on extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* Strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 421-430.
- <http://www.mustafaaltinisik.org.uk>, Erişim Tarihi: 15.01.2016
- Jaeger, K. E., Reetz, T. M., (1998), Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 16, 396-403.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kartal, F. 2004, Pankreatik lipazın siyanurik klorür ile aktive edilmiş polivinil alkol (PVA) üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornava, İzmir.

Kaya, F., (2012), Menengiç tohumlarından yağ ekstraksiyonu şartlarının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Keha, E. E., ve Küfrevioğlu, Ö. İ., (2010), Biyokimya, Aktif Yayınları, 7.Baskı.

Kıran, Ö., E, Çömlekçioğlu, U, Dostbil, N., (2006), Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1), 12-19.

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., Gupta, R., (2005), Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. Protein Expression and purification, 41, 38-44.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., ve Rodwell, V. W., (2004), Harper biyokimya, Nobel Yayınevi, 25.Baskı.

Nasa, E., (1988), Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growthbconditions. J. Gen. Microbiol., 134, 133-227.

Nelson, D. L., ve Cox, M. M., (2005), Lehninger biyokimyanın ilkeleri, Çeviri, Palme Yayıncılık, 3. Baskı.

Öztürk B., (2006). “Lipaz enzimi: yapısal özellikleri ve uygulama alanları”. Gıda mühendisliği dergisi, 20-23

Özcan, M. M., Tzakou, O., ve Couladis, M., (2009), Essential oil composition of the turpentine tree (*Pistacia terebinthus* L.) fruits growing wild in Turkey, 114, 282–285.

Patil, J. K., Chopda, M. Z., ve Mahajan, R. T., (2011), Lipase biodiversity, Indian Journal of Science and Technology, 4(8), 971-977.

Peçe, Y. S., (2014), Enzim immobilizasyonu, Yüksek Lisans Semineri, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.

Rakhimov, M.M. (1986), Biological Microdevices with Enzymatic Intensification. Biofizika, 31: 704-710.

Sidar, H., (2011), Menengiç tohumlarından yağ eldesi: sulu ekstraksiyona enzim ve yüzey aktif madde etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Sökmen, B. B., (2005), Kayısı (*Armeniaca Vulgaris* Lam.) tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Türk, B., (2008), İmmobilize lipaz enzim kullanılarak etil bütirat üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Uluğ, N., (2011), Alginat+jelatin jel karışımlarında lipaz immobilizasyonu ve immobilize enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı.

Villeneuve, P., (2003), Plant lipases and their applications in oils and fats modification, European Journal of Lipid Science and Technology, 105, 308–317.

Walton, M. J., Cowey, C. B., ve Adron, J. W., (1984), The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Br. J. Nutr. 52(1), 115-122.

Yanık Koçak, D., (2013), Production Of Low Caloric And Spreadable Lipid By Enzymatic Interesterification Of Terebinth Fruit (*Pistacia terebinthus* L.) Oil, Ph.D Thesis University Of Gaziantep Graduate School Of Natural & Applied Sciences In Food Engineering, Gaziantep.

Yapaşan, E., (2008), Partial Purification And Characterization Of Lipase Enzyme From a *Pseudomonas* Strain, Master Of Science, School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, İzmir.

Yıldız, G., (2013), *Pistacia terebinthus* (Menengiç) meyve ekstraktlarının ve menengiç kahvesinin total fenolik ve flavonoid madde kompozisyonlarının ve antioksidan etkilerinin karşılaştırılması. Bitirme Ödevi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Kayseri.

Yılmaz, E., (2010), Farklı teknikler kullanarak değişik destek materyallerine lipaz immobilizasyonu ve bir anti-inflammatör olan s-naprokseenin oluşumunda kullanılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı.

Yöntem, M., ve Ünal, M., (2011), Biyokimya, Aybil Yayınevi, 1. Baskı.

Yücel, Y., (2008), Bazı enzimleri kullanarak biyodizel üretimi ve biyodizel özelliklerinin analitik metotlarla araştırılması, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Bursa.