



**ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) TOHUMUNDAN  
LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve  
KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

**Serpil ALTUNTAŞ**

Kütahya – 2023

T.C.  
KÜTAHYA DUMLUPINAR ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) TOHUMUNDAN LİPAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Danışman:  
Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Hazırlayan:  
Serpil ALTUNTAŞ

Kütahya – 2023

## Kabul ve Onay

### KÜTAHYA DUMLUPINAR ÜNİVERSİTESİ

#### LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda, 801914110115 öğrenci numaralı, Serpil ALTUNTAŞ'ın hazırlamış olduğu "Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) tohumundan lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili tez savunma sınavı jüri tarafından yapılmış ve adayın tezinin OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmesine karar verilmiştir.

...../...../.....

Tez Jürisi	İmza	
	Kabul	Red
Prof. Dr. Metin BÜLBÜL (Danışman)		
Prof. Dr. Laçine AKSOY		
Dr. Öğr. Üyesi Ekrem TUNCA		

## Onay

Doç. Dr. Arif KOLAY

Enstitü Müdürü

## **Bilimsel Etik Bildirimi**

Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığım “Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) tohumundan lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

12/05/2023

Serpil ALTUNTAŞ

## Özgeçmiş

İlköğrenim ve Lise eğitimimi Artvin’de tamamladı. Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden mezun oldu. Balıkesir Üniversitesi Matematik öğretmenliği bölümünde okumakta. Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda tezli yüksek lisanstan mezun oldu.



## ÖZET

### ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) TOHUMUNDAN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU

ALTUNTAŞ, Serpil

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Mayıs, 2023, 70 sayfa

Lipaz, triaçilgliserollerin, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizinde katalizör olarak görev alan bir enzimdir. Günümüzde biyoteknolojik gelişmelerin hız kazanması, lipaz enziminin kullanım alanlarını arttırmaktadır. Bu çalışma ile ilk kez aspir (*Carthamus tinctorius* L.) tohumundan lipaz saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılarak literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Aspir tohumu proteinlerinin yağsızlaştırılması basamaklarında sırasıyla; yağların uzaklaştırılması, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılarak lipazın saflaştırılması yapılmıştır.

Saflaştırma aşamalarında Lowry metoduna uygun olarak protein tayini yapılmıştır ve titrematik işlemler, aktivite tayinleri için gerçekleştirilmiştir. Yapılan işlemler sonucunda aspir tohumunun 8,47 kat saflaştığı tespit edilmiştir. İşlemler sonucunda spesifik aktivite değerleri de hesaplanmıştır.

Lipaz enziminin saflaştırılma işleminin ardından SDS-PAGE ile karakterizasyon işlemi yapılmıştır. Yapılan işlemler sonucunda elde edilen bulgularda en iyi aktivite enzimde pH: 10,4 ve sıcaklıkta 60°C olarak değerler not edilmiştir. Bununla beraber, stabil pH değeri 13,2 ve stabil sıcaklık seviyesi 50°C olarak bulunmuştur. Lipaz enzimi depo kararlılığı da tespit edilmiş ve 5 gün üst üste yapılan ölçümlerde (60°C, pH:10,4) enzim aktivitesinde % 70 oranında bir azalma gözlenmiştir.

Zeytinyağının ve triolein substratlığında yapılan  $K_m = 25,49$  mM ve  $V_{max}$  değeri ise yaklaşık 5,6 U/dk.mg enzim olarak bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Aspir tohumu, Enzim, Karakterizasyon, Lipaz, Saflaştırma

**ABSTRACT****CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF LIPASE ENZYME FROM  
ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) SEED****ALTUNTAŞ, Serpil****Master's Thesis, Department of Biochemistry****Thesis Supervisor: Prof. Dr. Metin BULBUL****May, 2023, 70 pages**

Lipase is an enzyme that acts as a catalyst in the hydrolysis of triacylglycerols to glycerol and fatty acids. Today, the acceleration of biotechnological developments increases the usage areas of lipase enzyme. In this study, it was aimed to contribute to the literature by purifying and characterizing lipase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed for the first time.

In the steps of defatting of safflower seed proteins, lipase purification was carried out using oil removal, ammonium sulfate precipitation, dialysis, gel filtration chromatography methods, respectively.

In the purification steps, protein determination was performed in accordance with the Lowry method and titrimetric procedures were performed for activity determinations. As a result of the procedures, it was determined that safflower seed was purified 8,47 times. Specific activity values were also calculated as a result of the procedures.

After purification of the lipase enzyme, characterization was performed by SDS-PAGE. The results obtained as a result of the procedures showed that the best activity enzyme pH: 10.4 and temperature 60°C were noted as the values. However, the stable pH value was found to be 13.2 and the stable temperature level was 50°C. The storage stability of the lipase enzyme was also determined and a 70% decrease in enzyme activity was observed in measurements made for 5 consecutive days (60°C, pH: 10.4).

The  $K_m = 25.49$  mM and  $V_{max}$  value was found to be approximately 5.6 U/min.mg of enzyme in olive oil and triolein substrate.

**Key words:** Safflower seed, Enzyme, Characterization, Lipase, Purification

## Önsöz

Yüksek lisansa başladığım andan itibaren tecrübesi ve yaklaşımlarıyla ilgi ve desteğini gördüğüm, engin bilgilerinden faydalandığım tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Metin BÜLBÜL' e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarında gerek bilgi gerek fikir olarak gelişimimizde bizi destekleyen yanımızda olan Dumlupınar Üniversitesi Biyokimya Bölüm Başkan Yardımcısı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ekrem TUNCA' ya

Çalışmalarında bilgi ve sabırla her zaman yanımda olan, sorularımı içtenlikle yanıtlayıp, çözümler bulan Dumlupınar Üniversitesi Biyokimya Bölümü Arş. Gör. Selin ÇOKDİNLEYEN' e, laboratuvar çalışmalarında her zaman desteğini gördüğüm, en olumsuz anlarda desteğinden kaçınmayan Dumlupınar Üniversitesi Biyokimya Bölümü Arş. Gör. Şüheda ÖZKÜL' a,

Laboratuvarda çalışmaktan büyük keyif aldığım, destekleriyle mutlu olduğum ekip arkadaşı olup paylaşımlarıyla yanımda olan sevgili arkadaşlarım Fatma GÖVEN ve Betül AKKURT' a,

Hayatıma anlam katan çalışmalarım boyunca desteklerini sunup, inançlarıyla beni ayakta tutan değerli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT .....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
GÖRSELLER LİSTESİ .....	xiii
KISALTMALAR .....	xiv
GİRİŞ .....	1

### BİRİNCİ BÖLÜM

#### ASPİR TOHUMU ve ASPİR YAĞI

1.1. ASPİR TOHUMU ve ASPİR YAĞI .....	4
---------------------------------------	---

### İKİNCİ BÖLÜM

#### ENZİMLER

2.1. ENZİMLER .....	9
2.2. ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİ EDEN ETMENLER.....	10
2.2.1. pH'nın Etkisi.....	10
2.2.2. Sıcaklık Etkisi.....	11
2.2.3. Enzim İnhibisyonu.....	11
2.3. ENZİMLERİN KULLANILDIĞI ALANLAR.....	15

### ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

#### LİPAZLAR

3.1. LİPAZLAR .....	18
3.1.1. Lipaz Enziminin Genel Özellikleri .....	18
3.2. LİPAZ KAYNAKLARI .....	19

<b>3.3. LİPAZ ENZİMİ ÜRETİMİ .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. LİPAZ ENZİMİ UYGULAMA ALANLARI.....</b>	<b>21</b>
3.4.1. Gıda Endüstrisinde Lipazlar .....	22
3.4.2. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar .....	23
3.4.3. Kağıt Endüstrisinde Lipazlar.....	23
3.4.4. Oleokimyasal Endüstride Lipazlar .....	24
3.4.5. Biyodizel Üretiminde Lipazlar.....	24
3.4.6. Organik Madde Sentezinde Lipazlar .....	24
<b>3.5. LİPAZ AKTİVİTE TAYİNİ.....</b>	<b>25</b>

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE METOT

<b>4.1. MATERYAL .....</b>	<b>27</b>
4.1.1. Kullanılan Kimyevi Malzemeler.....	27
4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	27
4.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	27
<b>4.2. METOTLAR .....</b>	<b>29</b>
4.2.1. Homojenat Hazırlanması .....	29
4.2.2. Aktivite Tayini Yapma Yöntemleri .....	29
4.2.3. Lowry Protein Tayini .....	30
4.2.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz.....	30
4.2.5. Sephadex® Jel Hazırlanması.....	31
4.2.6. Saflaştırılan Proteinlerin SDS-PAGE ile Karakterizasyonu .....	32
4.2.7. Optimum pH Çalışmaları .....	32
4.2.8. Optimum Sıcaklık Çalışmaları .....	32
4.2.9. Stabil pH Çalışmaları .....	32
4.2.10. Stabil Sıcaklık Çalışmaları .....	32
4.2.11. Depo Kararlılığı Tayini.....	33
4.2.12. $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi .....	33

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE TARTIŞMA

<b>5.1. SONUÇ</b> .....	<b>35</b>
5.1.1. Aspir Tohumu Lipazının Hidrolitik Aktivitesinin Tayini .....	35
5.1.2. Aspir Tohumundan Saflaşan Lipaz Enziminin Saflaştırma Basamakları .....	35
5.1.3. Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Optimum pH'nın Belirlenmesi .....	36
5.1.4. Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	37
5.1.5. Aspir Tohumu Lipazının Depo Kararlılığının Belirlenmesi .....	38
5.1.6. Aspir Tohumu Lipazının Stabil pH Aktivitesinin Belirlenmesi .....	39
5.1.7. Aspir Tohumu Lipazının Stabil Sıcaklık Aktivitesinin Belirlenmesi .....	40
5.1.8. Lipaz Enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması.....	41
5.1.9. SDA-PAGE ile Lipaz Enziminin Karakterizasyonu .....	42
<b>5.2. TARTIŞMA</b> .....	<b>43</b>
<b>KAYNAKÇA</b> .....	<b>48</b>
<b>DİZİN</b> .....	<b>54</b>

