

ÇAM FISTIĞI TOHUMUNDAN (*Pinus pinea* L.)
LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Gülay KILAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Temmuz – 2015

ÇAM FISTIĞI TOHUMUNDAN (*Pinus pinea* L.) LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Gülay KILAR

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Temmuz-2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

Gülay KILAR'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı ÇAM FISTIĞI TOHUMUNDAN (*Pinus Pinea* L.) LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

01/07/2015

Üye : Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Muharrem AKCAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Burcu ÇETİN

Fen Bilimleri Enstitüsün Yönetim Kurulu'nun/...../2015 gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÇAM FISTIĞI TOHUMUNDAN (*Pinus Pinea* L.) LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Gülay KILAR

Yüksek Lisans Tezi, 2015

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar, E.C.3.1.1.3), canlılarda gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan esterlerin sentezini ve hidrolizini katalizlerler. Lipazlar sanayide de, biyolojik proseslerdeki kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmada pinaceae familyasında yer alan çam fıstığı (*Pinus pinea*) türünün tohumlarından lipaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çam fıstığı tohumundan lipaz enzimi saflaştırmak için; yağsızlaştırma ve protein tayini yapılmıştır. Daha sonraki aşamalarda ise amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi gibi metodlar kullanılmıştır.

Elde edilen enzimlerin saflığını belirlemek için aktivite tayini ve elektroforez (SDS-PAGE) tayini yapılmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda çam fıstığı tohumundan saflaştırılan enzimin optimum pH 4,8 ve optimum sıcaklığın 50°C olarak bulunmuştur. Ayrıca stabil pH 4,4 ve stabil sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir.

Çam fıstığı tohumundan elde edilen lipazın depo kararlılığı 4°C’de enzimin spesifik aktivitesinin korunmadığı ve enzimin dayanıksız olduğu gözlenmiştir.

Çam fıstığı tohumu lipazının Km ve Vmax değerleri Km=0,0773 Mm ve Vmax 1,5013U/dk.mg enzim olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Karakterizasyon, Enzim kinetiği, Lipaz, Çam fıstığı tohumu, Saflaştırma.

**PURIFICATION AND INVESTIGATION OF KINETIC PROPERTIES OF LIPASE
ENZYME FROM PINON NUT SEED (*Pinus Pinea* L.)**

Gülay KILAR

MS Thesis, 2015

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Lipase enzymes (triacylglycerol açilhidrolaz are EC 3.1.1.3) are catalyzing the synthesis of esters and hydrolysis that consisting of glycerol and long chain fatty acids in living things. The use of lipases in biological processes in the industry is increasing day by day. In this study, purification of lipase enzyme and examination of the kinetic properties have been aimed from kinds of pine nut seeds (*Pinus pinea*) related to the family of Pinaceae.

To purify Lipase from pine nut seeds non phytic acid and protein determination was performed. In the following stages, some methods have been performed such as ammonium sulfate precipitation, dialysis, gel filtration chromatography.

To determine the purity of the obtained enzymes, activity and electrophoresis determination (SDS-PAGE) was performed.

As a result, the enzyme's (purified from the seeds of pine nuts) optimal pH 4,8 and optimum temperature 50 ° C have been determined.

Storage stability of lipase enzyme derived from pine nuts seed at 4 °C was observed that specific activity of the enzyme failure to protect and also enzyme is weak.

K_m and V_{max} values of the pinon nuts seed lipase were found as $K_m=0,0773\text{mM}$ and V_{max} 1,5013 U/dk.mg.

Key Words: Characterization, Enzyme kinetics, Lipase, Pinon nuts seeds, Purification.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince, gerek bilimsel konularda gerek manevi anlamda benden yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Metin BÜLBÜL 'e bana her zaman gösterdiği ilgi, sabır, iyi niyet ve güler yüzü için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans dönemi boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığımız Arş. Gör. Ekrem TUNCA'ya ve tezimin deneysel kısmında bana yardımcı olan arkadaşım Zübeyde BAYER'e teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu günlere getiren ve her konuda maddi ve manevi destek olan kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzimlerin Uygulama Alanları	2
1.3. Enzim Aktivite Mekanizması	2
1.4. Enzim Kinetiği	4
1.4.1. Enzim aktivitesine etkileyen etmenler	6
1.4.1.1. Sıcaklık etkisi	6
1.4.1.2. Ortam pH'ı	7
1.4.1.3. Substrat konsantrasyonu	8
1.4.1.4. Enzim konsantrasyonu	8
1.4.1.5. Zaman etkisi	8
1.5. Enzim İnhibisyonu	8
1.6. Enzim Aktivitesi	10
2. LİPAZLAR	12
2.1. Lipazların Kullanım Alanları	13
2.1.1. Lipazların gıda endüstrisinde kullanımı	13
2.1.2. Lipazların deterjan endüstrisinde kullanımı	14
2.1.3. Lipazların kağıt endüstrisinde kullanımı	14
2.1.4. Lipazların farmasötik endüstrisinde kullanımı	14
2.1.5. Lipazların biyopolimerlerin üretiminde kullanımı	15
2.1.6. Lipazların organik sentezde kullanımı	15
2.2. Lipaz Kaynakları	16
2.3. Lipaz Analiz Yöntemleri	16
2.3.1. Kalitatif analiz	17
2.3.2. Kantitatif analiz	17

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. ÇAM FISTIĞI BİTKİSİ VE ÖZELLİKLERİ.....	18
3.1. Çam Fıstığı (<i>pinus pinea</i> L.) Türünün Özellikleri.....	18
3.2. Çam Fıstığından Yararlanma Olanakları	19
4. MATERYAL VE METOD	21
4.1. Materyal	21
4.1.1. Kullanılan kimyasallar	21
4.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....	21
4.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	21
4.2. Metodlar	22
4.2.1. Çam fıstığı tohumunun seçilmesi ve yağsızlaştırma işlemi	22
4.2.2. Aktivite tayin yöntemi.....	23
4.2.3. Lipaz enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	23
4.2.4. Sephadex G-100 jel hazırlanması ve jel filtrasyon kromatografisi	24
4.2.5. Saflaştırılan proteinlerin SDS-PAGE ile karakterizasyonu.....	24
4.2.6. Optimum pH çalışmaları.....	24
4.2.7. Optimum sıcaklık çalışmaları	25
4.2.8. Depo kararlılığının tayini	25
4.2.9. Stabil-pH çalışmaları	25
4.2.10. Stabil-sıcaklık çalışmaları	25
4.2.11. K_m ve V_{max} değerleri	25
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	27
5.1. Sonuç.....	27
5.1.1. Çam fıstığı tohumu lipazının hidrolitik aktivitesinin tayini	27
5.1.2. Çam fıstığı tohumunun lipazının saflaştırma basamakları.....	28
5.1.3. Çam fıstığı tohumunun optimum pH hesaplanması.....	28
5.1.4. Çam fıstığı tohumu lipazının optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	29
5.1.5. Çam fıstığı tohumunun lipaz enziminin depo kararlılığının belirlenmesi.....	30
5.1.6. Çam fıstığı tohumunun lipaz enziminin stabil pH aktivitesi.....	31
5.1.7. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil sıcaklığının belirlenmesi.....	32
5.1.8. Lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi	33
5.1.8. Çam fıstığı tohumunun SDS-PAGE ile enzimin karakterizasyonu.....	35
5.2. Tartışmalar.....	35
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Enzim anahtar modeli.	3
1.2. Lineweaver-Burk grafiği.	6
1.3. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	7
1.4. Başlangıç reaksiyon hızının pH ile değişimi.....	8
1.5. Yarışmalı enzim inhibisyonu.	9
1.6. Yarışmasız inhibisyon.	9
1.7. Yarı yarışmalı inhibisyon.	10
2.1. Yağların oluşum mekanizması.	12
3.1. Çam fıstığı kozalağı ve tohumları.	18
3.2. Çam fıstığı tohumunun iç kısmı.	19
5.1. Çam fıstığı tohumunun optimum pH'sı.....	29
5.2. Sıcaklığın çam fıstığı tohumunun lipaza etkisi.	30
5.3. Çam fıstığı tohumu lipazının depo kararlılığı.	31
5.4. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil pH aktivitesi.....	32
5.5. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil sıcaklık aktivitesi.	33
5.6 Çam fıstığı tohumu lipazının Michaelis-Menten grafiği.....	34
5.7. Çam fıstığı tohumu lipazının Lineweaver-Burk grafiği.....	34
5.8. Çam fıstığı tohumunun lipazının SDS-PAGE ile karakterizasyonu.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bazı enzimlerin kofaktörleri	3
5.1. Çam fıstığı tohumu lipazının saflaştırma basamaklarında aktivite değişimi.....	27
5.2. Çam fıstığı tohumu lipazının saflaştırma basamakları.	28
5.3. Çam fıstığı tohumu lipazının optimum pH değerleri.	28
5.4. Çam fıstığı tohumu lipazının optimum sıcaklık değerleri.	29
5.5. Çam fıstığı tohumu lipazının depo kararlılığı.	30
5.6. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil pH aktivitesi.	31
5.7. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil sıcaklık aktivitesi.	32
5.8. Çam fıstığı tohumu lipazının değişik substrat konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri.....	33

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

Mg

mL

mM

nm

dk

 μ g**Açıklamalar**

Michealis Menten sabiti

Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği max hız

miligram

mililitre

milimolar

nanometre

dakika

mikrogram

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Canlı organizmasında kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden % 100'lük ürün verimini sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denilmektedir. Katalitik RNA moleküllerin küçük bir grubu hariç olmak üzere bütün enzimler protein yapısında olup, en büyük ve en çok özelleşmiş grubu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Canlıları oluşturan biyomoleküller oldukça kararlı olduklarından kendiliğinden kolay bir şekilde reaksiyona girmezler. Hücredeki kimyasal olayların hepsi enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir.

Biyomoleküllerin kararlı oluşu şu önemli sonucu sağlar; Hücrenin içinde enzimi olmayan bir reaksiyon vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyon meydana getirmez. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir. Buradan da enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmıştır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

E. Buncher'in maya ekstratını kullanarak fermantasyon ile alkol elde edilmesiyle 1897 yılında enzim ile ilgili ilk çalışmalar başlamıştır. Sumner üreaz enzimini fasulyeden izole edilerek 1926 yılında kristallendirmeyi başarmıştır. Northrop tripsin, pepsin ve kimotripsin enzimlerini saflaştırıp kristal halde elde etmesi ile 1930-36 yılları arasında kesinlik kazanmıştır. 2000'den fazla enzim çeşitli kaynaklardan saflaştırılmıştır. Bunlardan 200 tanesi ise kristal haldedir (Güngör, 2008).

Enzim çalışmaları oldukça pratik bir öneme sahip ve biyokimyasal süreçte merkezi konumdadır. Enzimler hakkında besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler, kimyasal enerjisini korur ve makro moleküller ürettiği söylenmiştir. Kalıtsal genetik bozukluklarda bir ya da daha fazla enzimin aşırı aktivitesi neden olmaktadır. Enzim aktivitelerinde doku örneklerinde, kan plazmasında veya eritrositlerde, ölçümü belli hastalıkların tedavisinde önemlidir. Bazı ilaçların biyolojik etkileri enzimlerle etkileşerek ortaya çıkmaktadır (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimlerle ilgili birçok konu aydınlatılmış olmakla birlikte, yeni enzimlerin saflaştırılması ve kataliz mekanizmalarının aydınlatılması ile yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Güngör, 2008).

1.2. Enzimlerin Uygulama Alanları

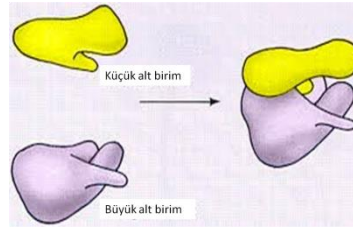
Enzimler; gıda, deterjan, eczacılık, tekstil, kağıt, deri ve kozmetik gibi bir çok endüstriyel alanda kullanılmaktadırlar. Çeşitli uygulamalarda giderek daha büyük önem kazanan enzimler ticari olarak üretilmektedirler. 2000 yılında, enzimlerin endüstriyel pazardaki değerinin yaklaşık 1,5 milyar dolar olduğu bilinmektedir. Proteaz, lipaz, amilaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimler endüstriyel alanda önemli yere sahiptir (Pandey vd., 1999; Houde vd., 2003).

Günümüzde biyoteknolojik ve endüstriyel teknolojilerin birçoğunda enzimlerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Ancak maliyetleri ve elde edilebilmelerindeki problemler gibi bazı dezavantajlarından dolayı enzimlerin endüstriyel alanlarda uygulanması sınırlı olmaktadır. Bu açıdan protein mühendisliği ve biyoteknolojik yöntemlerle endüstrinin ihtiyaç olduğu, bir biyolojik kaynaktan büyük miktarda üretilebilen, yüksek sıcaklıklara ve kullanılacağı endüstriyel uygulama alanındaki çeşitli kimyasal ortamlara dayanıklı enzimlerin geliştirilmesi konusunda oldukça dikkat çekici çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

1.3. Enzim Aktivite Mekanizması

Enzimler katalizlenen reaksiyonun aktivasyon enerjisini, substrata bağlayarak ve bir enzim substrat kompleksi oluşturarak düşürürler. Ancak enzimler serbest enerji değişimini ve denge sabitini etkilemezler.

Enzim-substrat etkileşiminin moleküler yönü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Etkileşim bir enzim-substrat kompleksinden diğerine farklılık göstermektedir. X-ışını ve Raman spektroskopileri kullanılarak enzim-substrat kompleksinin varlığı ortaya çıkarılmıştır. Enzim ve substrat arasındaki etkileşimler genellikle zayıf kuvvetlerle gerçekleşmektedir. Çoğu durumda, vander Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı enzim-substrat komplekslerinin oluşumundan sorumludur. Substrat enzim molekülüne göre çok küçük bir molekül olduğu için enzim molekülü üzerinde aktif bölge olarak tanımlanan özel bir bölgeye bağlanır. Bu etkileşimi açıklayan en basit model anahtar-kilit modelidir. Burada enzim kilidi ve substrat da anahtarı temsil etmektedir (Kargı ve Schuller, 1992).



Şekil 1.1. Enzim anahtar modeli.

Çok-substratlı enzimatik reaksiyonlarda, enzimlerin aktif bölgeleri, substratları birbirine ve aktif bölgeye yakın olacak şekilde tutarlar. Buna yakınlık etkisi denir. Aynı zamanda, enzimler substratları belirli pozisyonlarda ve açılarda da tutarak reaksiyon hızını arttırırlar. Buna da yönlendirme etkisi adı verilir. Bazı enzimlerde, enzim-substrat kompleksinin oluşumu enzimin üç boyutlu yapısında değişikliklere neden olur. Substrat molekülün enzim molekülünün yapısını bu şekilde değiştirmesi enzimin katalitik aktivitesinin artmasına katkıda bulunabilir. Lizozim ve karboksipeptidaz enzimlerinin substratları ile kompleks oluştururken üç boyutlu yapılarını değiştirdikleri gözlenmiştir. Enzimlerin aktif bölgelerinin ve kıvrım özelliklerinin enzim aktivitesi üzerinde derin etkileri vardır. Bilinen enzimler düzgün çalışmak için uygun koenzim ve kofaktörlere ihtiyaç duyarlar. Çizelge 1.1 Bazı enzimlerin kofaktörlerini gösterilmektedir.

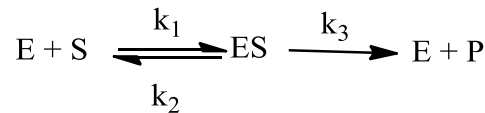
Çizelge 1.1. Bazı enzimlerin kofaktörleri.

Kofaktörler	Enzimler
Zn^{2+}	Alkol dehidrojenaz
	Karbonik anhidraz
	Karboksipeptidaz
Mg^{2+} Mn^{2+}	Fosfohidrolazlar
	Fosfotransferazlar
	Sitokromlar
Fe^{2+} veya Fe^{3+}	Peroksidaz
	Katalaz
	Ferredoksin
Cu^{2+} (Cu^{+})	Tirosinaz
	Sitokrom oksidaz, lakkaz
K^{+}	Pirüvatkinaz (Mg^{2+} gerektirir)

1.4. Enzim Kinetiği

Matematiksel tek substratlı enzim kataliz reaksiyon modeli ilk olarak V. C. R. Henri ve L. Michealis ile M. L. Menten tarafından geliştirilmiştir. Michealis-Menten kinetiği veya doyumluk kinetiği kompleks olmayan enzim katalizli reaksiyonların kinetiği olarak bilinirler. Enzim kinetiğinin genel özellikleri Langmuir-Hinselwood kinetiğine benzemektedir (Kargı ve Schuler, 1992).

Biyolojik sistemlerde çok enzimli ve çok substratlı reaksiyonlar gibi daha kompleks enzim-substrat etkileşimleri meydana gelebilir. Bir enzimde substratlarının bağlanabileceği belli sayıda aktif bölge bulunur. Yüksek substrat derişimlerinde aktif bölgeler substratlar tarafından doldurulur ve enzim doyumluğa ulaşır. Enzim-substrat kompleksi oluşumu için tersinir bir basamak ve oluşan bu kompleksin parçalanma basamağının doyumluk kinetiği basit bir reaksiyon mekanizması ile elde edilir (Şengör, 2006).

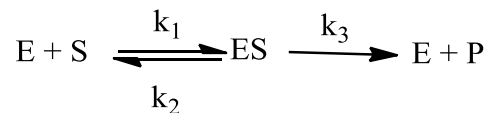


Kinetik terimleri türetilirken substrat derişimi değişken ve enzim derişimi sabit alınmaktadır. Genellikle reaksiyon hızının (V) belirli bir değere kadar başlangıç derişimi $[E_0]$ ile orantılı olduğu deneysel bulgularla bulunmuştur (Aktaş, 1999).

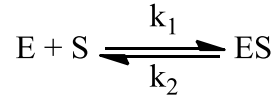
Substrat derişimi ve doyumluk kinetiği genellikle V ile gösterilir. Düşük substrat derişimlerinde V, [S] ile doğrusal olarak değişir. Fakat [S] artıkça bu ilişki kaybolarak V daha yavaş artmaya başlar. Fazla substrat derişimlerinde ise V sabit kalmaya başlar ve değer V_m olarak adlandırılır (Aktaş, 1999).

K_m ve V_{max} değerlerinin önemi

Her enzimin kendine özgü K_M değeri vardır ve bu değer 10^{-1} ile 10^{-6} M arasındadır. K_M değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değil, fakat substratın yapısına, pH, sıcaklık ve iyonik şiddete bağlıdır. K_m değerinin iki anlamı vardır; Birincisi K_M , enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi, K_M değerinin denkleminde gösterilen katalizleme mekanizması basamaklarının hız sabitleriyle ilişkisi vardır.



k_2 'nin k_3 'ten çok büyük olduğu durumlarda ES'nin E ve S vermek üzere ayrışmasının, ürünün oluşmasından daha hızlı olduğu bir haldir. Bu durumda ($k_2 \gg k_3$ iken)



Denklemine göre ES'nin ayrışma sabiti,

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1}$$

Şeklinde ifade edilir. Yani $k_2 \gg k_3$ olduğu zaman, K_M ES'nin ayrışma sabitine eşittir. Bu durumda K_M , ES kompleksinin bir sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek K_M kuvvetli bağlanmayı ifade eder. Sonuç olarak K_M , $k_2 \gg k_3$ iken, enzimin substrata olan ilgisini gösterir (Küfrevioğlu, 2009).

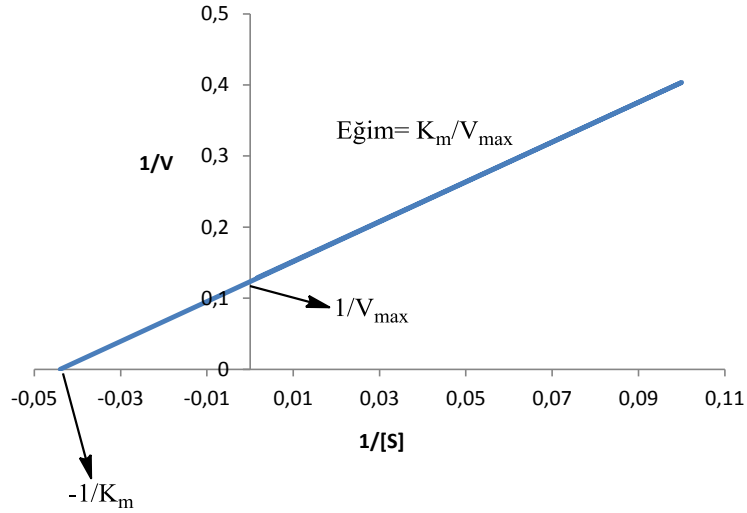
Bir enzimin kinetik özellikleri hakkındaki bilgiler; enzimin substrata ilgisini ifade eden K_M sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini gösteren V_{max} değerlerinden elde edilir. Bu iki değer deneysel olarak bulunur. Değerlerden elde edilen grafiğin eğimi Michaelis-Menten denkleminde bir doğru olarak elde edilemediğinden; K_M ve V_{max} değerleri kesin olarak bulunamaz. Eğimin doğru olması için $1/V$ 'nin $1/[S]$ 'ye karşı grafiği çizilir. Buradan K_M ve V_{max} değerleri kesin olarak belirlenebilir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

ifadesi çıkartılır.

Bu $y = mx + n$ doğru denkleminde benzer. Doğrunun çizildiği grafikte $x=1/[S]$, $y=1/v$, eğim (m)= K_M/V_{max} ve y ekseninin kesildiği nokta $1/V_{max}$ olur. Bu çizime Lineweaver-Burk grafiği adı verilir.



Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği.

Doğru x-eksenini kesecek şekilde uzatıldığında kesme noktası $-1/K_M$ 'yi verir. Bu grafikten faydalanarak V_{max} ve K_M değerleri bulunabilir. Reaksiyonlarda kullanılan $[S]$ değerleri çok küçük ve değerler $1/[S]$ şeklinde alındığı için bu grafikte de K_M ve V_{max} değerleri tam olarak elde edilemez. Bunun için Lineweaver-Burk denkleminin her iki tarafının V_{max} , x , v ile çarpılması ve gerekli düzenlemelerin yapılmasıyla doğru denklemi elde edilir.

$$v = -K_M \frac{v}{[S]} + V_{max}$$

v , $v/[S]$ 'ye karşı çizildiği zaman aşağıdaki doğrusal grafik bulunur. Bu grafiğe Eadie-Hofstee grafiği adı verilir. Bu çizimden K_M ve V_{max} kolayca bulunabilmektedir (Bülbül, 2014) .

1.4.1. Enzim aktivitesine etkileyen etmenler

Enzim aktivitesini etkileyen etmenler şunlardır;

- Sıcaklık
- Ortam pH'ı
- Zaman
- Substrat konsantrasyonu
- Enzim konsantrasyonu

1.4.1.1. Sıcaklık etkisi

Enzimler protein yapısında olduklarından belli bir sıcaklığa kadar dayanabilirler. Belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar.

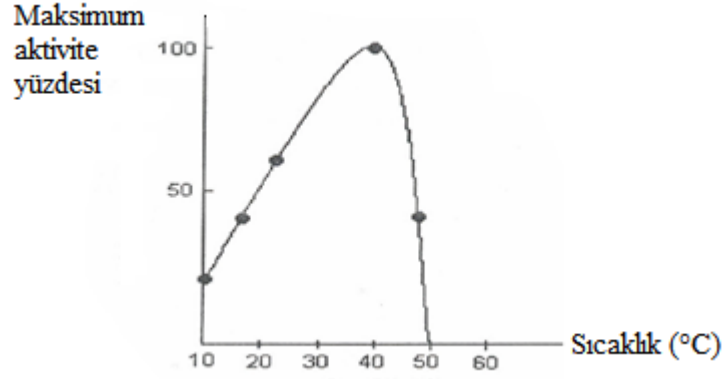
Sıcaklık enzimatik reaksiyonları hızlandırır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir.

Reaksiyon hızı sıcaklıkla Arrhenius eşitliğine göre değişir.

$$V = k_{\text{kat}}[ES]$$

$$k_{\text{kat}} = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

Burada E_a aktivasyon enerjisini (kcal/mol) ve $[ES]$ Enzim-substrat kompleksinin derişimini göstermektedir. Reaksiyon hızı $1/T$ 'ye karşı grafiğe geçirildiğinde doğrunun eğimi $-E_a/R$ değerini verir (Şengör, 2006).

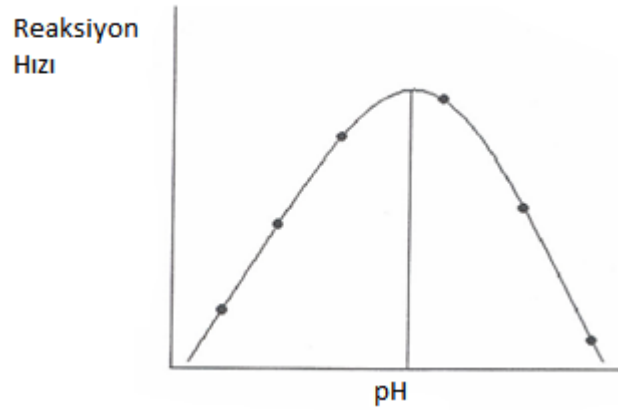


Şekil 1.3. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

1.4.1.2. Ortam pH'ı

Enzimlerin aktif bölgelerinde iyonik gruplar bulunur. Enzimin etkili şekilde çalışabilmesi için bu iyonik grupların uygun yapılarda bulunması gereklidir. Ortam pH'sındaki değişimler aktif bölgenin iyonik yapısını değiştireceği için enzim aktivitesini ve dolayısıyla reaksiyon hızı da değişir. pH değişimleri enzimin üç-boyutlu yapısını da değiştirebilir. Bu nedenlerden dolayı, enzimlerin aktif oldukları belirli pH aralıkları vardır.

Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH aralıkları farklıdır. Bazı enzimler düşük pH aralıklarında (asidik) ortamlarda daha aktif iken bazıları yüksek pH aralıklarında (bazik) ortamlarda aktiftir. Fakat çoğunlukla enzim aktivitesi nötral ortamlarda daha aktif olarak çalışabilmektedirler. Ortamın pH'sı maksimum reaksiyon hızını, K_m değerini ve enzimin stabilitesini etkiler. Bazı durumlarda, substrat iyonik gruplar içerebilir ve ortam pH'sı substratın enzime olan afinitesini de etkiler.



Şekil 1.4. Başlangıç reaksiyon hızının pH ile değişimi.

1.4.1.3. Substrat konsantrasyonu

Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonun hızı bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar. Bundan sonra substrat konsantrasyonun artması ile reaksiyon hızı değişmez.

1.4.1.4. Enzim konsantrasyonu

Enzim reaksiyonunun hızı, genel olarak, enzim konsantrasyonu ile orantılıdır. Substrat konsantrasyonu sabit tutulup enzim konsantrasyonu arttırılırsa substratın tamamı enzim-substrat kompleksi oluşturana kadar reaksiyon hızı artar. Substrat tükendiği anda enzim reaksiyonu sabitlenir.

1.4.1.5. Zaman etkisi

Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek aksi yönde bir reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unun sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir (Güngör, 2008).

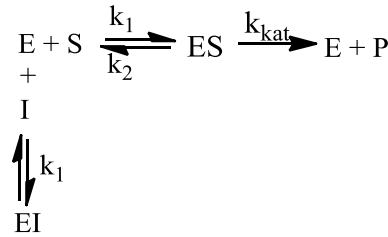
1.5. Enzim İnhibisyonu

İnhibisyon; Enzimlerin hücre içi ve hücre dışında aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması veya yok edilmesi olayına denilmiştir (Telefoncu vd., 2000).

Enzimatik reaksiyonları yavaşlatarak veya durdurarak etki eden moleküller ajanlara enzim inhibitörleri denilmiştir. Enzimler bütün hücresel süreçleri katalizlemektedirler. Bundan dolayı enzim inhibitörleri enzim aktivitesini azaltan en önemli farmakolojik ajanlar olarak bilinirler. Örneğin; aspirin bazı ağrı oluşumundaki süreçleri de içine alan prostaglandinlerin sentezindeki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder (Nelson ve Cox, 2005).

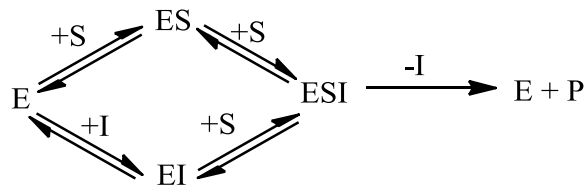
Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olarak ikiye ayrılır. Dönüşümlü inhibisyonda kendi arasında yarışmalı inhibisyon, yarışmasız inhibisyon ve yarı yarışmalı inhibisyon olarak üç kısımda sınıflandırılmıştır. Dönüşümsüz inhibitör enzime kovalent olarak bağlanırlar veya birbirinden ayrılması zor kompleks oluştururlar. Asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonuna bir örnek olarak verilebilir.

Dönüşümlü inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Yarışmalı inhibitörler genellikle substrat benzeri yapılardır ve enzim aktif bölgesi substrat ile yarışma halindedir (Kargı ve Schuler 1992).



Şekil 1.5. Yarışmalı enzim inhibisyonu.

Yarışmasız inhibitörler yapısal olarak substrata benzemezler. Bu inhibitörler, enzimin aktif bölgeleri yerine farklı bölgelere bağlanarak enzimin substrata olan afinitesini düşürürler.

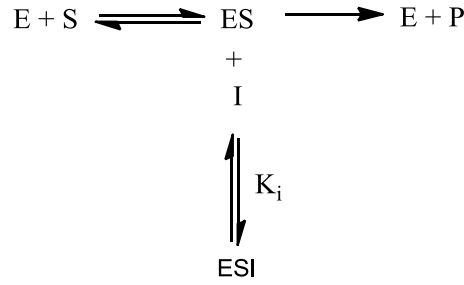


Şekil 1.6. Yarışmasız inhibisyon.

Bağlanmanın enzimin aynı bölgesinde olmadığından yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek göstermektedir. Substrat ile inhibitör arasında yarışma söz konusu olmadığından substratın konsantrasyonunu arttırmakla

inhibisyon etkisi kaldırılmaz. Enzimin $V_{\max}$ değeri azalırken K_m sabit kalır. ESI'dan I dönüşümlü olarak ayrışabildiğinden yine ürün meydana gelir fakat katalizleme de yavaşlama olur.

İnhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanıyorsa bu tip dönüşümlü inhibisyona yarı yarışmalı inhibisyon denilmektedir.



Şekil 1.7. Yarı yarışmalı inhibisyon.

Yarı yarışmalı reaksiyon inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun artmasıyla inhibisyonun artabileceğini gösterilmiştir. Buradan da inhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_m azalır ve ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından $V_{\max}$ da düşebilmektedir (Akbulut vd., 2014).

1.6. Enzim Aktivitesi

Enzimlerin miktar ölçümleri yerine aktivite ölçümlerinin yapılma nedenleri ortamda çok az miktarda bulunmalarıdır.

Enzimler tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyon hızının enzim etkisiyle optimum koşullarda belli sürede ürüne dönüştüren substrat miktarına enzim aktivitesi denilmiştir.

Aktivitesi veya etkinliği fazla olan bir enzim, belli sürede çok miktarda substrat molekülünü ürün haline dönüştürür.

Enzim aktivite birimi IU olarak ifade edilmiştir. 1 IU enzim aktivitesi, optimum koşullarda bir dakikada $1\mu\text{mol}$ substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder. Buda 1 saniyede $16,67\text{ nmol}$ substratın ürüne dönüştürülmesine karşılık gelir.

Enzim aktivitesi bazende katal olarak da ifade edilir. Bir katal enzim aktivitesi ise optimum koşullarda 1 saniyede 1mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder. Bu da $6,10^7$ IU enzim aktivitesine denk gelmektedir.

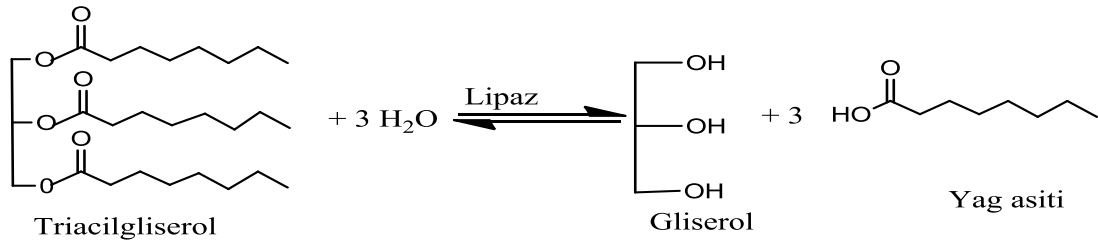
Enzim aktivitesi, spesifik aktivite olarak ifade edilip 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesine spesifik aktivite denilmiştir.

Enzim ünitesi (EU) ise optimumal şartlarda, 1 dakika 1 μ mol substrat ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Güngör, 2008).

2. LİPAZLAR

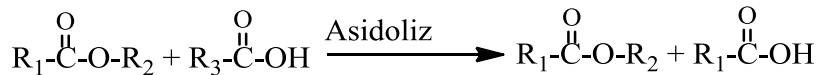
Lipazlar (EC. 3.1.1.3, triaçilgliserol açilhidrolazlar), pek çok alanda uygulaması ve endüstriyel potansiyeli olan önemli hidrolitik enzimlerdir. Lipazlar, Uluslar arası Biyokimya Birliği Enzim Komitesince belirlenen enzim sınıflandırılmasında hidrolazlar (EC.3), ester bağlarını parçalayanlar (EC.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (EC.3.1.1) ve triaçilgliserol hidrolazlar (EC.3.1.1.3) içinde yer almaktadır (Anonim, 1992).

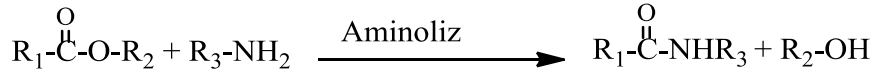
Lipazlar yağ-su ara yüzeyinde triaçilgliserollerin hidrolizini katalizleyerek di ve mono açilgliserollere ve gliserole dönüştürme (Veraragavan, 1990; Mogensen, 2005), susuz ortamda ise ester bağlarını sentezleme yeteneğine sahiptirler (Kim vd., 1996).



Şekil 2.1. Yağların oluşum mekanizması.

Lipazın, trigliseritler üzerindeki hidrolitik aktivitelerinin yanı sıra, esterifikasyon, interesterifikasyon, asidoliz, alkoliz ve aminoliz gibi reaksiyonları da kataliz etme yetenekleri vardır (Houde vd., 2003).





Lipazların katalizlediği reaksiyonların özet halinde gösterimi (Rahman vd., 2006).

2.1. Lipazların Kullanım Alanları

Lipazlar yağların işlenmesinde, gıda, deterjan, deri, farmasotik, kağıt, medikal sektör, kozmetik ve parfüm endüstrisinde, biyodizel üretiminde, organik madde sentezinde, biyosensör, su ortamında oluşan biyolojik dönüşümler gibi birçok farklı alanlarda kullanılmaktadır.

2.1.1. Lipazların gıda endüstrisinde kullanımı

Katı ve sıvı yağlar gıdaların önemli bileşenlerindendir. Trigliseritlerin fiziksel özellikleri, besin değeri ve lezzeti; gliserol omurgasındaki yağ asidinin konumundan, zincir uzunluğundan ve doygunluk derecesinden etkilenirler. Lipazlar, gliserol omurgasındaki yağ asiti zincirinin konumunu değiştirerek, lipidlerin özelliklerinin değişimine olanak sağlar. Göreceli olarak ucuz olan bu yöntem, yağın daha değerli bir yağa dönüşümüne olanak sağlar (Sharma vd., 2001).

Kakao yağı, palmitik ve stearik asitleri içeren değeri yüksek bir yağ; erime noktası yaklaşık 37°C'dir. Kakao yağının ağızda erimesi çikolata gibi ürünlerde istenen bir özelliktir. Hidroliz ve sentez reaksiyonlarını içeren lipaza-dayalı teknolojide, daha az istenen bazı yağları kakao yağını geliştirmek için kullanılmaktadır (Colman ve Macrae, 1980; Undurraga ve ark., 2001). Bu prosesin bir versiyonu, palmye yağındaki palmitik astin stearik asit ile yer değiştirmesini sağlayan transesterifikasyon reaksiyonunda immobilize *Rhizomucor miehei* lipazını kullanılmaktadır. Benzer şekilde tereyağının lipaz katatizörlü interesterifikasyonu ile uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin yerine doymamış yağ asitlerinin geçmesi de sağlanmaktadır (Sharma vd., 2001).

Lipazlar peynir olgunlaşmasında, fırıncılık ürünlerinde ve meşrubatlarda tat gelişiminde et ve balık ürünlerinden yağın uzaklaştırılmasına yardımcı olarak kullanılmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998).

Lipazlar, içkide katkı maddesi, peynirin mayalamasında lezzet arttırıcı, et ve balık ürünlerinden yağların uzaklaştırılmasında yardımcı olarak kullanılmaktadırlar (Kazlauskas vd., 1998; Kumar vd., 2005).

2.1.2. Lipazların deterjan endüstrisinde kullanımı

Lipazlar yağları hidrolizleme yeteneklerinden dolayı, endüstride ve ev deterjanlarında katkı maddeleri olarak önemli bir kullanıma sahiptirler. Deterjanlarda kullanılan lipaz enziminin avandajları şunlardır:

- 1) Düşük bir substrat spesifitesi yani yağları çeşitli bileşimlerinden hidroliz edebilme yetenekleri
- 2) Yüksek pH (10-11) ve yüksek sıcaklıklara dirençli olması
- 3) Zarar verici surfaktantlara ve enzimlere dayanabilme yeteneğine sahip olması

Bu üç madde deterjan sanayisinde çok önemli olduğundan lipazlar deterjan sanayisinde daha da önem kazanmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998; Cardenas vd., 2001).

2.1.3. Lipazların kağıt endüstrisinde kullanımı

Zift ya da odunun hidrofobik bileşenleri (başlıca trigliseridler ve vakslar), kağıt hamuru ve kağıt imalatında çeşitli problemler yol açmaktadırlar (Jaerger ve Reetz, 1998). Lipazlar, kağıt yapımında üretilen kağıt hamurundan bu ziftin uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Bunlar aynı zamanda kağıdın geri dönüşümü sırasında lipit lekelerinin uzaklaştırılmasında ve yapışkan materyallerin oluşumundan kaçınmak içinde kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999; Gutierrez vd., 2001).

2.1.4. Lipazların farmasötik endüstrisinde kullanımı

Lipazlar pestisitler, agrokimyasallar ve farmasötiklerde kiral yapı bloklarının sentezinde ve rasemik karışımların çözümünde kullanılabilirler. Bunlar stereospesifik hidrolizlerde rasemik karışımların çözünürlüğü gibi suda çözünmeyen esterlerin hidrolizlerinde kullanılmaktadırlar (Kirchner vd., 1985).