## TABLOLAR LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> Yağlı Tohumların Yaklaşık Yağ İçeriği ve Seçilen Yağlı Tohum Bitkilerinin Ana Kullanım Alanları.....	6
<b>Tablo 2.1:</b> İnhibitör Kovalent Bağ Oluşumu .....	12
<b>Tablo 2.2:</b> Farklı Alanlarda Kullanılan Bazı Enzimler .....	15
<b>Tablo 5.1:</b> Saflaştırma Basamakları .....	35
<b>Tablo 5.2:</b> Aspir Tohumundan Saflaşan Lipaz Değerleri .....	35
<b>Tablo 5.3:</b> Saflaşan Lipaz Enziminin Optimum pH Değerleri .....	36
<b>Tablo 5.4:</b> Saflaştırılan Lipazın Optimum Sıcaklık Değerleri .....	37
<b>Tablo 5.5:</b> Aspir Tohumu Lipazının Depo Kararlılığı Değerleri .....	38
<b>Tablo 5.6:</b> Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Stabil pH Değerleri .....	39
<b>Tablo 5.7:</b> Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Stabil Sıcaklık Aktivite Değerleri .....	40
<b>Tablo 5.8:</b> Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Farklı Substrat Değişimindeki Enzim Aktivite Değişimi .....	41

**ŞEKİLLER LİSTESİ****Sayfa**

<b>Şekil 2.1:</b> Yarışmalı İnhibitörler, Enzim-Substrat ve Enzim-İnhibitör Komplekslerinin Denge Reaksiyonu .....	<b>13</b>
<b>Şekil 2.2:</b> Yarışmasız İnhibisyondaki ES ve EI Denge Reaksiyonları .....	<b>14</b>
<b>Şekil 2.3:</b> Yarı Yarışmalı Enzim İnhibisyondaki Denge Reaksiyonları .....	<b>14</b>
<b>Şekil 3.1:</b> Triaçilgliserolden Lipaz Katalizliğinde Gliserol ve Yağ Asidi Oluşumu .....	<b>18</b>
<b>Şekil 5.1:</b> Aspirden Saflaştırılan Lipaza Karşı Optimum pH'ı .....	<b>37</b>
<b>Şekil 5.2:</b> Aspir Tohumu Lipazı Üzerine Sıcaklık Görüntüsü .....	<b>38</b>
<b>Şekil 5.3:</b> Aspir Tohumu Lipazının Depo Kararlılığı .....	<b>39</b>
<b>Şekil 5.4:</b> Aspir Tohumu Lipazının Stabil pH Aktivitesi .....	<b>40</b>
<b>Şekil 5.5:</b> Aspir Tohumu Lipazının Stabil Sıcaklık Aktivite Grafiği .....	<b>41</b>
<b>Şekil 5.6:</b> Aspir Tohumundan Elde Edilen Lipazın Lineweaver-Burk Grafiği .....	<b>42</b>

**GÖRSELLER LİSTESİ****Sayfa**

<b>Görsel 1.1:</b> Aspir Tohumu.....	<b>6</b>
<b>Görsel 1.2:</b> Aspir Çiçeği.....	<b>7</b>
<b>Görsel 5.1:</b> Aspir Tohumu Lipazının SDS-PAGE ile Karakterizasyonu .....	<b>42</b>



**KISALTMALAR**

<b><math>K_m</math></b>	Michaelis Menten sabiti
<b><math>V_{max}</math></b>	Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği max hız
<b>mg</b>	miligram
<b>cm</b>	santimetre
<b>nm</b>	nanometre
<b>mL</b>	mililitre
<b>mM</b>	milimolar
<b>dk</b>	dakika
<b><math>\mu</math>g</b>	mikrogram
<b>V</b>	volt
<b>pH</b>	Potansiyel hidrojen
<b>EU</b>	Enzim aktivite birimi
<b>EI</b>	Enzim inhibitör kompleksi
<b>ES</b>	Enzim Substrat
<b>E</b>	Enzim,
<b>I</b>	İnhibitör
<b>S</b>	Substrat
<b>K</b>	Denge sabiti
<b>kDa</b>	Kilodalton



**TEZ METNİ**

## GİRİŞ

Compositae ailesine ait olan aspir (*Carthamus tinctorius* L.) oldukça önemli endüstriyel bir bitkidir. Dünya çapında 25 yabancı türü yetiştiği bilinen *Carthamus* cinsinin ülkemizde 8 türünün yetiştiği bilinmektedir. Geniş bir kullanım alanına sahip olan aspirin tuzluluk ve kuraklık gibi stres faktörlerine karşı dirençli bir bitki oluşu, ülkemizde yetiştiricilik anlamında kullanımının giderek yaygınlaşmasına katkı sağlamaktadır. Küresel ısınmanın toprakta oluşturduğu tuzluluk oranının artmasıyla belirli bölgelerdeki toprakların değerlendirilmesinde aspirin rolünü öne çıkarmaktadır. Aspir tohumlarının farklılıklarına bağlı olarak içerdikleri yağ (%30-%45), kabuk (%35-%40) ve protein (%15-%20) oranlarının değişebildiği belirtilir (Sülüş, 2019).

Enzimler, canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hücrelerden ekstrakte edilebilen ve daha sonra çeşitli ticari açıdan önemli süreçleri katalize etmek için kullanılabilen biyokatalizörlerdir. İmmobilize hale dönüştürülebilen enzimler, birçok reaksiyonun tekrar kullanımına olanak sağlamaktadır. Enzimler, gıda, hayvansal ürünler, biyoteknoloji, tekstil, farmakoloji, sağlık alanında tanı ve tedavi basamakları gibi alanların tüm biyokimyasal reaksiyon basamaklarında önemli rol almaktadır (Park, vd., 2005).

Lipazlar, triaçilgliserollerin ester bağlarını su ve yağ arasındaki dengede katalizleme görevindedirler. Lipazların eldesi hayvansal, mikrobiyal, fungal ve bitkisel kaynaklı olabilmektedir. Lipaz kaynaklarından olan bitkisel lipazlar, oda koşullarında aktivite bakımından iyi sonuçlar verebilmektedir. Kolay temin edilebilir olması bitkisel lipazları önemli hale getirirse de yağları daha yavaş hidroliz etmelerinden dolayı diğer lipaz kaynaklarına kıyasla daha az tercih edilirler (Saraç, vd., 2008).

Endüstriyel ortamda sıklıkla kullanılan lipaz enzimleri çeşitli reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptir. Bunlardan başlıcaları hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon reaksiyonlarıdır. Sulu ve susuz koşullarda zor tepkimeleri reaktive etmelerinden dolayı lipazların kullanımının her alanda geniş sahalara yayılması lipaz saflaştırma çalışmalarına olan ilgiyi de arttırmaktadır (Chen, vd., 2009).

Yapmış olduğumuz çalışmada, aspir olarak bilinen *Carthamus tinctorius* L. tohumundan, lipaz enzimi saflaştırıldıktan sonra karakterizasyon işlemleri üzerine çalışma planlanarak yapılmıştır. Amaçlanan sonuçlara, aspir tohumunun saflaştırılması,

enzimin optimum sıcaklığı, optimum pH'ı, stabil pH'ı ve stabil sıcaklığı, depo kararlılığı,  $K_m$  ile  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi basamakları ile ulaşılmıştır. Elde edilen veriler sonuç ve tartışma kısımlarında belirtilmektedir.





**BİRİNCİ BÖLÜM**  
**ASPIR TOHUMU ve ASPIR YAĞI**

### 1.1. ASPİR TOHUMU ve ASPİR YAĞI

Aspir tohumu, günümüzde yemeklik yağ, margarinlerin yapımı, salata sosları ve besleyici olması açısından birçok üründe tercih edilen endüstriyel öneme sahip olan bir materyaldir. Günümüzde 800.000 ton gibi yaklaşık bir üretime sahip olan aspir bitkisi yüksek linoleik yağ asidine sahip olması aspiri cazip bir bitki konumuna getirmektedir (Popov ve Kang, 2011). Ülkemizde her yıl tonlarca yağ tüketilmektedir. Yoğun olarak ekilen değişik yağ bitkilerinden elde edilen yağ miktarı da buna bağlı olarak değişebilmektedir (Babaoğlu, 2017).

İnsan beslenmesinde içerikleri nedeniyle önemli bir yere sahip olan yağlar Türkiye’de ayçiçeği, kanola, soya, pamuk, susam ve yer fıstığı gibi yağlı tohumlu bitkiler yem sanayiinde ve besin kaynağı şeklinde kullanılan temel gıdalar olarak üretilmektedir (Koç ve Altınel, 1997).

Asteraceae ailesinin bir üyesi olan aspir (*Carthamus tinctorius* L.) yüz cm’e kadar boy alabilen, dikenli ve dikensiz formlarından kısa süre içerisinde verim ve üretim sağlanan yağlı tohumlar cinsidir. Her şarta ayak uydurabilen elverişsiz koşullarda bile kolayca yetişebilen ve yapısında %30-45 arasında yağ bulduran yağ bitkisine örnektir (Singh ve Nimbkar, 2016). Aspir yağının yaklaşık %90’ı doymamış yağ asitlerinden oluşmakta olup oleik ve linoleik yağ oranını yapısında buldurmaktadır (Johnson, Bergman ve Flynn, 1999).

Beslenme başta olmak üzere, linoleik içeriği dudak kremlerinde, balzamlarda ve kremlere kattığı yumuşatıcı etkisinden dolayı endüstride tercih sebebi olabilmektedir (Popov ve Kang, 2011). Ayrıca boyar malzemelerde de çabuk kuruyan bir yağ olması sebebi ile kaplama malzemesi olarak da tercih edilmektedir (Babaoğlu, 2017). Ayrıca endüstride kullanılan formu keten tohumuna göre daha açık sarı renkte olması boyar malzeme olarak kullanılmasını kolaylaştırmıştır (Popov ve Kang, 2011).

Aspir, dizel yakıt olarak kullanılmaya da çok elverişli olmasına karşın piyasa değerinin yüksek olması sebebiyle bu durum dizel yakıt olarak kullanımını zorlaştırmaktadır. Yağlı tohumlara olan ilginin giderek arttığı günümüzde aspride ilerleyen dönemlerde yakıt malzemesi olarak kullanılmaya elverişli hale geleceği öngörülmektedir. Klinik çalışmalarda da kendine yer bulan aspir serumlarında kolesterol seviyelerini düşürücü etkisinden ötürü, önemli bir yere sahip olduğu yapılan çalışmalarda

gözlemlenmiştir. Kuş besleyiciliğinde yem olarak ve hayvan kütüspesi olarak da diğer yağlı tohumlara alternatif olarak kullanılmaktadır (Singh ve Nimbkar, 2016).