Enzimler genellikle organik solventlerde stabil değildirler ve denatüre olma eğilimindedir. Fakat lipazlar stabilizör olmaksızın organik solventlerde stabil kalabilmekte ve aktif olabilmektedirler. Organik solventlerdeki kataliz kabiliyetlerinden dolayı lipazlarla ilgili birçok yeni potansiyel biyoteknolojik uygulama tanımlanmaktadır. Bu uygulamalardan biriside kiral açıdan önemli ilaç ve ilaç ara ürünlerinin sentezidir (Schmidt ve Verger, 1998; Sharma vd., 2001). Bazı ilaçların etkinliğinde anahtar faktörü kiralitedir, bu ilaç ara bileşenlerinin tek enantiyomerlerinin üretimi gittikçe farmasötik endüstrisinde önemli olmaktadır.

Lipaz, proteaz ve bir metalik tuz içeren bir bileşim kullanarak deri, kafatası hastalıkları ve saç kaybı gibi durumları tedavi etmek için bazı yöntemler geliştirmiş ve patentleri alınmıştır (Miyazaki ve Fujikawa, 2009).

Safra kesesi fibrözü ve pankreas iltihaplanmalarını tedavi etmek için kullanılan pankreatik lipazların yerini bakteriyel lipazların alması amaçlanmıştır. Pankreatik lipazlar, lipidlerin sindirim kanalındaki absorpsiyon düzensizliklerini tedavi etmek için kullanılmakta ancak düşük pH'da ve proteaz varlığında etkinliğini kaybettiği için uygulanması sınırlıdır. Birçok bakteriyel lipaz bu yüzden pankreatik lipaza göre umut verici alternatif sunmaktadır (Sani, 2006).

2.1.5. Lipazların biyopolimerlerin üretiminde kullanımı

Poliesterler, polifenoller ve polisakkaritler gibi biyopolimerler oldukça fazla çeşitlilik ve kompleks bir yapı gösterir. Bununla beraber bu bileşikler, yenilenebilir doğal kaynaklardan üretilmeleri ve biyodegradasyona uğramaları nedeniyle büyük bir öneme sahiptirler. Lipazlar, polimerik sentez için reaksiyon koşullarında sahip oldukları yüksek seçilicilik özellikleri gösterebilmeleri nedeniyle katalizör olarak kullanılmaktadırlar (Jaeger ve Eggert, 2002).

Lipazlar ayrıca sert yüzeylerin temizlenmesinde, tek hücre proteini üretiminde, biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin, yağlama malzemesi ve kozmetiklerde biyosensör bileşeni olarak da kullanılmaktadır (Reetz, 2002; Pandey vd., 1999).

Bazı geleneksel kimyasal sentezlerle karşılaştırıldığında enzimatik işlemler daha çevre dostudur. Enzimlerin ayırım yetenekleri (substrat seçiciliği ve stereoseçicilik) diğer katalitiklerden daha büyüktür. Bu enzimler yüksek oranda saflıkta yüksek değerli ürünler üretmek için kullanılabilirler. Enzimlerin katalitik etkisi (düşük aktivasyon enerjisi sonucunda) yenilenemeyen kaynakların enerji gereksinimini azaltmaktadır (Victor vd., 1997).

2.1.6. Lipazların organik sentezde kullanımı

Organik sentezde katalizör olarak kullanılan lipazlar, substrata göre farklı etki göstermelerinden dolayı sentetik kimyada büyük avandaj sağlamaktadırlar (Ghosh vd., 1996). Lipazlar geniş bir çeşitlilik gösteren kemoselektif, regioselektif ve stereoselektif transformasyonları katalizlemede kullanılmaktadır (Rubin ve Dennis, 1997).

Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır. Bu enzimler, hidrofilik-lipofilik arayüzeyinde çalışırlar ve reaksiyon karışımındaki

organik çözücülere dayanıklıdır. Enantiyo saf bileşiklerin sentezinde lipazların kullanımını ele alınmışlar (Berglund ve Hutt, 2000).

Enzimler suda çözünmeyen trigliseridlerin hidrolizlerini su-sıvı arayüzeyinde katalizler. Reaksiyon karışımındaki su miktarı lipaz-katalizli reaksiyonun yönünü belirler. Ortamda çok az su varsa yada hiç su yoksa, sadece esterifikasyon ve transesterifikasyon tercih edilmektedir. Ortamda fazla oranda su olduğunda ise tercih edilen reaksiyon hidroliz olur (Klibanov, 1997). Süperkritik çözücülerde lipaz-katalizli reaksiyonlar bildirilir (Sharma ve ark., 2001; Salgın ve ark., 2007).

2.2. Lipaz Kaynakları

Lipaz enzimleri yaklaşık olarak bütün canlılar yani bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Bazı hayvansal lipazlar pankreatik, gastrik, pregastrik, ruminantların mide içi tarafından üretilen dilsel lipazları, balık ve omurgalıların sindirim lipazları, lipoprotein lipazları, doku lipazları ve süt lipazlarıdır. Bitkilerde lipazlar ençok yağlı tohumlarda ve daha az derecede tahıl tanelerinde bulunmaktadır (Mukherjee ve Hills, 1994) .

Lipaz üreten mikroorganizmalar geniş dağılım göstermektedirler (Godtfredsen, 1990). Mikrobiyal lipazlar bakteri, küf ve mayadan elde edilmektedir. Lipazların elde edildiği kaynak, optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık aralığını etkilemektedir (Taweel ve Sungur, 1995; Stead, 1986).

Ökaryotlarda lipazlar; yağların sindirimi, absorpsiyon, yeniden oluşum ve lipoprotein metabolizmasında dahil lipit metabolizması farklı aşamaları için gereklidir. Bitkilerde lipazlar enerji rezerv dokularında bulunur (Balashev vd., 2001).

Lipazların hayvansal ve bitkisel dokulardan elde edilmesi güçtür. Çünkü bu tür dokularda, hücrenin ya da hücre duvarının parçalanması gereklidir ve bunun için hücre parçalayıcılara ihtiyaç vardır. Bu işlemler sırasında enzimin yapısında zarar görebilmektedir (Taipa vd., 1992).

2.3. Lipaz Analiz Yöntemleri

Lipaz aktivitesinin belirlenmesi için birçok metot vardır. Lipazlar trigliseritleri hidrolize ederek serbest yağ asitleri ve gliserolün meydana gelmesini sağlarlar. Bu nedenle, bu enzimler için analiz metotları genel olarak serbest yağ asitlerinin oluşumunun analiz edilmesi şeklinde geliştirilmiştir (Jensen vd., 1983).

Lipaz enziminin analiz metotunu kendi içerisinde ikiye ayırabiliriz.

- ❖ Kalitatif analiz
- ❖ Kantitatif analiz

2.3.1. Kalitatif analiz

Mikrobiyal kültürlerin salgılamış olduğu lipaz katı besiyeri ortamında belirlenebilmektedir (Kulkarni, 2002). Bu amaçla değişik substratların kullanıldığı kalitatif analizler yapılmaktadır. Yaygın olarak Tribütirin Agar besiyeri kullanılır. Bu besiyerin substratı dört karbonlu sentetik bir trigliserit olan tribütirin ve bunun hidrolizi ile oluşan zon esteraz veya lipaz aktivitesi verir (Gao vd., 2000; Meghwanshi vd., 2006; Ertuğrul vd., 2007; Kiran vd., 2007; Cote ve Shareck, 2008).

2.3.2. Kantitatif analiz

Serbest yağ asitlerinin oluşumunu araştırmak amacıyla kantitatif olarak immünolojik metot, kromatografik prosedürler (TLC/HPLC/GC), spektrofotometrik ve titrimetrik metotlar kullanılır.

Triaçilgliseroller lipazların da doğal substratlarıdır, spektrofotometrik metotlarda bunlar substrat olarak kullanılmaktadır (Kulkarni, 2002). Bu ölçüm temel olarak p-nitrofenil esterlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda ortaya çıkan p-nitrofenol'ün 410 nm'de kolorimetrik olarak tespit edilmesine dayanmaktadır (Winkler ve Stuckmann, 1979; Kademi vd., 2000; Barbaro vd., 2001; Gupta vd., 2002; Kumar vd., 2005; Gilham ve Lehner, 2005).

Ancak kısa zincirli esterler suda çözünür ve bu nedenle bu hidroliz lipaz aktivitesinden ziyade esteraz aktivitesinin ölçülmesini sağlar. Asetat ve bütirat gibi kısa zincirli esterler esteraz aktivitesini ölçerken laurat, palmitat veya oleat gibi daha uzun zincirler lipaz aktivitesini belirlemektedir (Gilham ve Lehner, 2005). Bu nedenle p-nitrofenil palmitat lipaz aktivitesini lipaz aktivitesinin ölçülmesi için yaygın olarak kullanılmıştır.

Lipaz aktivitesinin kantitatif ölçümünde spektrofotometrik yöntemin dışında, lipaz aktivitesi sonucu ortamda oluşan yağ asitlerinin meydana getirdiği pH değişim ölçümüne dayalı zeytinyağı emülsiyon yöntemi (Omar vd., 1987; Kanwar ve Goswami, 2002; Kulkarni ve Gadre, 2002), pH-stat yöntemi (Kambourova vd., 2003) gibi titrasyon yöntemleri kullanılır.

3. ÇAM FISTIĞI BİTKİSİ VE ÖZELLİKLERİ

3.1. Çam Fıstığı (*pinus pinea* L.) Türünün Özellikleri

Pinaceae familyasında yer alan Çam fıstığı (*pinus pinea*) Ege, Akdeniz sahilleri, Portekiz, İspanya, İtalya, Girit ve Türkiye’de yayılış gösteren çam türü ağaçtır (Anşin ve Özkan 1997).

Çam fıstığı bir evcikli olup, tozlaşma rüzgarla gerçekleşmektedir. Boyları 20-25m diğer çam türlerinden kolaylıkla ayırt edilebilen şemsiye görünümündür. Gövdesi önce pulsu yapıda olup kahverengi kırmızı, sonra kırmızımtırak gri, kalın kabuğu derin çatlaklıklara sahiptir. Reçinesiz tohumlar 7-20mm büyüklüğünde yumurta şeklinde ve sivridir. Tomurcuk pullarının uçları geriye doğru kıvrılmıştır. Genç sürgünler önceleri koyu yeşil sonraları sarımtırak kahverengi renge dönüşmektedir (Kayacık, 1980; Anşin ve Özkan, 1993; Yaltırık, 1993). İğne yapraklar 10-20 cm uzunluğunda parlak, batıcı, sivri uçlu ve kenarları dişli olup, açık yeşil renktedir. Yaprakların her iki yüzünde stoma çizgisi vardır. Erkek çiçekler uzun ve silindirik şeklindedir. Terminal durumlu dişi çiçekler teker teker, bazende 2-3 adeti bir arada bulunmaktadır. Kozalaklar 15cm uzunluğunda, 12cm genişliğinde, çok kısa saplı sürgüne hemen hemen oturmuş gibidir. Kozalaklar olgunlaşmasını üç yılda tamamlamaktadırlar. Kozalağın iç kısımlarında 1,5-2 cm büyüklüğünde tohumları bulunmaktadır. Çam fıstığı ağacının kök sistemi, uygun topraklarda derine inen kazık köke sahiptir. Bu nedenle, deniz rüzgarına karşı derin kökleri ve geniş tepeleri ile önemli ölçüde karşı koyabilmektedir (Anşin ve Özkan, 1993; Yaltırık, 1993).



Şekil 3.1. Çam fıstığı kozalağı ve tohumları.

3.2. Çam Fıstığından Yararlanma Olanakları

Çam fıstığının odun, kabuk, reçine, kozalak ve tohum kısmından yararlanılmaktadır. Halk arasında çam fıstığı olarak adlandırılan tohumları besin maddesi bakımından zengin olup ağırlıklı olarak gıda sanayisinde kullanılmaktadır. Bergama-Kozak yöresine ait çam fıstığı tohumlarının besin değerinin ve kimyasal kompozisyonun %50 nem, %45 kül, %44,9 yağ, %31,6 ham protein, %5,15 toplam çözünebilir şeker ve 583kcal/100g ihtiva ettiği bilinmektedir. Tohumlarında potasyum, fosfor ve magnezyum mineralleri oldukça yüksek miktarda, Ca, Na, Mn, Zn ve Cu mineralleri az miktarda bulunur. Tohumlar yüksek miktarda B1 ve B2 vitamini bulunurken, C vitamini ise az miktarda bulunur, içerisindeki yağ oranı ise %85'den fazlasını oleik ve linoleik asit oluşturduğu için doymamış yağ asitlerince zengindir. Bu özellikleri ile çam fıstığının, iyi bir besin kaynağı olması yanında, insan sağlığı açısından da oldukça faydalıdır (Nergiz ve Dönmez, 2004).



Şekil 3.2. Çam fıstığı tohumunun iç kısmı.