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.), tek yıllık ve otsu yapıda yağlı değerli bir bitkidir. Aspir bitkisi 80-100 cm arasında uzayabilen, beyaz, sarı, turuncu ve kırmızı renklere çiçekleri (Görsel 1.2) ve yoğun olarak beyaz renkte tohumları olan (ender durumlarda siyah) (Görsel 1.1), aynı zamanda dalların uç kısmında tohumlarıyla küçük tablalar oluşturan bir bitkidir (Kobuk, Ekinçi ve Erbaş, 2019). Aspir tohumu, %27-%32 oranında yağ içeriği ve %55-%70 düzeyinde linoleik asit açısından zengin olması nedeniyle önemli alternatif yağlı bitkilerdendir (Ergönül ve Özbek, 2020).

Aspir, değişen iklim koşullarına ayak uydurması tekli ve çoklu yağlar üretmesi, çeşitli hastalıklara karşı direnç sağlaması ve bunun gibi birçok özelliği aspiiri önemli kılmaktadır (İldız ve Unakıtan, 2022). Aspirin içerdiği flavonoid ve lignon biyoaktif maddeleri osteoporoz ve diğer kemik hastalıklarının tedavisinde de kullanılmakta bunun yanı sıra polifenoller açısından zengin bir biyoaktif ürünü olarak da kullanımını artmıştır (Yu, vd., 2013).

Dünyanın başlıca yağlı tohumlu bitkileri arasında aspir, soya fasulyesi, pamuk tohumu, kolza tohumu, ayçiçeği, yer fıstığı veya bezelye, susam tohumu, keten tohumu (linolenik asit adı türetilmiştir) ve hardal tohumu bulunur. Başlıca yağlı tohum bitkilerinin yağ ve protein içerikleri tablo 1.1’de gösterilmektedir. Hint fasulyesi, üzüm çekirdeği, tütün çekirdeği, keten, mısır yağı ve bamya gibi diğer birçok ürün yağlı tohum üretimi için kullanılabilir (Mailer, 2004).

**Tablo 1.1: Yağlı Tohumların Yaklaşık Yağ İçeriği ve Seçilen Yağlı Tohum Bitkilerinin Ana Kullanım Alanları (Mailer, 2004).**

Yağlı tohum	Yağ (%)	Protein(%)	Ana kullanım
Soya fasulyesi	20	46	Gıda
Pamuk	16	37	Fiber
Yer fıstığı	41	46	Gıda
Kolza	41	34	Yağ
Ayçiçeği	40	28	Yağ
Susam	40-60	42	Gıda
Keten tohumu	40	32-34	Yağ
<b>Aspir tohumu</b>	<b>34</b>	<b>23</b>	<b>Yağ</b>
Hardal tohumu	20-50	35	Baharat

Aspir'in çiçekli yapısı kimyasal içermeden boya malzemesi olarak kullanılabilmesi büyük önem arz etmektedir (Nagaraj, Devi ve Srinivas, 2001). Ülkemizde aspir çiçekleri yemeklere renk vermesi açısından Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde kullanılmaktadı (Ildız ve Unakıtan, 2022).

**Görsel 1.1: Aspir Tohumu**



Günümüz teknolojisi sürdürülebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyacı karşılamak adına çalışmalarını sürdürmektedir. Bu alandaki çalışmalar ülkemizde de 1972-1977 yıllarında artarak 1000 hektarlardan, 1980 hektarlara, 1976 yılında ise en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Yakın tarihimizde ekim politikaları nedeni ile ekim alanları azalsa da artan enerji ihtiyacını karşılamak adına aspir gibi yağlı tohumların biyodizel üretimine büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Babaoğlu, 2017).

**Görsel 1.2:** Aspir Çiçeği





## **İKİNCİ BÖLÜM**

### **ENZİMLER**

## 2.1. ENZİMLER

Enzimler, kimyasal tepkimeleri yan ürün oluşturmadan hızlandıran, protein yapılı, canlı hücrelerde bulunan biyolojik katalizörlerdir. Biyolojik tepkimeler sırasında enzimlerin yapısında herhangi bir değişiklik oluşmaz (Bülbül, 2019). Enzimler, küçük yapılı prekürsörlerden daha büyük moleküllerin oluştuğu birçok reaksiyon basamağını katalize etmektedirler. Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda reaksiyonların denge halini ve sabitini değiştirmezler yalnızca dengeye daha çabuk erişmesini sağlarlar. Enzimler substratları hızlandırıcı etkiye sahiptir ve sulu ortamlarda uygun pH ve gerekli sıcaklıklarda işlev halindedirler (Keha ve Kühvrevioğlu, 2018; Palmer ve Bonner, 2011).

Hayati fonksiyonların devamı kimyasal reaksiyonların vücutta gerçekleşmesi ile olmaktadır. Enzimler, yaşamsal olayların devamlılığında tepkimelerde merkezi görevdedirler. Kararlı haldeki hücreleri oluşturan moleküller enzim olmadan reaksiyonlarda yer alamazlar. İnsan vücudunda 40.000 enzim olduğu bilinmektedir ve buna bağlı olarak yapılarının karşılaştıkları reaksiyonlardaki katalize uğrattıkları molekül yapılardan büyük olduğu sonucuna erişilmektedir. Ayrıca dönüşüm sağlayabilmeleri enzimlerin kuaterner protein yapılarından ileri gelmektedir. Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, katalitik aktiviteleri için oldukça önemlidir. Protein yapısındaki enzimlerin sentezi DNA tarafından kontrol edilmekte ve hücrelerdeki biyokimyasal olaylar zinciri DNA tarafından düzenlenmektedir (Keha ve Kühvrevioğlu, 2018).

Enzimler üzerinde günümüzde yapılan biyoteknolojik gelişmeler göstermiştir ki birtakım kalıtsal genetik hastalıklar dokulardaki enzimlerin ya hiç olmaması ya da birtakım eksikliklerden dolayı enzim seviyesine bağlı hastalıkların oluşmasında kan plazmasında incelemeler yapılmasını kolaylaştırıcı etkiye sahiptir. Enzimler hastalıkların teşhisinde birçok ilaca etki ederek iyileşme sürecine de katkı sağlamaktadırlar. Hayati faaliyetler bu duruma bağlı olarak aksamadan devam etmektedir (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimler günümüz koşullarında birçok araştırmacının da dikkatini çekerek reaksiyonları hızlandırıcı etkisiyle enzim saflaştırmada enzimlerin çalışma koşullarına yoğunlaşılmasını önemli hale getirmiştir. Ayrıca enzimlerin saflaştırılabilir olması çeşitli kimyasal proseslerin de yerini almaya başlamasına ön ayak olmuştur (Fuciños, vd., 2005).

## 2.2. ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİ EDEN ETMENLER

Bir enzimin optimize olabilmesi ve yüksek düzeyde enzim aktivitesinin oluşması için gerekli koşulların sağlanması gerekir. Bu, belirlenen uygun bir sürede üretilen substratın reaksiyon içerisinde ölçülmesiyle sağlanır. Birim zamanda elde edilen substrat mol sayısına enzim aktivitesi denir. Enzim aktivite birimi, EU ile ifade edilir (Keha ve Kührevioğlu, 2018).

**Enzim ünitesi EU hesaplama:** Bir EU enzim, belirlenmiş pH ve sıcaklık koşulları altında saniyede 1  $\mu$ mol substratın dönüşümünü katalize eder. Spesifik aktivite ise numunede bulunan proteinin miligramı başına enzim birimidir (Blanco ve Blanco, 2017). Substrat doymunluğunda enzim molekölü başına birim zamanda ürüne dönüştürölen substrat molekölleri molar aktivite ya da devir sayısı olarak ifade edilir. Enzimlerin protein konformasyon yapısı ne kadar sağlam olur ise katalitik aktiviteleri de buna uyum sağlamaktadır. Bu enzimsel yapı bozulur veya küçük parçacıklarına kadar bölünürse hem destekleyici yapı hem de enzim yapıtaşlarında aktiviteyi katalizleyen yapı da yok olur. Bu nedenle protein enzimlerinin mono, di, tri ve tetra yapısı aktivitenin katalizlenebilmesi için önemlidir (Nelson ve Cox, 2005).

### 2.2.1. pH' nın Etkisi

Enzimler kendilerine uygun bir optimum pH aralığında maksimum seviyeye ulaşmaktadırlar. Hücrelerde enzim aktivitesinin kontrolü sağlanırken pH-aktivite ilişkisi göz önüne alınmaktadır. Bu özellikten dolayı reaksiyonlardaki enzim aktivite kontrolü sağlanabilmekte ve hücre içindeki karmaşık yapıların kontrolü sağlanabilmektedir. Fakat enzimi tanılamada pH-aktivite her zaman yeterli olmayabilir. Optimum pH'ı farklı olan substratlar, farklı etkiler gösterebilmektedir. Bir proseste yüksek aktiviteye sahip olan bir enzim, farklı pH'daki bir proseste değişik etkilere neden olabilmektedir. Örneğin, pepsin enzimi farklı pH'larda farklı sonuçlar verebilmektedir. Bu da enzimlerin sınırlı bir pH aralığında farklı substratlarda çalışabildiğini göstermektedir (Fadıloğlu ve Erkmen, 2004).

Her enzim belirli bir optimum pH ile çalışır ve bu her zaman hücre içi pH ile aynı olmayabilir. pH'nın artması veya azalması hücredeki amino asitlerin sınır belirleyici olarak çalışmasında rol oynamaktadır. Enzimler pH'daki değişikliklerden çok çabuk etkilenir, bu etkilenim hidrojen iyonu konsantrasyonunda değişikliklere yol açarak

hücrel yapıları bir arada tutan yapılara zarar verebilmektedir. Bunun önüne geçebilmek için tampon çözeltiler tercih edilerek çalışılan ortam pH'ı stabil tutulur (Fadıloğlu ve Erkmen, 2004; Tırançioğlu, 2017).

### **2.2.2. Sıcaklık Etkisi**

Enzimler, protein yapısında olmaları nedeniyle sıcaklık değişimlerinden farklı oranlarda etkilenirler. Enzim hızının en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık, optimal sıcaklık olarak nitelendirilir. Enzimatik reaksiyonlarda daha uygun optimum sıcaklık enzimin içinde yer aldığı ortam ya da onun biraz üzeri olan sıcaklıklardır. Enzim aktivitesi belli bir sıcaklığa geldiğinde enzim aktivitesi düşmeye başlar. Yüksek sıcaklıklarda enzimin yapısı geri dönüşümsüz olarak denatüre olduğunda enzim aktivitesinin kayıp olmasına sebep olur. Bu yüzden canlı dokularda çalışan enzimler için soğuk (derin dondurucu, buzdolabı gibi) ortamlar daha elverişli olmaktadır. Düşük sıcaklıkta ise enzim hareket yeteneğini kaybettiğinden işlevsel hale gelmesi zaman alır bu durum, enzimin aktivitesinin düşmesine neden olur (Tırançioğlu, 2017).

### **2.2.3. Enzim İnhibisyonu**

Enzimatik tepkimeleri yavaşlatan ya da durduran etkiye sahip moleküllere enzim inhibitörleri denir. Enzimlerin etkisini önleyen maddeler olarak da tanımlayabiliriz. Bir inhibitör aktif bölümde yer alabilmek için substratmış gibi davranarak aktif olan kısma tutunup enzimin çalışmasını zorlaştırırlar. Enzim inhibitörleri hücrel süreçler içerisinde enzim aktivitesini etkileyici farmakolojik etkiye sahip ajanlardır. Hücrel süreçlerin katalizlenmesinde etki gösteren enzim inhibitörleri enzim aktivitesini düşüren moleküler yapılardır (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimatik inhibisyon geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Geri dönüşümlü enzimatik inhibisyonda substrat miktarı veya enzim konsantrasyonu artırılarak inhibitör etkisiz hale getirilmektedir. Geri dönüşümsüz inhibisyonlar, ayrılması zor bir kompleks olduğundan aktif olan merkeze kovalent olarak bağlanarak enzimi inaktive ederler. İnaktivasyon sonrası enzim aktivitesi tekrar geri elde edilememektedir. Birçok geri dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzimle kovalent bağ oluşturur (Kurt, 2019).

**Tablo 2.1: İnhibitör Kovalent Bağ Oluşumu.**

İnhibitör	Kovalent Bağ Oluşturan Yapılar
Siyanür	Geçiş metalleri
p-Merkuribenzoat	Sülfhidril
Diizopropilfluorofosfat	Serin hidroksili, İyodoasetat

Sülfhidril, imidazol, karboksil, tiyoeter gibi yapılar inhibitör ile kovalent bağ oluşturmaktadırlar. Bunlardan bazıları tablo 2.1’de gösterilmektedir. Birçok enzim için dönüşümsüz inhibitörler söz konusudur. İyodasemitle sistein izi içeren yapısından dolayı dönüşümsüz olarak gerçekleşirler. Yine diizopropilfluorofosfatta serin izi içeren yapısından dolayı dönüşümsüz olarak gerçekleşir (Altınışik, 2009).

Dönüşümlü inhibitör tipinde enzim ve inhibitörün etkileşmesi için denge hali söz konusudur. Yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı olarak üç şekilde incelenirler. Yarışmalı inhibitörler, genel olarak substrat yapısına benzeyip ve enzimin etkin kısmına substrat molekülüyle rekabet ederek bağlanırlar ve böylelikle enzimin substrata bağlanmasını engellemiş olurlar. Herhangi bir ürün oluşmadığından dolayı enzim aktivitesi de yavaşlar (Kurt, 2019).

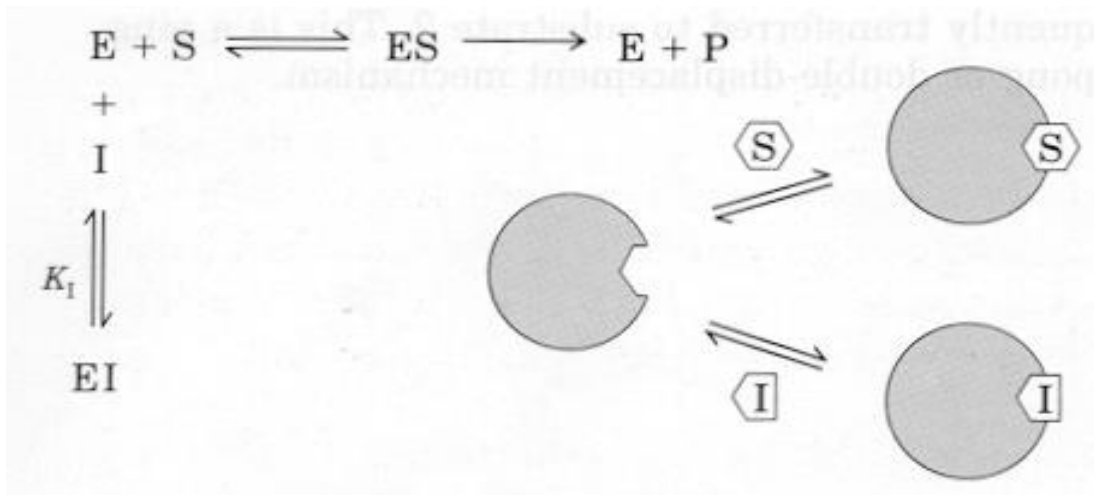
Zayıf yapıda olan yarışmalı inhibitörlerden substrat konsantrasyonu artırılırsa inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Fakat  $V_{max}$  değeri sabit kalır. Enzim inhibitör (EI) ayrışmaları bir uyum içinde çalışmakta olup substrat yoğunluğunun artması dengeyi enzim-substrat (ES) yapısına doğru hareket ettirir.  $V_{max}$  değeri artar. ES yapısının oranını düşürerek azaltmaya çalışmak yarışmalı inhibitöre özgüdür. Yarışmalı inhibitör, ES kompleksi miktarını oransal olarak düşürmesinden dolayı katalizin hızı azalır, bunun sonucunda enzimin  $K_m$  değeri artış göstermiş olur (Şekil 2.1.) (Altınışik, 2009).

Birtakım hastalıklarda, temel etken enzimin işlevini kaybetmiş olması olup; enzimin çalışma koşulları bozulduğu zaman o kimyasal yapı değişebilir, yapıyı takip eden farmakolojik değişimler bir hastalığa şifa kaynağı da olabilir. Buda her enzimin kendisine özgü olduğunu göstermektedir. Örnek olarak; yarışmalı inhibitörler metanol kullanan hastalarda alkol dehidrojenaz enziminin etkisiyle formaldehit yapısına dönüşür. Oluşan formaldehit yapısı dokuları tahrip etme etkisiyle hassas organ olan gözlerde ciddi hasar oluşturarak körlüğe sebebiyet vermektedir. Etanolün substrat öncülüğünde alkol

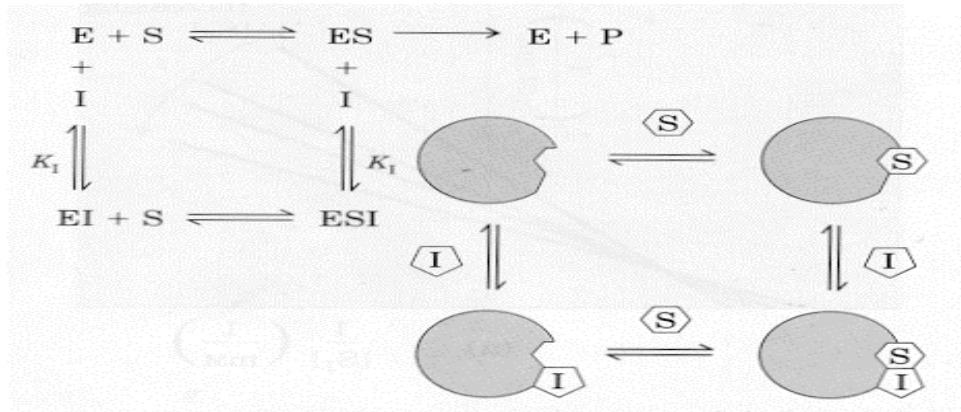
parçalanması yapısında tıpkı bir substratmış gibi davranması metanol ile yarışmasından kaynaklanır. Etanolün hastaya intravenöz olarak infüzyonu tedavi için söz konusudur. Formaldehitin oluşumunu yeteri kadar yavaşlatan intravenöz olarak verilen etanol, vücuttan fazla metanolün zararsız olarak idrar ile atılmasını sağlar (Altınışık, 2009).

Enzim bağlanacağı noktaya farklı bir yerden bağlanıp tersine dönebilir. Enzimdeki bu bağlanma inhibitörün substrata yönelmesini engellemezken, substratta inhibitörün bağlanmasını engellemez. Yarışmasız inhibitörün kimyasal yapısı substrattan farklıdır ve bağlanma enzimin aynı bölgesine değildir. Yani inhibitör ve substrat enzimin farklı yerlerine bağlanır. Katalitik aktivitenin düşmesi yarışmasız bir inhibitörün turnover sayısını düşürerek oluşturur. Burada inhibitör ile substrat arasında yarışma görülmez substrat konsantrasyonu artırılrsa dahi etki değişmez bu şekilde enzimdeki  $V_{max}$  ifadesi azalırken,  $K_m$  ifadesi ise değişmez (Kurt, 2019).

**Şekil 2.1:** Yarışmalı İnhibitörler, Enzim-Substrat ve Enzim-İnhibitör Komplekslerinin Denge Reaksiyonu. E: Enzim, I: İnhibitör, S: Substrat, ES: Enzim-substrat kompleksi, EI: Enzim-inhibitör kompleksi, P: Ürün, k: Denge sabiti (Altınışık, 2009; Kurt, 2019).