Fıstık çamının odunu sarıçam (*Pinus sylvestris* L.) ve Anadolu karaçamı (*pinus nigra*) gibi teknolojik özellikleri bakımından fazla değerli değildir. Reçinesi ise boya sanayisinde çözücü madde olarak kullanılmakta fakat reçinesi kaliteli değildir. Fıstıkçamı güzel bir park ağacıdır. Kumul alanların stabilizasyonunda, rüzgar perdesi tesislerinde ve toprak koruma amaçlı ağaçlandırmalarda kullanılmaktadır (Yaltırık, 1988; Anşin ve Özkan 1997).

Çam fıstığının kozalak veriminden düşen ağaçlar kesilerek gençleştirme çalışmaları yapılmaktadır. Bu sırada ortaya çıkan kabuklar atık durumundadır. Son yıllarda dünyada ağaç kabukları biyobazlı doğal maddelerin üretimi için gerekli olan önemli yenilenebilir hammadde kaynakları olarak görülmektedir. Çam fıstığı kabukları da bu kapsamda yenilenebilir hammadde kaynakları olarak değerlendirilmektedir (Fengel ve Wegener 1984).

Kabuğun önemli bileşenlerinden biri de tanenlerdir. Tanenler çok eski zamanlardan beri bilinen ve dericilikte sepi maddesi olarak kullanılan makromoleküllü bileşiklerdir. Hayvan

derisinde bulunan proteini çöktürerek derinin bozulmayan, esnek ve bakteri etkilerine karşı stabil hale getirilmesi tanenlerle sağlamaktadır (Bisanda ve ark. 2003).

Çam fıstığı halkın ihtiyaçları için bitkisel ilaçlarda; antiviral, antimikrobiyal ve antikanserojen etkileri nedeni ile tıpta ve farmakolojide doğal hammadde olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında boya endüstrisinde, bira ve şarabın berraklaştırılmasında da tanenlerden yararlanılmaktadır. Doğal ve yenilenebilir biyokütle kaynaklarının özellikle kimya sanayisinde her geçen gün kullanımı artmaktadır (Bisanda ve ark, 2003).

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan kimyasallar

Metanol, asetik asit, aseton, amonyum sülfat, gum arabik, 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, Coomassie Brilliant Blue R250, Coomassie Brilliant Blue G250, Sigma-Aldrich, Merck ve Fluka firmalarından temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan çam fıstığı tohumu ve zeytinyağı ise piyasadan temin edilmiştir.

4.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

❖ Peristaltik Pompa	: Ismatec RegloDigital
❖ pH Metre	: SCHOTT Lab850
❖ Vortex	: Heidolp ReaxTop
❖ Soğutmalı Santrifüj	: Sigma K30
❖ Isıtıcılı 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

4.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- 1) 0,1 M Ph 7,0 fosfat tamponu için; 5,4603 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sodyumdihidrojenfosfat) tartıldı. pH'ı 1,0 M NaOH ile 7,0 ye ayarlandı. Hacmi 350 mL tamamlandı.

- 2) %10'luk gum arabic için; 18 g gum arabic tartıldı ve 180 ml suda çözüldü. Üzerine 21 mL zeytinyağı ve 15 g buz ilave edildi.
- 3) Sodyumdeoksikolat için; 0,8 g sodyumdeoksikolat tartıldı ve 50 mL saf suda çözüldü.
- 4) Tris için; 0,6058 g tris tartıldı. pH'sı 7,0 olarak 1 M HCl ile ayarlandı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- 5) 0,05 M NaH_2PO_4 tamponu için; 15,601 g NaH_2PO_4 tartıldı ve 1,0 M NaOH ile pH 7,0 ayarlandı hacmi 2000 mL'ye ayarlandı.
- 6) 1,0 M Tris-HCl pH 8,8 için; 12,114 g tartıldı ve yaklaşık 60 mL de çözüldükten sonra pH 8,8'e 1,0 M HCl ile ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye ayarlandı. 4°C'de muhafaza edildi.
- 7) 1,0 M Tris-HCl pH 6,8 için; 12,114 g tartıldı ve yaklaşık 60 mL de çözüldükten sonra pH 6,8'e 1,0 M HCl ile ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye ayarlandı. 4°C'de muhafaza edildi.
- 8) 6X Numune yükleme çözeltisi için; %60 griserol, 300 mM Tris-HCl pH 6,8, 12 mM EDTA, %12 SDS, 864 mM β -merkaptoetenol ve %0,05 bromofenol blue. 10 mL hazırlamak için; 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 birbirine ilave edilerek 6X numesi hazırlandı.
- 9) %40 Akrilamid için; 19,48 g akrilamid, 0,52 g bis-akrilamid 50 mL son hacimde çözüldü.
- 10) %10 Amonyum persülfat için; 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 ve %10 asetik asit birbiri içine eklendi.
- 13) Yıkama çözeltisi için; %10 metanol, %7 asetik asit olacak şekilde hazırlandı.
- 14) 0.01 NaOH çözeltisi için; 0,1 g NaOH tartıldı ve hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

4.2. Metodlar

4.2.1. Çam fıstığı tohumunun seçilmesi ve yağsızlaştırma işlemi

Materyal olarak kullanılan çam fıstığı tohumu, Antalya bölgesinden ticari olarak temin edilmiştir. Daha sonra 100g çam fıstığı tohumu blender yardımıyla iyice öğütülerek homojenize haline getirilmiştir.

Homejenize haline getirilen çam fıstığı tohumunda bulunan proteinlerden yağın uzaklaştırılması amacıyla uygulanan işleme yağsızlaştırma işlemi denilmiştir.

Çam fıstığı tohumundan yağların uzaklaştırılması için uygun çözücü olarak soğuk aseton kullanılmıştır. Bu işlem soğuk bir ortamda (4°C’de) 30 dakika boyunca buz banyosunda karıştırıcıda karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.

Yağsızlaştırma işlemi sonunda elde edilen homojenat çeker ocakta kurutularak aseton kokusu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bir beher içerisine konularak üzerine 1:6 (v/w) oranında 0,1M fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edilerek 12 saat boyunca buz dolabında karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Böylece enzimlerin çözeltiye geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra süzgeç kağıdı ile süzülerek süpernatant kısmı amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi için ayrılmıştır.

4.2.2. Aktivite tayin yöntemi

Homojenatla amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra hazırlanan %10’luk gum arabic’den 10 mL, sodyumdesikolat’dan 2 mL ve 0,05M tris tamponun’dan 4 mL ilave edilerek birbirine karıştırıldı. Sıcaklık 37°C sabitlendi ve pH 7’ye ayarlandı. Üzerine 1 mL enzim ilave edildi ve 5 dakika boyunca pH’ın düşmesi beklendi. Süre bittikten sonra 0,01 M NaOH ile pH 7,0’ye ayarlandı ve harcanan NaOH miktarı kaydedildi.

4.2.3. Lipaz enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Çam fıstığı (*Pinus pinea*) tohumunda bulunan lipaz enzimin homojenatının uygun doyumluk noktasının belirlenmesi amacıyla %0-10, %10-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80 ve %80-90 doyumluklarında çöktürme işlemi yapılmıştır. Her defasında çökelekte ve süpernatantta hidrolitik spesifik aktivitelerine bakılmıştır. Lipaz enzimin aktif olduğu aralıklar tespit edilmiştir. Çam fıstığı tohumunun aktif olduğu hidrolitik spesifik aralığı %60-90 amonyum sülfat doyumluğunda çökelekte olduğu bulunmuştur.

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş ilave edildi ve her defasında daha önce kalan (NH₄)₂SO₄’ın çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapılmıştır. Çöktürme işlemi sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$M[(NH_4)_2SO_4] = [1,77 \times V \times (S_2 - S_1)] / (3,54 - S_2)$$

$$M = \text{Katı Amonyum sülfat miktarı (g)}$$

$V = \text{Çözeltinin hacmi (mL)}$

$S_1 = 1$ 'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

$S_2 = 1$ 'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda en yüksek hidrolitik sefesifik aktivitedeki %60-90 doygunluğundaki çökelek diyaliz torbasına hava kabarcığı kalmayacak bir şekilde yerleştirildi. Hazırlanmış diyaliz torbası önceden hazırlanmış 0,05 M fosfat tamponu (pH 7,0) içerisine yerleştirildi. Diyaliz işlemi + 4°C'de içerisinde buz banyosunda 24 saat süreyle ve sekiz saatte bir tampon değiştirilerek gerçekleştirilmiştir.

4.2.4. Sephadex G-100 jel hazırlanması ve jel filtrasyon kromatografisi

2 g Sephadex G-100 100 mL, 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu içerisine konularak yarım saat karıştırılıp dekande edildikten sonra 24 saat bekletilmiş ve kolona yavaş yavaş eklenerek aktarılmıştır. Kolon iyice dengelene kadar tampon geçirilmiştir. Diyalizden alınan homojenat kolona yüklenmiştir. Kolona yavaşça fosfat tamponu eklenerek eluatlar kolondan üçer mL'lik fraksiyonlar halinde tüplere toplanmıştır.

4.2.5. Saflaştırılan proteinlerin SDS-PAGE ile karakterizasyonu

Elektroforez yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlediği bir tekniktir. Saflaştırmada kullanılan en yaygın yöntemdir. Akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bis akrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve örnekler bu jel üzerinden yürütülmüştür.

%12'lik ayrıştırma jeli üzerine %3,75'lik yığma jeli ilave edilmiştir. Numuneler kuyuya yüklendikten sonra 100V'da yaklaşık 150 dk'da yürütülmüştür. Boyama için; %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250 çözeltisi hazırlanmıştır. Yıkama için; %10 metanol ve %7'lik asetik asit içeren renksizlendirme çözeltisi hazırlanmıştır. Jel tamamen temizleninceye kadar yıkamalar tekrarlanmıştır.

4.2.6. Optimum pH çalışmaları

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerlerini belirlemek amacı ile 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 tamponların hangisinde yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

4.2.7. Optimum sıcaklık çalışmaları

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C’lerde 13 farklı deneme yapılmıştır. Bu denemelerin sonunda en yüksek hidrolitik aktiviteyi veren sıcaklık belirlenmiştir.

4.2.8. Depo kararlılığının tayini

Jel kromatografisi sonucunda toplanan enzimlerden yüksek hidrolitik spesifik aktivite gösteren enzimleri bir araya toplayarak havuz sistemi oluşturulmuştur. Buzdolabında 4°C’de çalışma boyunca saklanmıştır.

Optimum pH ve optimum sıcaklık dikkate alınarak birer gün arayla 5 gün boyunca oluşturulan havuz sistemindeki enzimin aktivite tayini yapılmış ve depo kararlılığı belirlenmiştir.

4.2.9. Stabil-pH çalışmaları

Jel kromatografisi işlemi sonunda hidrolitik spesifik aktivite değerleri birbirine yakın olan tüpleri bir araya toplayarak havuz sistemi oluşturulmuştur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği stabil pH değerlerini belirlemek amacı ile pH 4-5,6 arasında 0,1M’lık sodyumasetat tamponu hazırlanmıştır. Bu tamponlar ile havuzdan alınan enzimlerin aktivite ölçümleri birer gün ara ile bakılmıştır. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil olduğu pH değeri belirlenmiştir.

4.2.10. Stabil-sıcaklık çalışmaları

Jel kromatografisi işlemi sonunda hidrolitik spesifik aktivite değerleri birbirine yakın olan tüpleri bir araya toplayarak havuz sistemi oluşturulmuştur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği stabil sıcaklığı belirlemek için 5, 20, 30, 40, 50°C sıcaklıklarda 5 farklı deneme yapılmıştır. Bu denemelerin sonunda en yüksek aktiviteyi veren stabil sıcaklık belirlenmiştir.

4.2.11. K_m ve V_{max} değerleri

Enzimatik reaksiyonun hızının maksimum hızın yarısına eşit olduğu andaki substrat konsantrasyonuna K_m denir ve K_m sabit bir değer değildir. K_m substratın, sıcaklığa ve pH’a, bağlı bir değerdir.

Jel kromatografisi sonunda birbirine yakın yüksek hidrolitik spesifik aktivite gösteren enzimlerden havuz sistemi oluşturuldu. K_m ve V_{max} kinetik sabitlerinin bulunması amacıyla substrat olarak kullanılan trioleinin farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100, 200, 500 μ L), sabit hacimlerde havuzdaki enzimleri kullanılarak aktivite tayini yapılmıştır.

Hız değerleri ile substrat konsantrasyonu arasında çizilen Michaelis-Menten grafiği yardımıyla K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

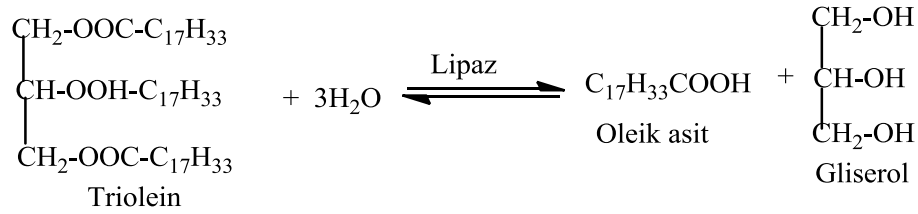
5.1. Sonuç

5.1.1. Çam fıstığı tohumu lipazının hidrolitik aktivitesinin tayini

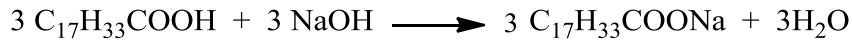
Lipazın hidrolizlediği yağ asitlerinin, NaOH ile titrasyonuna dayanan titrimetrik bir yöntem kullanılarak enzimin hidrolitik aktivitesini tayin edilmiştir (Nasa, 1988).