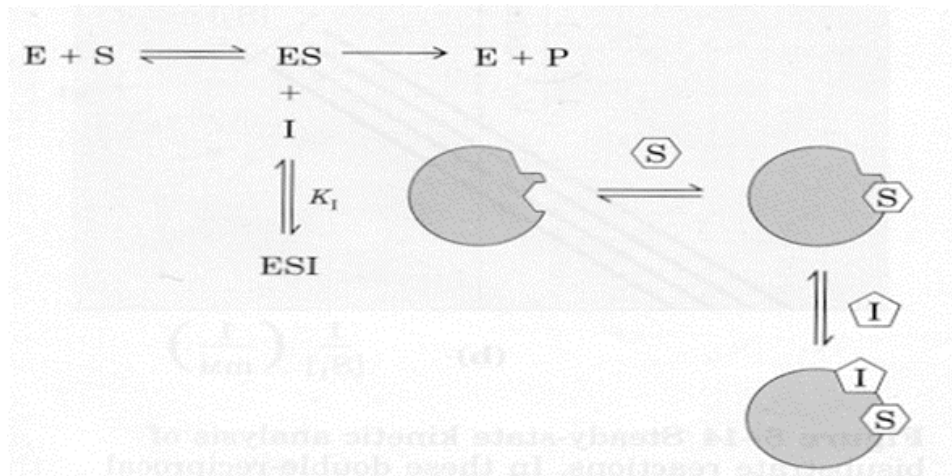


**Şekil 2.2:** Yarışmasız İnhibisyondaki ES ve EI Denge Reaksiyonları (Altınışık, 2009).



Enzimin EI ve ESI kompleksleri oluşturmasında substrat ve enzimin farklı bölgelere bağlanmasından ileri gelmektedir. Bununla beraber katalizlemede bir yavaşlama söz konusu olur, bunun nedeni ise ESI'den I'nın dönüşümlü olarak ayrışmasıdır. Burada ürün oluşumu da gözlenebilir (Şekil 2.2) (Altınışık, 2009).

**Şekil 2.3:** Yarı Yarışmalı Enzim İnhibisyondaki Denge Reaksiyonları (Altınışık, 2009).



Yarı yarışmalı inhibisyonda ise enzimler burada sadece serbest enzime değil, bir tek ES komplekslerine bağlanabilir. Bu tip inhibisyonda ortamda inhibitör varken substrat konsantrasyonu arttırılırsa doğru orantılı olarak inhibisyon da artar. İnhibitör varlığında ortamdaki sürekli kompleks olan ES uzaklaşır, böylece  $K_m$  azalırken, eş zamanda ortamda ESI yapıdan sürekli var olacağı için  $V_{max}$  azalma eğiliminde olur (Şekil 2.3) (Altınışık, 2009).

### 2.3. ENZİMLERİN KULLANILDIĞI ALANLAR

Katalitik aktiviteye sahip proteinlere sahip olan enzimlerin birçok alanda kullanımı mevcuttur. Spesifik yapılarından dolayı belirli reaktifleri tespit etmede kullanımları mevcuttur. Endüstriden tıpa gıda, deterjan gibi birçok alanda uygun maliyeti ve biyolojik olarak parçalanabilir olma özelliklerinden dolayı ekolojik alternatifler haline gelmiştir. Biyoteknolojik gelişmeler endüstrideki kimyasallar yerine biyolojik olarak parçalanabilen enzimler tercih edilmektedir. Enzimler, nişasta işlemede endüstriyel asitlerin yerini alabilirler. Farklı alanlarda kullanılan bazı enzimler tablo 2.2’de gösterilmektedir. Ayrıca kumaşlardaki oksitleyici ajanların da yerini alabilir, hayvan yeminden sindirmeyi kolaylaştırıcı etki sağlayarak hayvansal atıkları azaltabilirler. Deterjanlardaki kullanımı yüzey aktif maddelerin kullanımını azaltabilir. Enzim kullanılan ürünlerden elde edilen verimin yüksek olması, enerji veriminin yüksek olması, enerji tüketimini azaltması, maliyetleri azaltmakta buda yeni biyoteknolojik gelişmelerde enzimleri cazip hale getirmektedir (Kıran, Çömlekçioğlu ve Dostbil, 2006; Sağıroğlu ve Arabacı, 2005).

**Tablo 2.2: Farklı Alanlarda Kullanılan Bazı Enzimler** (Kıran, Çömlekçioğlu ve Dostbil, 2006).

Enzimlerin Uygulama Alanı	Kullanılan Enzim
Gıda	Amilaz, proteaz, tripsin, selülaz
Biyoyakıt	Selülaz, ligninaz (biyokütle için)
Mutfak	Papain
Süt ve süt ürünleri	Lipazlar, renin
Kağıt endüstrisi	Ksilanazlar, selülaz, ligninaz
Nişasta	Amilaz, glukoz izomeraz
Biyolojik deterjan	Amilaz , proteazlar, lipaz
Kişisel bakım	Proteaz

Biyolojik atıkların çevreye verdiği zararları en aza indirmeye çalışma işlemlerinde de enzimlerden yararlanılmaktadır. Enzimlerin yok edilmeden reaksiyonları hızlandırma

özelliği endüstride de dikkat çekmektedir. Enzimler, kazaini parçalayarak pıhtılaşmayı engellemektedir. Peynir mayası enzimleri kullanılarak peynir yapımında, meyvelerin işlenmesinde demleme, mayalama, pişirme ve margarin endüstrisinde, deterjan sektöründe proteaz kan lekelerindeki proteini parçalamak için ayrıca amilaz da deterjanlarda nişasta ve çikolata gibi maddelerin neden olduğu lekeleri çıkarmada, sellülaz ise dokuma kumaşların daha yumuşak ve parlak görünmesine, lipazın yağları parçalamak için kullanımı mevcuttur. Ayrıca genetik mühendisleri sıcak yıkamalarda kullanabilecek termostabil proteinler yapmak için enzimleri kullanırlar. Dericilikte kullanılan lipaz enzimi, derinin hem yüzeyini hem de içteki oluşabilecek yağları temizleyerek deriyi kullanıma hazır hale getirmektedir (Kıran, Çömlekçioğlu ve Dostbil, 2006).



## **ÜÇÜNCÜ BÖLÜM**

### **LİPAZLAR**

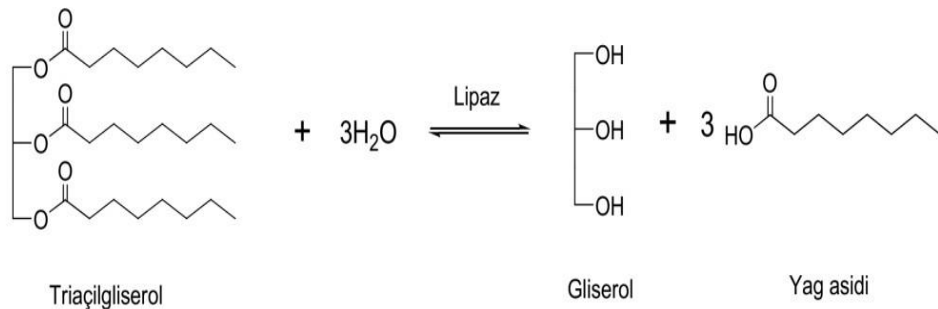
### 3.1. LİPAZLAR

#### 3.1.1. Lipaz Enziminin Genel Özellikleri

Lipazlar, triaçilgliserollerin gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalize eden bitkiler, mantarlar ve memeliler tarafından üretilen enzimlerdir (Şekil 3.1). Lipazların hidrolizi sonucunda, diaçilgliserin, monoaçilgliserin ve son olarak gliserin ve yağ asitleri oluşturarak uzun zincirli açilgliserollerin sentez ve hidrolizini de katalize ederler ve böylelikle enzim sınıflandırılmasında hidrolazlar ana sınıfındaki esterazlar alt sınıfında ele alınırlar. Enzimler kendilerine has özgülükleri ve katalitik aktiviteleri dolayısıyla protein moleküller olarak adlandırılırlar (Gündoğdu ve Kuruüzüm-Uz, 2021; Nelson ve Cox, 2005).

Lipazlar, geniş pH (4-11) ve sıcaklık (10 °C -96 °C) aralıklarında, stabil nitelikte ve aktifirler. Molekül ağırlıkları 94-840 kDa aralığında değişmektedir (Gündoğdu ve Kuruüzüm-Uz, 2021).

**Şekil 3.1:** Triaçilgliserolden Lipaz Katalizliğinde Gliserol ve Yağ Asidi Oluşumu (Altınışık, 2009).



Lipazlar, stereospesifik yapıları sonucunda bazı rasemik karışımlarda enantiyomerleri ayırt edebilmektedirler. Lipazlar serin hidrolazlar olması sebebiyle aktiviteleri çözünür substrat içeren sulu çözeltilerde çok azdır. Esterazlar ise tam tersi çözeltilerde Michaelis-menten kinetiğini göstermektedir (Balashev, vd., 2001; Gündoğdu ve Kuruüzüm-Uz, 2021).

Lipazlar sulu ortamlarda tepkimeye girmesine karşın organik çözücülerde de reaksiyona girmesi sebebiyle tercih edilen önemli biyokatalizörlerdir. Yüksek sıcaklık ve pH da belirlenmiş substrat aralığının dışına çıkması gibi durumlara karşı dirençli özelliklerini yitirmemesi lipazların önemini daha da arttırmaktadır (Gündoğdu ve Kuruüzüm-Uz, 2021).

Lipaz enzimi, 1856 yılında Claude Bernard tarafından keşfedilmiştir. Lipaz enzimini, çözünmemiş halde bulunan yağ parçacıklarını hidrolize eden ve bu yağ parçacıklarını çözünmüş yapıya dönüştüren pankreas öz suyundan elde etmiştir (Hasan, Shah ve Hameed, 2006).

1990 ve 1995 yıllarında lipazın çözünürlük değerleri üzerinde yapılan çeşitli araştırmalarda, substratlarda boyut ve sıralama bakımından farklılıklar olsa dahi birçoğunun birbirine benzediği görülmüştür. Yapılan farklı çalışmalar göstermiştir ki lipaz üç boyutlu yapısı sayesinde hidrojen bağları ile stabilize de olabilmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998).