Aşağıda, bir triaçilgliserol olan trioleinin lipaz ile katalizlendiği hidroliz reaksiyonu ve lipazın trioleinden hidrolizlediği oleik asidin NaOH ile reaksiyonu görülmektedir.

Triolein hidroliz reaksiyonu:



Titrasyon reaksiyonu:



Titrimetrik yöntemle lipaz aktiviteleri belirlenen homojenat ve jel filtrasyon sonrasındaki elüatın enzimatik aktivite değerleri Çizelge 5.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Çam fıstığı tohumu lipazının saflaştırma basamaklarında aktivite değişimi.

Saflaştırma Basamağı	Aktivite (EU/ml)	Spesifik Aktivite (EU/mg.protein)
Homojenat	12	2,46
Jel fraksiyon	15,2	3,114

Çizelge 5.1’de görüldüğü gibi saflaştırma basamaklarında en yüksek hidrolitik spesifik aktiviteyi jel fraksiyonu göstermiştir. Ham ekstrakt çözeltisine göre enzim aktivitesi yaklaşık 3,114 kat artmıştır.

5.1.2. Çam fıstığı tohumunun lipazının saflaştırma basamakları

Titrimetrik yöntemle lipaz aktiviteleri belirlenen homojenat ve jel filtrasyondan elde edilen elüatın enzimatik aktivite değerleri çizelge 5.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2. Çamfıstığı tohumu lipazının saflaştırma basamakları.

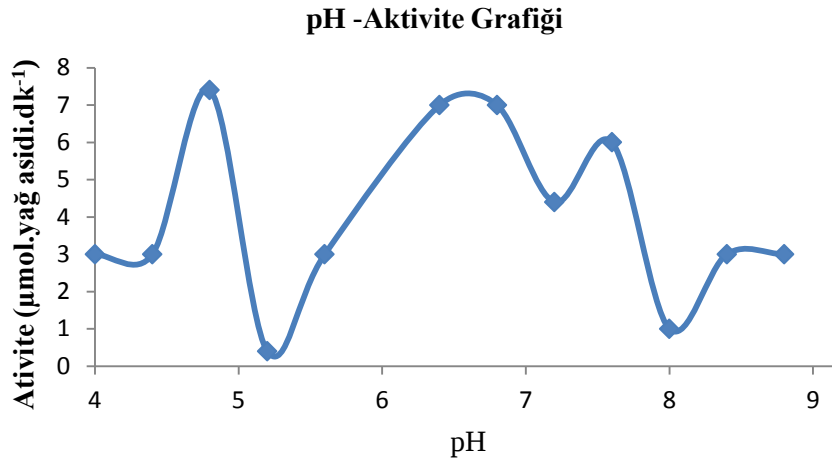
İŞLEM	Aktivite (EU/ml)	Toplam Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)
Homojenat	12,0	205	4,88	1000,4	2460	2,46
Sephadex G-100	15,2	3	4,88	14,64	45,6	3,114

5.1.3. Çam fıstığı tohumunun 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 asetik asit 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 sodyumbihidrojenkarbonat tamponları pH 11,6-12,0-12,4-12,8 ve 13,2 0,1 M sodyumhidrojenfosfat tamponları hazırlandı. Jel filtrasyon kromatografisinde hidrolitik sfesifik 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 4,8 sodyum asetat olarak belirlendi (Çizelge 5.3 ve Şekil 5.1).

Çizelge 5.3. Çam fıstığı tohumu lipazının optimum pH değerleri.

PH	Aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi.dk}^{-1}$)	PH	Aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi.dk}^{-1}$)
4	3,0	7,2	4,4
4,4	3,0	7,6	6,0
4,8	7,4	8	1,0
5,2	0,4	8,4	3,0
5,6	3,0	8,8	3,0
6,4	7,0	9,2	0,0
6,8	7,0		



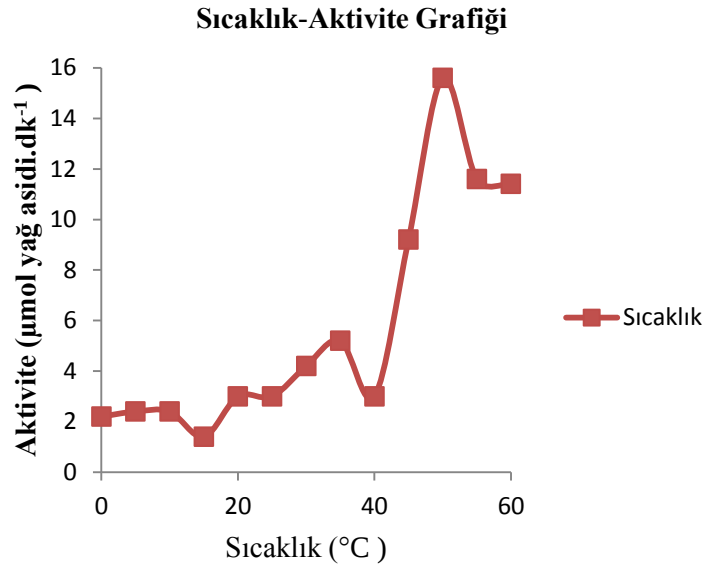
Şekil 5.1. Çam fıstığı tohumunun optimum pH'sı.

5.1.4. Çam fıstığı tohumu lipazının optimum sıcaklığının belirlenmesi

Çam fıstığı tohumunun kolondan toplanan en yüksek aktivitedeki eluveleriden havuz oluşturulup 0-60°C aralığında pH 7,0'de lipazı aktivitesi ölçüldü ve bu ölçümlerin sonunda en iyi hidrolitik spesifik aktivite sıcaklığı 50°C olarak belirlendi (Çizelge 5.3. ve Şekil 5.2.).

Çizelge 5.4. Çam fıstığı tohumu lipazının optimum sıcaklık değerleri.

Sıcaklık (°C)	Hidrolitik Spesifik Aktivite (μmol yağ asidi.dk ⁻¹)
0	2,2
5	2,4
10	2,4
15	1,4
20	3,0
25	3,0
30	4,2
35	5,2
40	3,0
45	9,2
50	15,6
55	11,6
60	11,4



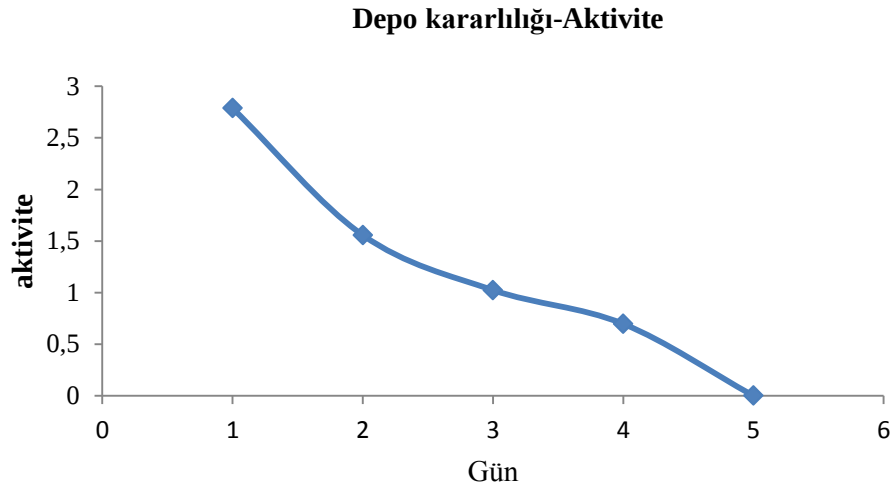
Şekil 5.2. Sıcaklığın çam fıstığı tohumunun lipaza etkisi.

5.1.5. Çam fıstığı tohumunun lipaz enziminin depo kararlılığının belirlenmesi

Çam fıstığı tohumu 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 dört gün boyunca optimum sıcaklık ve optimum pH’da depolama kararlılığı için aktivite tayini yapıldı (Çizelge 5.5. ve Şekil 5.3)

Çizelge 5.5. Çam fıstığı tohumu lipazının depo kararlılığı.

Zaman (Gün)	Spesifik Aktivite (U/dk.mg enzim)
1	2,787
2	1,557
3	1,024
4	0,697
5	0,000



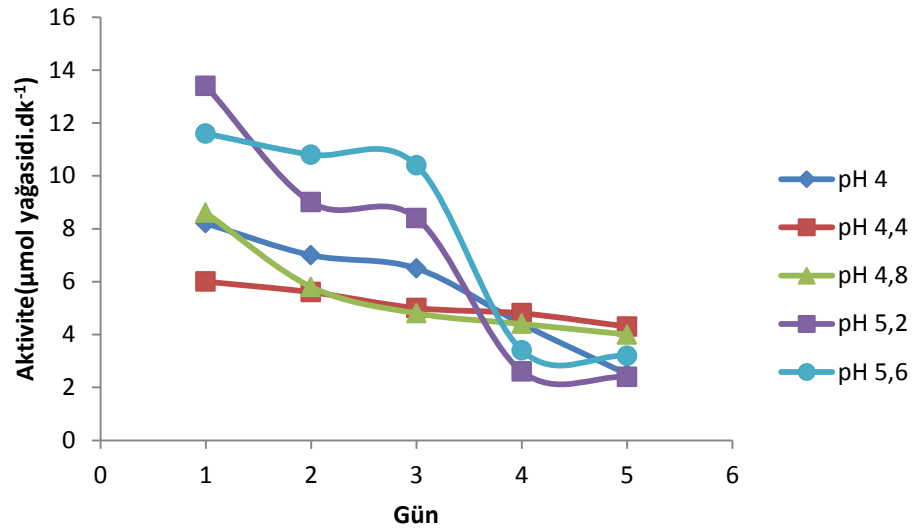
Şekil 5.3. Çam fıstığı tohumu lipazının depo kararlılığı.

5.1.6. Çam fıstığı tohumunun lipaz enziminin stabil pH aktivitesi

Çam fıstığı tohumunun stabil pH'ı belirlemek için sodyum asetat tamponu 0,1M'da PH;4,0- 4,4- 4,8-5,2- 5,6 olan tamponlar hazırlanıp beş gün boyunca optimum sıcaklıkta aktivite bakıldı. Stabil pH'ın 5,2 olduğu belirlendi.

Çizelge 5.6. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil pH aktivitesi.

pH/Gün	Aktivite($\mu\text{mol yağ asidi. dk}^{-1}$)				
	4,0	4,4	4,8	5,2	5,6
1	8,2	6,0	8,6	13,4	11,6
2	7,0	5,6	5,8	9,0	10,8
3	6,5	5,0	4,8	8,4	10,0
4	4,4	4,8	4,4	2,6	3,4
5	2,5	4,3	4,0	2,4	3,2



Şekil 5.4. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil pH aktivitesi.

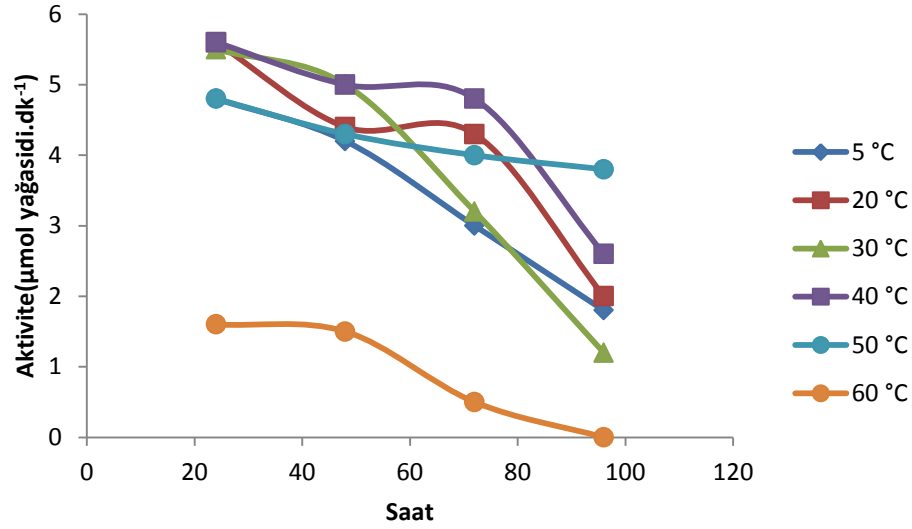
5.1.7. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil sıcaklığının belirlenmesi

Çam fıstığı tohumunun stabil sıcaklığını belirlemek için enzim aktivitesi yüksek olan eluventlerden havuz sistemi oluşturularak 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 sıcaklıklarda 6 farklı deneme yapıldı. Bu denemelerin sonunda en yüksek hidrolitik aktiviteyi veren stabil sıcaklık 50°C olarak belirlendi (Çizelge 5.7. ve Şekil 5.5.).

Çizelge 5.7. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil sıcaklık aktivitesi.

Sıcaklık (°C)/saat	Aktivite (μmol.yağasidi.dk ⁻¹)					
	5	20	30	40	50	60
24	4,8	5,6	5,5	5,6	4,8	1,6
48	4,2	4,4	5,0	5,0	4,3	1,5
72	3,0	4,0	3,2	4,8	4,0	0,5
96	2,8	2,0	1,2	2,6	3,8	0,0



Şekil 5.5. Çam fıstığı tohumu lipazının stabil sıcaklık aktivitesi.

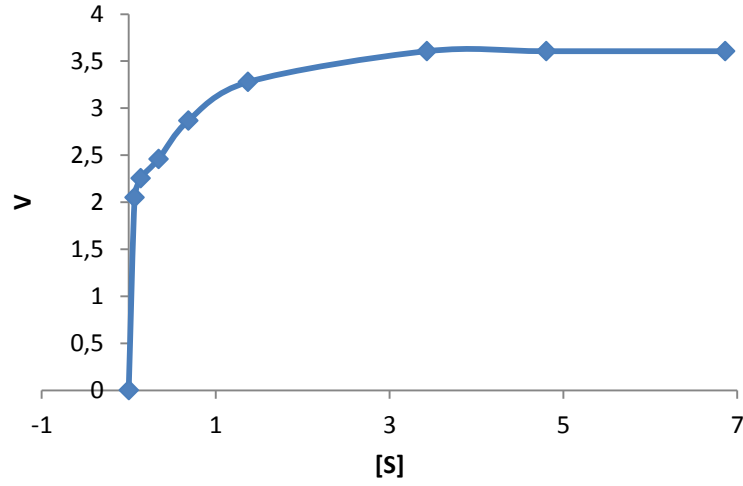
5.1.8. Lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Çam fıstığı tohumu lipazına uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla trioleinin 10, 20, 50, 100, 200, 500 μ l'lık konsantrasyonlarında denemeler yapıldı ve uygun derişim belirlendi.

Çizelge 5.8. Çam fıstığı tohumu lipazının değişik substrat konsantrasyonlarında enzim aktiviteleri.

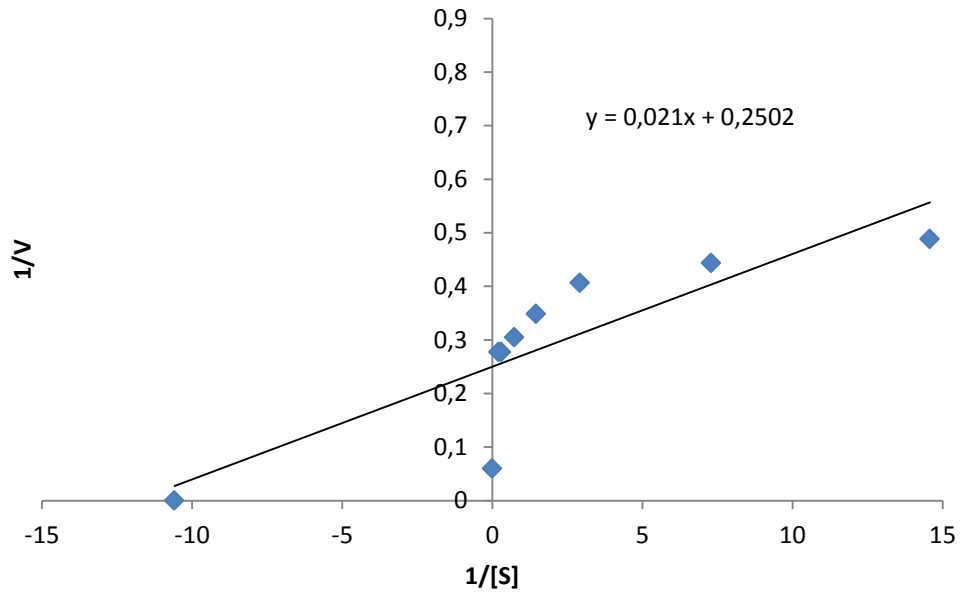
[S] (mM)	V (U/dk.mg enzim)	1/[S] ($\times 10^{-3}$) 1/(U/dk.mg enzim)	1/V ($\times 10^{-3}$) 1/(U/dk.mg enzim)
10	0,82	14,57	1,27
20	0,901	7,28	1,11
50	0,98	2,91	1,02
100	1,024	1,46	0,96
200	1,15	0,72	0,86
500	1,23	0,29	0,82

Yukarıdaki tablodan faydalanarak, substrat konsantrasyonlarına karşı reaksiyon hızları arasında Michaelis-Menten grafiğı çizildi (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. Çam fıstığı tohumu lipazının Michaelis-Menten grafiği.

K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 5.7).

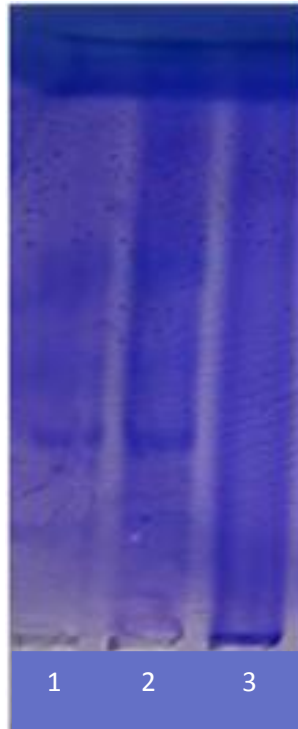


Şekil 5.7. Çam fıstığı tohumu lipazının Lineweaver-Burk grafiği.

Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla, K_m değeri yaklaşık 0,0773mM ve V_{max} değeri ise yaklaşık 1,5013U/dk.mg enzim olarak hesaplandı.

5.1.8. Çam fıstığı tohumunun SDS-PAGE ile enzimin karakterizasyonu

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



Şekil 5.8. Çam fıstığı tohumunun lipazının SDS-PAGE ile karakterizasyonu.

1. Çam fıstığı lipaz enzimi standartı
2. Çam fıstığı lipaz enzimi

Elektroforez sonucuna göre lipaz enziminin saflaştırıldığı görülmüştür.

5.2. Tartışmalar

Bu çalışma, çam fıstığı (*Pinus pinea* L.) tohumundan lipaz enziminin saflaştırılması ve çeşitli biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma üç aşamadan meydana gelmektedir.

Çalışmanın birinci kısmı; çam fıstığı tohumu lipazı ham ekstratının elde edilme aşamasıdır. Öncelikle çamfıstığı tohumu öğütme (homojenizasyon) ve kurutma işleminden

geçirildi. Daha sonra soğuk ekstraksiyon yöntemi kullanılarak proteinlerden yağların uzaklaştırılma işlemi gerçekleştirildi.

Çalışmanın ikinci kısmı; ham ekstraktan lipaz enziminin saflaştırılmasını kapsamaktadır. Amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyonu yöntemleri kullanılarak çam fıstığı tohumunun lipaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada elde edilen saflaştırılan lipaz enziminin olduğu SDS-PAGE yöntemiyle kontrol edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü kısmı; saflaştırılan lipaz enziminin maksimum katalitik performansı için, optimum reaksiyon şartlarının belirlenmesini ve kinetik sabitlerin tayini içerir. Endüstrideki sanayi kullanımı açısından önem taşıyan optimum pH, optimum sıcaklık, stabil pH, stabil sıcaklık, depo kararlılığı, K_m ve V_{max} gibi değerleri belirlenmiştir.

Bitki tohumlarında proteinlerden yağların uzaklaştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda çözücü olarak aseton (Park vd., 2000; Hird vd., 2000), hekzan (Basha, 1997; Prabhu vd.,1999), petrol eteri (Olszewski vd., 1998), kloroform-metanol (parcerisa vd.,1999) gibi farklı polaritede ve çeşitli çözücüler kullanılmıştır.

Ayçiçeği (Park vd., 2000), yer fıstığı fındık (Hird vd., 2000) ve Pamuk tohumundan lipaz enziminin saflaştırılmasında soğuk aseton yöntemi (Akbulut ve Bülbül, 2014) çam fıstığı içinde kullanılmıştır.

Çam fıstığı tohum proteinlerine amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve en yüksek hidrolitik spesifik aktivite %60-90 aralığında görülmüştür. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında elde edilen homojenat çözeltisi, fosfat tamponuna karşı diyaliz edilerek tuz uzaklaştırılmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi (Sephadex G-100 kullanılarak) lipaz enzimi hidrolitik spesifik aktivitesi 3,114 olarak bulunmuştur.

Pamuk tohumunu yağsızlaştırmak için aseton kullanılmıştır. Pamuk tohumu proteinlerine, amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış, bütün fraksiyonlarda aktivite gözlenmiş, % 50-80 amonyum sülfat doygunluğunda pamuk tohumu lipazının en yüksek hidrolitik spesifik aktivite verdiği görülmüştür. Çöktürme sonrasında elde edilen süpernatant çözeltisi, fosfat tamponuna karşı diyaliz edilerek tuz uzaklaştırılmıştır. Çalışmanın devamında uygulanan diğer pamuk tohumu lipazı bir saflaştırma yöntemi olan jel filtrasyon kromatografisi (Sephadex G-100) kullanılarak ile yaklaşık 35,2 kat saflaştırılmıştır (Akbulut ve Bülbül, 2014).

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra sülfopropil-sepharose kromatografisi ve sephadeks G-75 ile jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak palm meyvesinin lipaz enzimi 1250 kat saflaştırılmıştır (Hiol vd., 2000).

Ceviz tohumunun amonyum sülfat çöktürülmesinde en yüksek hidrolitik spesifik aktiviteyi %60-90 arasında verdiği ve 2,9 kat saflaştırılmış. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında fosfat tamponuna karşı diyaliz edilerek tuz uzaklaştırılmış lipaz enzimi aktivitesi 9,4 kat arttığını gözlenmiştir. Çalışmanın devamında jel filtrasyon kromatografisi (Sephadex G-100 kullanılarak) ile yaklaşık olarak 29 kat saflaştırılmış (Demirkan, 2008).

Araştırmacıların lipaz enzimin saflaştırması sırasında kullandıkları yöntemler yaklaşık olarak bizim çalışmalarımızı destekler nitelikte olduğu gözlenmiştir.

Çam fıstığı tohumunun lipaz enziminin spesifik aktivite tayinini belirlemek amacıyla substrat olarak zeytin yağı ve triolein kullanılmıştır. Doğal kaynaklı yağlar içerisinde en yüksek hidrolitik aktiviteyi zeytinyağı gösterdiği belirlenmiştir.

Verilerimizi daha önce yapılan çalışmalarla kıyasladığımızda *Prabhu vd. tarafından* pirinç kepeğinden saflaştırdıkları lipazın en uygun substratı olarak tribütirin olduğunu bildirilmiştir (Prabhu vd., 1999). Pirinç kepeği ile yapılan bir diğer çalışmada en uygun substrat triolein olarak belirlenmiş (Bhardwaj vd., 2001). *Bacillus Stearotherophilus* MC 7 lipazının substrat spesifitesi tayininde ise en uygun substrat tribütirin olarak belirlenmiştir (Kambourova vd., 2003). Ceviz tohumu lipazının substratı olarak triolein olarak belirlenmiş (Demirkan, 2008). Pamuk tohumu için doğal kaynaklı yağ olarak en yüksek hidrolitik aktiviteyi zeytinyağı gösterip lipaz substratı olarak triolenin olduğu belirtilmiştir (Akbulut ve Bülbül, 2014).

Çam fıstığı tohumu lipazının optimum pH'sı 4,8 olarak belirlenmiştir.

Lipaz aktivitesine etki eden pH değerleri üzerine yapılan çalışmalarda; kolza tohumu lipazının optimum pH'sı 9,0 (Hoppe ve Theimer, 1995), buğday tohumu lipazının optimum pH'sı 8,0 (Kapranichikov vd.,2004), Pamuk tohumun optimum pH'sı 10,8 olarak belirlenmiş (Akbulut ve Bülbül, 2014), ceviz tohumu lipazının optimum pH'sı 9,0 (Demirkan, 2008), Bhardwaj ve grubunun pirinç kepeği lipazı ile yaptıkları çalışmalarda optimum pH'sı 11,0 (Bhardwaj vd., 2001) olarak belirlenmişlerdir.

Genel olarak yapılan karşılaştırmalarda çam fıstığı tohumu lipaz enzimi aktivitesi optimum pH'ı diğer bitkisel kaynaklara göre asidik olduğu belirlenmiştir.

Çam fıstığı tohumu lipaz enziminin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. 50°C'ye kadar kademeli olarak artan hidrolitik aktivite 50°C'den sonra düşmeye başlamış olduğu gözlenilmiştir.

Bitkisel kaynaklı tohumlar üzerindeki araştırmalar sonucunda lipazın optimum sıcaklık değerlerinin 30-80°C arasında değişebileceği belirtilmiştir (Hiol vd., 2000). Pamuk tohumu optimum sıcaklığı 50°C olarak belirtilmiş (Akbulut ve Bülbül, 20014), ceviz tohumunun lipazı optimum sıcaklığı 70°C olarak belirlenmiştir (Demirkan, 2008).