### **3.2. LİPAZ KAYNAKLARI**

Bitkisel kaynaklı lipazlar enerji kaynağı olan dokularda bulunurlar. Bunlar yağlı tohumlar olabilmektedir. Karakteristik yapıları substrat miktarlarının çokluğu enerji sarfiyatının azlığı ve farmakolojik etkileri ve ökaryotik yapıları sebebiyle tercih edilen lipaz gruplarıdır. Bu sebeptendir ki bitki lipazları gıda, deterjan, farmakoloji ve organik sentezlerde kullanılan avantajlı biyokatalizörlerdir (Seth, vd., 2014).

Lipazların bitkisel eldesi dışında hayvansal yapılardan ve mikroorganizmalardan eldesi de mümkün olmakla beraber lipazlar birçok mikroorganizmanın yapısında olağan koşullarda da bulunabilmektedir. Lipazlar hücre içinde üretime çok elverişli değildir bunun temel nedeni ise lipidlerin sulu ortamda çözünmemesi ve hücre içindeki kovalent yapılarını hücre dışında çözünme gereği duymalarıdır (Gündoğdu ve Kuruüzüm-Uz, 2021).

Bitkisel kaynaklı lipazların eldesi maliyetten dolayı tercih sebebi olmamaktadır. Mikroorganizmal lipazlar ise çözücülerdeki kararlı yapısı ve kofaktöre ihtiyaç duymamaları, substrat yapılarındaki uyum ve enantiyo seçicilikleri sebebiyle tercih edilmektedirler (Saraç, vd., 2008).

Bunun yanı sıra mikroorganizmalardan üretilen birçok lipazın mantar ve bakteri kökenli olduğu bilinmektedir (Gül, 2013; Jaeger ve Reetz, 1998).

Bunlardan bazıları;

- Mantar faaliyetli lipazlar: *Thermomyces lanuginasus*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica* iken
- Bakteriyel lipazlar: *Pseudomonas mendocina*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacteriu viscosum* ve *Pseudomonas alcaligenes* 'tir.

Lipazlar bakteriyel, mantar, bitki veya hayvan orjinlerine bağlı olarak sıcaklık, dayanıklılık ve pH' ya bağımlılık, enantiyoselektivite, pozisyonel spesifiklik gibi özelliklerinin geniş bir aralığını içerirler (Saxena, vd., 2003).

Bakteri hayvan ve mantar kökenli lipazlar araştırıldığında amino asit sayılarının yaklaşık 270 ile 641 arasında yer aldığı saptanmıştır. Birçoğu hücre dışı ve glikoprotein yapıları olan lipazların molekül ağırlığı yaklaşık 20 ve 60 kDa arasındadır. Saflaştırılmış lipazlar ise %2-%15 miktarında karbonhidrata sahiptir.  $\alpha/\beta$  ortak hidroliz katlanmasına sahip lipazların iç yapısında 8 adet  $\beta$  ve bu yapıyı oluşturan 6 tane  $\alpha$ -heliks halkası mevcuttur (Tırançoğlu, 2017).

Lipazların aktif olan bölgelerinde ise glutamik asit, histidin ve serin aminoasitlerinden oluşmuş bu yapıyı kataliz eden üçlü yapı bulunur. Bu yapı bir hidrojen bağı ile histidine bağlanan glutamik asit ve serin aminoasitlerinin girişimiyle oluşmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998).

### 3.3. LİPAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Lipazlar üretim aşamasında azot kaynağının cinsi, büyüme ısısı ve iyonların varlığından etkilenmektedir. Bunun yanı sıra amonyum klorür gibi yaşamsal inorganik azot yapısının da bazı mikroskobik canlılarla lipaz üretmekte kullanıldığı bilinmektedir (Gupta, vd., 2009).

Bazı araştırmalarda göstermektedir ki mısırdan elde edilen likör içeceği ve soyadan üretilen un gibi azot bulunduran yapılar lipaz eldesini artırırken, pepton gibi yapılarda ise elde edilen verim azalmaktadır. Lipolitik aktivite yaklaşık olarak 1120 (U/L) zeytinyağındaki rahat dolaşan yağ asitlerinin titre işlemi ile belirlenmiş ve buradan da üre ile amonyum sülfat lipaz sentezini engellemiştir (Sharma, Chisti ve Banerjee, 2001).

Lipaz üretiminde çeşitli iyonlarında etkisi mevcuttur. Üretilen ortama magnezyum, demir, kalsiyum iyonlarının eklenmesi lipaz aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bunların içerisinde lipaz aktivitesine etkisi en çok olan iyon  $Ca^{+2}$  olduğu bulunmuştur. Ayrıca yine birçok alkali metal katyonları lipaz aktivitesinin artışına sebep olmuştur. Bazı ağır metaller ve yüzey aktif maddelerinde lipaz aktivitesini düşürücü etkide bulunduğu gözlemlenmiştir (Öztürk, 2002).

Lipazlar üretildiği ortamların fiziksel koşullarından da etkilenmektedirler. Bazı bakterilerin uyumlu bir şekilde lipaz üretebilmeleri için havalandırma koşullarının iyileştirilmesi ve yaklaşık pH'nın (7), bazı koşullarda ise pH (>7) olduğu durumlarda en yüksek aktivite gözlemlenmiştir. Lipaz üretimi için lipaz elde edilecek bakteriler en iyi büyüme sıcaklığını (50°C) olarak bulunmuştur. Lipazlar için en ideal sıcaklığın ise 20°C-50°C olduğu saptanmıştır (Sharma, Chisti ve Banerjee, 2001).

Bitkisel ve hayvansal enzimlerin üretimde tercih edilmesinin yanı sıra lipazlar üretimde daha çok kullanılmaktadır. Bunun sebebi olarak da mikroorganizmaların organik çözücülerde aktifliklerini koruyarak kofaktöre ihtiyaç duymaması, yan ürün oluşturmamaları, katalitik aktivitelerinin yüksek oluşu ucuz ve daha stabil olmaları yönüyle üretimde tercih edilmiş bu yönüyle sektöre büyük bir kaynak sunmuştur (Hasan, Shah ve Hameed, 2009).

### **3.4. LİPAZ ENZİMİ UYGULAMA ALANLARI**

Lipazlar sulu ortamda hidroliz olayını gerçekleştirdiği gibi susuz ya da mikro sulu ortamlarda ters reaksiyonları da katalize etmektedir. Enantiyoselektifler kemo-, regio- ve endüstriyel kullanımı uygundur. İstenilen koşullar altında da hareket yeteneğine sahip olan özgüllükleri ve spesifik yapıları kimyasal tepkimelerin yerine de kolayca kullanılmalarını sağlamaktadır (Seth, vd., 2014; Tırançioğlu, 2017).

Lipazlar endüstride gıda, süt, kişisel bakım, kağıt üretimi, deterjan endüstrisi, oleokimya, biyosüpfaktanların üretimi, beslenme, deri, kağıt, çevre yönetimi, çay işleme, biyosensör, parfümeri gibi alanlarda kullanımı mevcuttur. Lipazlar, gelişen koşullarda DNA rekombinasyonunda gen teknolojisi ve biyomühendislikte önemli gelişmelerde yer almaktadır. Lipazlar çevre faaliyetlerinde de faal olarak kullanılan enzimlerdir. Atık yağların temizlenmesi ve birtakım zirai faaliyetlerde de lipazdan aktif şekilde yararlanılmaktadır (Gündoğdu ve Kuruüzüm-Uz, 2021).

### 3.4.1. Gıda Endüstrisinde Lipazlar

Gelişen dünya koşullarında kimyevi proseslerin yerini enzimler almakta ve lipazın değişen koşullara uyumu sayesinde birçok endüstri alanında kullanımını kolaylaştırmıştır. Peynir, çorba tereyağı ve soslarda kullanımı giderek artmıştır. Lipazlar yiyeceklere daha çok hacimli yapı kazandırarak, fresh bir koku, daha leziz yiyecekler daha kısa halkalı yağ asitleri alkol esteri eldesi ve lezzet çoğaltmak amacıyla yiyeceklere takviye edilir (Gündoğdu ve Kuruüzüm-Uz, 2021; Öztürk, 2002).

Daha küçük yapıları mikro canlılar, hayati maddelerin daha kısa ömürlü olmasına neden olabilmektedirler. Lipazlar bu konuda devreye girerek canlıya hangi noktada zarar geldiğini kolaylıkla ortaya çıkarılmasını sağlar. Atık yapılar böylece canlıdan uzaklaştırılabilmektedir. Gıdaların ana yapılarının kaybolması çürümeye neden olan psikotorof yapısında daha işlevsel olduğu araştırmalarda gözlemlenmiştir (Pandey, vd., 1999).

Tohum yağları-katı yağ, şeker ilaveli gıdalar, unlu mamüller, hayvansal yağlar, baklagiller gibi yaşam evrelerimizde kullandığımız pek çok üründe lipazdan eserler görebiliriz. Sıcak içecekler için üretilen sütlü krema; pasta, börek ve sıvı içeceklere lipaz takviyesi ile aktifleştirilerek kremasyon şekliyle elde edilir (Seren, 2013).

Lipazların çok farklı elde edilme yöntemleri de mevcuttur. Fırınlarda kullanılan bu lipaz enzimi ekmeklerin iç hacmini arttırmak, ekmeğin raf ömrünü uzatmak ve olası bir esmerleşmenin önüne geçmek için kullanılır (Hasan, Shah ve Hameed, 2009).

Sütte bulunan yağların hidrolizinde de aktif bir şekilde görev almaktadır. Farklı özellikler gösteren lipitlerde söz konusudur. Buradaki lipazın performansı yağ asitleri gliseritte yer alırken bu rotasyon değiştirilirse farklı yağ asitlerinin başka rotasyonlara bağlanması sağlanır. Böylelikle lipid azaltılarak hem daha ucuz hem daha kaliteli yağ elde edilmiş olmaktadır. Lipazlar fermante olabilen ürünler olan salam, sosis gibi gıdaların olgunlaşması aşamalarında kullanılmaktadırlar. Fermantasyon işlemleri esnasında serbest kalan uzun zincirli yağ asitlerindeki birtakım değişiklikler gözlenmiş bunların belirlenmesinde lipaz önemli bir etken olmuştur. Ayrıca rafinerizasyon işlemlerin de pirincin tadının iyileştirilmesi, elma suyunun fermante işlemleri, soya sütünün iyileştirilmesi ve aromatik yapı kazanmalarında kullanılmıştır (Hasan, Shah ve Hameed, 2006).

### 3.4.2. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar

Deterjan sektöründe kullanılan lipazlar çevreci yapılarıyla öne çıkmaktadır. Kimyasal kullanımının indirgenmesi canlılık ve doğal yaşamı olumlu yönde etkilemektedir. Deterjanların düşük ısılarda dahi aktifliğini koruması artan enerji ihtiyacına karşı çözüm olmaktadır. Yağ lekelerinin ana kaynağı olan trigliseritlerin sayıca fazla olması substrata karşı göstermiş oldukları özgüllük, 30°C ve 60°C sıcaklık aralıklarında çalışmaları, pH'ın 10-11 olduğu aralıklar alması, enzim stabilliğinin değişmeden 24 'te kalması gibi çeşitli durumlardan ötürü lipaz enzimi deterjan sektörünün aranan enzimi olmuştur. Çevreye zararlı kalıntı bırakmazlar ve biyolojik olarak çabuk parçalanabilmektedirler (Sharma, vd., 2002).

Ayrıca lipaz enziminin yağları hidroliz edebilme yetisi de bu enzimi sektörde önemli kılmaktadır. Deterjanlar içeriğindeki lipaz enzimi formu sayesinde lekelerle karşı olağan bir temizleme sağlamaktadır. 1998 yılına yakın *Pseudomonas alcaligenes* M-1 sayesinde çıkarılan alkali lipaz varlığında yağ içeriği olan kirlerin çok daha çabuk bir şekilde çıktığı gözlemlenmiştir. *Candida rugosa* lipazı yaptığı çalışmalar sonucu sabun elde etmek amacıyla Japonya'da bulunan bilim insanı Miyoshi Yushi ile kendi üretim atölyesinde kullandığı katı yağlar hem de sıvı yağların hidrolizinde lipazı kullanılmıştır (Schmid ve Verger, 1998).

Lipazların deterjan formülasyonundaki bozucu etkiye sahip olan yüzey aktif maddelere karşı dayanabilme sağladığı da gözlemlenmiştir (Cardenas, vd., 2001; Yeoh, Wong ve Lin, 1986; Wang, vd., 1995).

Lipazlar, deterjan sektörünün yanı sıra temizleyici özellikleri ile de tercih edilmektedirler. Kuru temizleme, borularda tıkanmış kalmış yağ parçacıklarının temizlenme işlemlerinde, kontak lenslerin temizlenmesinde, deri yüzeylerin temizlenmesinde, yeşil ve çevreci yapısıyla bu alanda da kendine yer bulunmaktadır. lipaz enzimi, kumaşların içerisindeki lifli yapıdaki yağları çözerek daha yumuşak bir yapıya bozulmadan kalmasını sağlayarak kumaşlara eski parlaklık yeteneğini kazandırmaktadır (Sağiroğlu ve Arabacı, 2005).

### 3.4.3. Kağıt Endüstrisinde Lipazlar

Lipaz enzimi kağıt endüstrisinde beyazlatma işlemlerinde kullanılmaktadır. Kğıdın beyaz rengini veren ise fungal lipazıdır. Hidrofobik yüzeylerdeki trigliseritler ve

balmumları kağıt hamurunun üretim aşamasında ve kağıt hamuru içerisinde yapıyı bozmaktadır. Lipaz enzimi ise bu yapılardaki zift ve yağı uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Japonya bu konuda yaptığı çalışmada %90'a kadar hidrolizi sağlamak için mantar lipazını kullanmıştır (Jaeger ve Reetz, 1998).

#### **3.4.4. Oleokimyasal Endüstride Lipazlar**

Oleokimya endüstrisi ele alınırken lipazların kullanım alanı öncelikle alkoliz ve asidolizdir. Lipaz, ısı koşulların ve enerji kaybının en aza indirgemesini sağlamaktadır. Bu aşamada lipaz enzimi önem arz etmektedir (Packter, 1994).

#### **3.4.5. Biyodizel Üretiminde Lipazlar**

Dünya genelinde artan nüfusla beraber enerji ihtiyacı da giderek gün yüzüne çıkmaktadır. Bu bağlamda aspir tohumu, kanola, soya gibi yağlı tohumlar alternatif yakıtlar olarak üretilmeye çalışılmakta bununla ilgili çeşitli kimyevi prosesler izlenmektedir. Yine bitkisel kökenli yağlardan biyodizel ve alkolizasyon üretimi de mevcuttur. Endüstride artan maliyetler katalizör kullanımını da zorlaştırmış bu bağlamda lipaz enziminin katalizör olarak kullanılması artan maliyetleri azaltıcı etkide yapabilmektedir (Chen, vd., 2009).

Biyodizel üretiminde yine fosil yakıtlardan yararlanılsa da bu çok ekonomik olmayan bir yöntemdir ve kolay değildir. Bu nedenle yenilenebilir ve ayrışabilir enerji kaynağı olan biyodizel aspiden, soya fasulyesi, pamuk yağı ve hurma yağından vb. kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bitkisel yağlar kullanılarak elde edilen biyodizel transesterifikasyon enzimatik yöntemi ile kolayca üretilmektedir (Fidan ve Alkan, 2014).

Lipazlar bazı biyodizel üretim aşamalarında katalizör görevi de görmektedirler. Kullanılan biyokatalitik yöntemlerle beraber biyodizel üretimi sağlanmaya çalışılmaktadır. Endüstriyel yöntemlerde artan maliyetler sebebiyle katalizörlerde pahalıdır ve *Rhizopus oryzae* mikroorganizmasından elde edilen lipaz alternatif bir katalizör olarak biyodizel üretiminde kullanılmıştır (Iso, vd., 2001).

#### **3.4.6. Organik Madde Sentezinde Lipazlar**

Çeşitli organik tepkimelerde hidrofilik ve lipofilik yüzeylerde çözücü olarak enzimler kullanılmaktadır. Böylelikle organik olan maddelerin sentezlenmesinde; lipaz enzimi kullanılmaktadır. Tepkimelerin seyrini suyun durumu belirlemektedir. Burada

lipaz enzimi de devreye girerek reaksiyonunun hangi yönde ilerlemesi gerektiğini belirleyici unsur olmaktadır. Bu tepkimelerde suyun varlığı hidroliz tepkimesi oluşturur, su kullanılmaz ya da eser miktarda kullanılır ise esterefikasyon reaksiyonuna dönüşür (Hasan, Shah ve Hameed, 2006).

### **3.5. LİPAZ AKTİVİTE TAYİNİ**

Lipazların serbest yağ asitlerine ve glisorele dönüşümünde trigiliseridlerin parçalanması durumu söz konusudur. Lipaz ile ilgili çalışmalar yapılırken çok çeşitli yöntemlere başvurulmaktadır. Bunların bilinen yöntemlerinden florimetri yüzey gerilim yöntemi, spektrofotometrik ve titrimetrik yöntemler ayrıca sıvı kromatografisi (HPLC) metotları kullanılmaktadır ve bu yöntemlerle serbest yağ asitlerinin tahmini kolayca yapılabilmektedir. Bunların arasında en çok titrimetrik (titrasyona dayalı) yöntemler ve spektrofotometrik yöntemler işlemlerde kullanılmaktadır (Tırançioğlu, 2017).



**DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**  
**MATERYAL VE METOT**

## 4.1. MATERYAL

### 4.1.1. Kullanılan Kimyevi Malzemeler

Kullanılan kimyevi maddeler arasında; metanol, Tris, gum arabik, sodyumdeoksikolat, tetrametiletilendiamin, glisin, sodyumhidrojenkarbonat, gliserol, sodyumhidrojenfosfat, Coomassie Brilliant Blue R250, sodyumdihidrojenfosfat, aseton, Sephadex G-100, SDS (sodyumdodesilsülfat), amonyum sülfat, asetik asit, sigma-Aldrich, merck, metilenbisakrilamit, 2-Merkapto etanol, bromfenolblue yer alır.

Çalışmalarda kullanılan aspir tohumu ve zeytinyağı piyasadan temin edilmiştir.

### 4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Peristaltik Pompa: Ismatec Reglo Digital
- pH Metre: Mettler Toledo
- Analitik Terazisi: SHIMADZU ATX220
- Spektrofotometre: Pharmaspec UV-1700 Shimadzu
- Vorteks: Heidolp reax Top
- Soğutmalı Santrifüj: Sigma K-30
- Su Banyosu: DAIHAN WB-11
- Elektroforez Tankı: HEALTEC MiniGES Elite300
- Elektroforez Güç Kaynağı: HEALTEC Elite300
- Mikropipetler: Brand Transferpette S
- Saf Su Cihazı: Merck Millipore
- Öğütücü: SİNBO Ev tipi
- Buzdolabı: Ev tipi
- Etüv: BINDER ED56
- Termostat ve Hız Ayarlı Karıştırıcı: MS-H380 Pro Magnetic Hotplate Stirre
- Buz Makinesi: Follett

### 4.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- 0,1 M pH:7,0 fosfat tamponu için; 5,4603 g sodyumdihidrojenfosfat tartıldı. pH'ı 1,0 M NaOH ile 7,0'a getirildi. Hacmi de 350 mL'ye tamamlandı.
- %10'luk gum arabic için; 18 g gum arabic tartıldı ve 180 ml suda çözülmesi sağlandı. Üzerine 21 mL zeytinyağı ve 15 g buz takviyesi yapıldı.