Çamfıştığı tohumu 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 yapılan depolama kararlılığı çalışması sonucu lipaz enzimi 120 saat sonrasında enzim aktivitesi düşmüştür. Buda lipaz enziminin depolama kararlılığının düşük olduğunu gösterir.

Çam fıştığı tohumu lipaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği stabil sıcaklığı belirlemek için beş farklı sıcaklık aralığında deneme yapıldı. Bu denemelerin sonunda en yüksek hidrolitik aktiviteyi veren stabil sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir. Çam fıştığı tohumunun stabil pH’ı 4,4 olarak belirlendi.

Çam fıştığı tohumlarından saflaştırılan enzimlerin Linewear-Burk grafikleri K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Triolein kullanılarak bulunan değerler $K_m=0,0773$ ve $V_{max}=1,5013U/dk.mg$ enzim olarak bulunmuştur.

Farklı çalışmalardan lipaz enzimi için elde edilen K_m ve V_{max} değerleri; pirinç kepeği lipazının triolein için K_m değeri 6.71 mM (Bhardwaj vd. 2001), *Bacillus stearothermophilus* MC 7 lipazının p-nitrofenil palmitat için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.33mM ve 188 U/dk.mg enzim Kambourova vd., 2003) ve *Aspergillus niger* F044 lipazının K_m ve V_{max} değerleri ise 7.37 mM ve $25.91 \times 10^{-3}U/dk.mg$ (Yu vd., 2007), ceviz tohumunun triolein için K_m değeri 48mM ve V_{max} değeri ise $23.06 \times 10^{-3} U/dk.mg$ enzim olarak bulunmuştur (Demirkan., 2008), pamuk tohumunun enzimi triolein için K_m değeri 17,5178 mM ve V_{max} değeri ise yaklaşık 9,5192 U/dk.mg enzim olarak bulunmuştur (Akbulut ve Bülbül, 2014).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akbulut, N. Bülbul, M. (2014), "Pamuk tohumundan (*Gossypium hirsutum* L.) lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu," Dumlupınar üniversitesi Fen-Bilimler Enst. Y. Lisans Tezi Kütahya.
- Aktaş, N., Çiçek, H., Taspınar, A., Kibar G., Kolankaya, N., Tanyolaç, A., (2001), Reaction Kinetics For Laccase Catalyzed Polymerization Of Catechol. *Bioresource Technology*, 80,29-36.
- Aktaş, N., (1999), 1-Naftol'un enzimatik polimerizasyonun ve reaksiyon kinetiginin incelenmesi. Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Anonim, (1992), "Enzyme Nomenclature, Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB)", California.
- Anşin, R., Özkan, Z. C., (1997), Tohumlu bitkiler (Spermatophyta) odunsu taksonlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, K.T.Ü. Yayın No:167, O.F. Yayın No: 19, Trabzon.
- Balashev, K., Jensen, T. R., Kjaer, K., Bjørnholm, T. (2001), Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie*, 83, (5): 387–397.
- Barbaro, S. E., Trevors, J. T., Inniss, W. E., (2001), Effects of low temperature, cold shock, and various carbon sources on esterase and lipase activities and exopolysaccharide production by a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. *Can J Microbiol.*, 47: 194–205.
- Basha, S. M., (1997), Separation of peanut proteins by capillary electrophoresis. *J. of Arabic. And Food Chem.*, 45(2), 400-402.
- Bayşu Sözbilir, N., Bayşu, (2008), Biyokimya, Öncü Basımevi, Ankara, 284.
- Berglund, P., Hutt, K., (2000), "Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases", In: Patel, R. N., *Stereoselective biocatalysis*, New York: Marcel Dekker.
- Bhardwaj, K., Raju, A., Rajasekharan, R., (2001), Identification, purification and characterization of a thermally stable from lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*, 127, 1728-1738.
- Bisanda, E. T. N., Ogola, W. O., Tesha, J. V. (2003), Characterisation of tannin resin blends for particle board applications, *Cement & Concrete Composites*, 25: 593–598.
- Cardenas, J., Alvarez, E., de Castro-Alvarez M-S, Sanchez-Montero J. M., Valmaseda, M., Elson, S.W., Sinisterra, J-V. (2001), Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *J Mol Catal B: Enzym* 2001; 14, 111-123.
- Colman, M. H., Macrae, A. R., (1980), "Fat process and composition", UK Patent No.1577933.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cote, A., Shareck, F. (2008). Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Enzyme and Microbial Technology*, 1–27.

Demirkan, B., (2008), Ceviz (*Juglans regia* L.) tohumu lipazının saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, yüksek lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Ertuğrul, S., Dönez, G., Takaç, S. (2007), Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, In Press.

Fengel, D. ve Vegener, G., (1984), *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions.*, Walter de Gruyter, Berlin New York, 3-11-008481-3.

Gao, X. G., Cao, S. G., Zhang, K. C., (2000), Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 74–82.

Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., Davidson, S., (1996), Microbial lipases: production and applications. *Science progress.*, 79, (2): 119–157.

Gilham, D., Lehner, R., (2005), Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36: 139–147.

Godtfredsen, S., E., (1990), *Micobial Lipases*, Sayı. 7, Nova Nordisk A/S, Denmark, 255-273.

Gupta, N., Rathi, P., Gupta, R., (2002), Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal Biochem.*, 311: 98–99.

Gutiérrez, A., del Río, J. C., Martínez, M. J., Martínez, A. T., (2001), The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends in Biotechnology.*, 19, (9): 340–348.

Güngör, K., (2008), Çağla badem (*prunus dulcis*) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.

Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sodra, L., Comeu, L. C., (2000), Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* Strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 421-430.

Hird, H., Pumpery, R., Wilson, P., Sunderland, J. ve Reece, P., (2000), Identification of peanut and hazelnut allergens by native two- dimensional gel electrophoresis, 21, 2678-2683.

Hoppe, A., Theimer, R. R., (1996), Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsion phytochemistry 42(4), 973-978.

Houde, A., Kademi, A. Ve Leblanc, D., (2003), Lipase and their Industrial applications, Applied Biochemistry and Biotechnology, 118, 155-170.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jaeger, K. E., Eggert, T. (2002), Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 390_397.

Jaeger, K. E., Reetz, T. M., (1998), Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 16, 396-403.

Jensen, R. G., Hamosh, M., (1996), Engineering of/with lipases. Kluwer Academic Publishers, Boston, London. 17-29.

Kademi, A., Aït-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., Baratti, J. C., (2000), Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. *Applied Microbiol. and Biotechnol.*, 54: 173-179.

Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A., (2003), Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 307-313.

Kanwar, L., Goswami, P., (2002), Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme and Microb. Technol.*, 31: 727–735.

Kapranchikov, V. S., Zhrebtsov, N. A., Popova, T. N., (2004), Purification and characterization of lipase from wheat (*Triticum aestivum* L.) germ. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(1), 84-88.

Kargi, F., ve Shuler, M. L., (1992), Bioprocess Engineering Basic Concepts. *Prentice Hall*.

Kayacık, H., (1980), Orman ve park ağaçlarının özel sistematiği. Gymnospermae (Açık Tohumlular), I. Cilt, İ.Ü. Yayınları, Yayın No: 2642, Fakülte No: 281, 388 s. İstanbul.

Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U. T., (1998), Biotransformations with lipase. *Biotechnology*, 8, 37-192.

Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U.T., (1998), Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G., Stadler A., Kelly PJW., ed., *Biotechnology*. S. 8. New York: VCH, s.37–192.

Kim, H. K., Park, Y. S., Kim, H. Ve Oh, T. K., (1996), Partial interfacial activation of *Proteus vulgaris* lipase overexpressed in *Escherichia coli*, *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*, 60, 1365-1367.

Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, R., Arunkumar, M., Thangavelu, T., Natarajaseenivasan, K. (2007), Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess Biosyst Eng.* DOI 10. 1007/s00449–007–0186–0.

Kirchner, G., Scollar, M. P., Klivanov, A. M., (1985), Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *Biotechnol Biochem.*, 107: 7072_251.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Klibanov, A. M., (1997), "Why are enzymes less active in organic solvents than in water?", *Trends Biotechnol.*, 15: 97–101.
- Kulkarni, N., Gadre, R. V., (2002), Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 344 – 348.
- 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.
- Küfrevioğlu, E. K. ve Küfrevioğlu, İ., (2000), Biyokimya, Aktif Kitabevi, Erzurum: s.91-118.
- Keha, E.E., Ve Küfrevioğlu, Ö., (2004). Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.
- Meghwanshi, G. K., Agarwal, L., Dutt, K., Saxena, R. K., (2006), Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40: 127–131.
- Miyazaki, K., Fujikawa, S., (2009), "Methods of treating skin disease, scalp disease,, sensitive skin or suppressing hair loss with microbubble washing compositions", US patent number 200090214512.
- Mukherjee, K. D., Hills, M. J., (1994), in *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application* (Woolley, P. and Petersen, S. B., eds), s.49–75, Cambridge University Press, Cambridge.
- Nasa, E., (1988), Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growthbconditions. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 133-227.
- Nelson D. L., Cox M. M., (2005), Lehninger biyokimyanın ilkeleri, Nedret K. (Çev), Palme Yayıncılık, Ankara: s. 223-224.
- Nergiz, C., Dönmez, İ., (2004), Chemical Composition and Nutritive Value of *Pinus pinea* L. Seeds. *Food Chemistry*, 86, 365-368.
- Olszewski, A., Pons, L., Moutete, F., Aimone-Gastin, I., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A. ve Gueant, J. L., (1998), Isolation and characterization of proteic allergens in refined peanut oil. *Clinical Experimental Allerg*, 28, 850, 859.
- Omar, I.C., Nishio N, Nagai S., (1987), Fat hydrolysis and esterification by a lipase from *Humicola lanuginosa*. *Agric Biol Chem.*, 51: 2153–2159.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. Ve Soccol, V. T., (1999), The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnology Applied Biochemistry*, 29, 119-131.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Parcerisa, J., Codony, R., Boatella, J., Rafecas, M., (1999), Triacylglycerol and phospholipid composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) lipid fraction during fruit development. *J. Agric Food Chem.*, 47(4), 1410-1415.
- Park, H., Ymanaka, N., Mikkonen, A., Kusakabe, I., Kobayashi, H., (2000), Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(5), 931-939.
- Prabhu, V. A., Tambe, S. P., Grandhi, N. N., Sawant, S. B., Joshi, J. B., (1999), Rice Bran Lipase : Extraction, activity and stability. *Biotechnol. Prog.*, 15(6), 1083-1089.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Basri, M., (2006), "Lipases: Introduction", New Lipases and proteases, Abu Bakar Salleh, Raja N. Z. R. Abdul Rahman, Mahiran Basri, *Nova Science publishers, Inc.*, New York, 1-22 .
- Reetz, M., (2002), Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6:145-150.
- Rubin, B., Dennis, E. A., ed., (1997), Lipases: Part B. Enzyme characterization and utilization Methods in enzymology. S. 286. New York: Academic Press, s. 1-563.
- Salgın, U., Çalimli, A., Yıldız, N., Salgın, S., Sarı, M., (2007), "Süperkritik CO₂ ortamında lipaz enzimlerinin kararlılığı ve yapısal bozunmasının incelenmesi", *Tubitak*, Ankara, 15-17.
- Sani, D. G., (2006), "Step up: Bacterial lipase to substitute pancreatic lipase for enzymetherapy", www.microbepundit.blogspot.com.
- Schmidt, R., Verger, R., (1998), Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37: 1608_1633.
- Sharma, A. K., Tiwari, R. P. ve Hoondal G. S., (2001), Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8, *J. Basic Microbiol.*, 41, 6, 363-366.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., (2001), "Production, purification, characterization, and applications of lipases", *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.
- Stead, D., (1986), Microbial Lipases: their characteristic, role in food spoilage and industrial uses, *Journal of Dairy Research*, 53, 481-505.
- Şengör, M. Aktaş, N., (2006), "Fenol'ün enzimatif oksidatif polimerizasyonu ve reaksiyon kinetiğinin modellenmesi" Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen-Bilimleri Enst. Y.Lisans Tezi Van.
- Taipa, M. A., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. S., (1992), Purification of lipases. *Journal of Biotechnology.*, 26: 111-142.
- Taweel, R. ve Sungur, S., (1995), Lipaz enzimleri ile yağların modifikasyon biyoteknolojisi, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara, 446 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Telefoncu, A. (2000), Biyokimyada temel ve modern teknikler. Biyokimya Yazokulu kitabı, Ege Üniv.
- Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S., (2001), "Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction", *Process Biochem.*, 36: 933–9.
- Veeraragavan, K., (1990), A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity, *Analytical Biochemistry*, 186, 301-305.
- Victor, S., Lin, Y., Kianoush, M., Dancil, K. P. S., Sailor, M. J., Ghadiri, R. M., (1997), A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor. *Science*, 278:840-843.
- Winkler, U. K., Stuckmann, M., (1979), Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 138: 663–670.
- Yaltırık, F., (1993), Gymnospermae (Açık tohumlular). İ.Ü.Yayınları, 3443, (386), 320s., İstanbul.
- Yu, S. Z., Ke, Y. J., Jun, Y. Y., (2007), Purification and characterization of a lipase *Aspergillus niger* F044. *Chin J. Biotech*, 23(1),96-100.