- Sodyum deoksikolat için; 0,8 g olarak alınan sodyumdeoksikolat tartıldı ve 50 mL saf suda karıştırılarak çözülmesi sağlandı.
- 0,05 M pH:7'de Tris tamponu için; 0,606 g katı Tris tartıldı. pH'ı 1 M da HCl kullanılarak hacmi 100 ml olacak şekilde pH 7' ye sabitlendi.
- 0,05 M sodyumhidrojenfosfat tamponu ayarlamak için; 15,601 g sodyumhidrojenfosfat tartıldı ve 1,0 M NaOH ile hacmi 200 mL'ye getirmek için pH 7'ye ayarlandı.
- 1,0 M Tris-HCl pH:8,8 tamponu dengelemek için; Tris 12,114 g tartıldı ve yaklaşık 60 ml' de çözülme yapıldıktan sonra pH:8,8'e 1,0 M HCl ile ayarlanıp, son hacimin 100 ml'ye kadar getirilmesi sağlandı. Ayarlanan Tris-HCl tamponu 4°C'de kaldırılıp saklandı.
- %40 Akrilamid için; 19,48 g kullanılan akrilamid, 0,52 g bis-akrilamid 50 mL son hacimsel çözüldü.
- %10 Amonyum persülfat için; 0,1 g alınan amonyum persülfat 1 mL destile suda çözüldü.
- %10 SDS için; 4 g SDS 40 mL destile suda çözüldü.
- Çözeltiyi yıkama yapmak için; %10 metanol, %7 asetik asit olacak şekilde hazırlandı.
- NaOH çözeltisi için; 0,1 g NaOH tartıldı ve hacmi 250 ml'ye tamamlandı.
- 1,0 M Tris-HCl pH 6,8 için; Tris 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 getirildi. Ayarlanan Tris-HCl tamponu 4°C'de muhafaza edildi.
- Folin Reaktifi hazırlamak için; 0,5 mL folin reaktifi ile 0,6 mL saf su karıştırıldı.
- 6X Numune yükleme çözeltisi için; %60 gliserol, 300 mM Tris-HCl pH 6,8, 12 mM EDTA, %12 SDS, 864 mM  $\beta$ -merkaptoetenol ve %0,05 bromofenol blue. 10 mL hazırlamak için; 6 mL gliserol, 3 mL 1 M Tris-HCl pH:6,8, 0,035 g EDTA 1,2 g SDS, 60 mL  $\beta$ -merkaptoetenol, 0,05 g bromofenol blue birbirine karıştırılarak 6X numunesi hazırlandı.

## 4.2. METOTLAR

### 4.2.1. Homojenat Hazırlanması

Aspir tohumundan lipaz enziminin karakterizasyonunun yapılabilmesi amacıyla yağlı bir tohum olan aspiden bünyesinde olan proteinlerin yağ uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi. Yağsızlaştırmanın ilk basamaklarında aktiviteye en az zarar vermesi ve yağ uzaklaştırmada aktif görev alan bir çözücü olması nedeniyle aseton kullanıldı.

Aspir tohumları yağsızlaştırma işlem basamakları sırasıyla aşağıda verilmektedir.

İlk önce 150 g aspir tohumu tartılarak öğütüldü. Üzerine üç katı olacak şekilde 450 mL aseton (+4 °C) eklenerek 40 dk manyetik karıştırıcıda buz banyosunda karıştırıldı. İyice karıştığı gözlenen aspir tohumları süzgeç kağıdı yardımı ile süzüldü (bu işlem esnasında arındırma işlemi için 100 mL ilave aseton eklenildi). Yağından arınan aspir homojenatı alınarak desikatöre konulup 1 gece (+4°C) var olan asetondan uçurulması sağlandı. Hassas terazide aspir tohumu homejenatı 124,5 g olarak tartıldı.

Asetonu uzaklaştırma işleminin ardından 0,1 M ve pH:7 olacak şekilde hazırlanan homojenatın 6 katı kadar olacak şekilde 747 mL (750 mL olarak hazırlandı) fosfat tamponu ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) içinde 24 saat olacak şekilde (+4°C) buzdolabında manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak bekletildi. Bir gece bekletildikten sonra yağından uzaklaştırılan aspir tohumu süzgeç kağıdından geçirildi ve çöken kütle atıldı. Ardından kalan homojenat 20.000 rpm'de santrifüjlendi, dibe çöken posa kısmı atılıp, süpernatant kısmı amonyum sülfat çöktürmesi için buzluğa kaldırıldı.

### 4.2.2. Aktivite Tayini Yöntemleri

Homojenatla amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra hazırlanan %10'luk gum arabic'den 10 mL, sodyumdeoksikolat'dan 2mL ve tris 0,05M Tris (pH 7,0) tamponundan 4 mL ilave edilerek birbirine karıştırıldı. Sıcaklık 37 °C sabitlendi ve pH 7'ye ayarlandı. Üzerine 1 mL enzim ilave edilerek 5 dakika boyunca pH'nın düşmesi beklenildi. Süre geçtikten sonra pH'nın yeniden 7 olması için 0,01 M NaOH ile titre edildi. Ardından harcanılan NaOH miktarı kaydedildi. Harcanılan NaOH miktarına göre aktivite hesaplaması yapıldı.

Aktivite değerleri aşağıda belirtildiği şekilde hesaplandı.

$$\text{Hacimsel Aktivite (U/mL)} = \frac{(\text{Harcanan NaOH miktarı} \times 0,01 \text{ M NaOH})/\text{dk}}{\text{Enzim çözeltilisi hacmi}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = \frac{\text{Hacimsel Aktivite (U/mL)}}{\text{Enzim çözeltilisindeki protein miktarı (mg/mL)}}$$

#### 4.2.3. Lowry Protein Tayini

Bitki örneklerinden elde edilen yapılarda protein tayini metodu olarak genellikle Lowry metodu kullanılmaktadır. Bu yöntem Folin Lowry yöntemi olarak da adlandırılmaktadır. Biüre reaktifinden yararlanılarak oluşan bakır-protein bileşeni, fosfomolibdik ve fosfotungstik asit ile indirgendikten sonra ortamda değişim varlığı koyu mavi olacak şekilde renk oluşumu gözlenir. Uygulanan bu metot 0,05- 0,5 mg/mL'ye kadar duyarlıdır fakat pH'ya bağımlıdır (Lowry, vd., 1951).

Lowry işlemine tabi tutmak için Aspir tohumlarından toplanan ekstrak belirli bir süre vortekslendi. Karanlık bir ortama alınan çözeltili 20 dk inkübasyona konuldu. Ardından içerisine ilave edilen folin ayracı tüpe konularak tekrar vorteks işlemi uygulandı ve 30 dk süreyle tekrar inkübasyon yaptırıldı. Absorbans değerleri 750 nm'de kör numuneye (destile su) karşı okundu.

Kör numune işleminde, lowry çözeltilisi ve destile su çözeltilisinden oluşan standartlar ve örnek tekrar aynı işlemlerden geçirildi. Absorbans değerleri spektrofotometri cihazında okunup konsantrasyon grafikleri olarak gösterildi.

#### 4.2.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürme işlemi için ayrılan süpernatantın 300 mL kadarı kullanıldı. %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve son aşamada %20-80 aralıklarında uygun doyma noktasına erişim noktaları tespit edilmeye çalışıldı. Ham ekstrakta buz banyosu içerisinde katı amonyum sülfat az miktarda ve yavaş yavaş ilave edilip tuz yapının tekrar atılmasına kadar tamamen çözünmesine dikkat edildi. Bu şekilde yaklaşık 3 saat tuz ilavesi yapıldı. Her doygunluk ilavesinden sonra 20.000 rpm'de 4°C olacak şekilde 15

dakika santrifüj edildi ve her aralık için kullanılacak olan katı sülfat, tüm çöktürme basamaklarında ayrı ayrı protein içeriğine aktivite tayinleri işlemleri yapıldı.

$$M[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = \frac{[1,77 \times V \times (S2 - S1)]}{(3,54 - S2)}$$

M = Katı Amonyum sülfat miktarı (g)

V = Çözeltinin hacmi (mL)

S1 = 1'in kesri şeklinde olan mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2 = 2'nin kesri olacak şekilde amonyum sülfat doygunluğu

Gerekli santrifüj işlemlerinden sonra çıkarılan peletler 0,05 M pH:7 olan fosfat tamponu eklenerek çözüldü ve çözülen peletlerin hepsinde protein ve aktivite tayinlerine bakıldı. Gerekli aktivite %20-%80 aralığında sağlandı.

pH:7,0 ve 0,05 M fosfat tamponunda çözülen peletlerin bir kısmı protein tayini için bir kısmı aktivite tayini için buzlukta saklandı, geri kalan ise diyaliz işleminde kullanıldı.

Diyaliz işlemi için diyaliz torbası hazırlanırken içerisine hava dolmayacak şekilde kapatılması sağlandı. Bu diyaliz torbası daha önce hazırlanmış olan 0,05 M pH:7,0 fosfat tamponuna daldırıldı. Tampon çözeltisine daldırılan diyaliz torbası 4°C'de buzdolabına alındı ve her 8 saatte bir tampon değiştirilerek 24 saat içinde işlemler tamamlandı. Diyaliz işlemlerinden sonra yapılan aktivite ve protein tayinlerinde aktivite gözlenmediği için diyaliz işlemi yapılmadan kolona aktarıldı.

#### 4.2.5. Sephadex® Jel Hazırlanması

2 g Sephadex® G-100 100 mL, 0,1 M pH:7,0 fosfat tamponu içerisine konularak 24 saat beklemenin ardından ve kolona aktarımı yapıldı. Kolon dengelenene kadar (jelin çatlamaması için dikkat edildi) tampon çözeltisi ilavesiyle jelin yıkaması sağlandı. Kolonun dengeye gelip gelmediğini bilmek için, kolona eklenen ve bu ekleden sonra alttan alınan tamponun pH'ı ve 280 nm'deki absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü. Homojenat dengelemesi kolona dikkatlice fosfat tamponu eklenerek fraksiyonlar halinde eluatların kolondan üçer mL'lik olacak şekilde tüplere yerleştirilmesi sağlandı.

#### 4.2.6. Safılaştırılan Proteinlerin SDS-PAGE ile Karakterizasyonu

Safılaştırılan proteinlerin SDS-PAGE ile karakterizasyonu için %12'lik ayrıştırma jeli üzerine %3,75'lik yığıma jeli ilave edildi. Belirlenen kuyuya numuneler yüklendikten sonra 100V'da yaklaşık 2 saat 10 dk olacak şekilde yürütüldü. Kuyulardan bir tanesinin marker ile doldurulması sağlandı. Vorteks ile sabit hızda karıştırılarak kuyuların boyanması yapıldı.

Boyama işleminden emin olunduktan sonra yıkama işlemine geçildi. Boyama için; %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250 çözeltisi yapıldı. Yıkama için; %10 metanol ve %7'lik asetik asit içeren renksizleştirme çözeltisi hazırlandı. Jel tamamen temizleninceye kadar yıkamalar tekrarlandı.

#### 4.2.7. Optimum pH Çalışmaları

Enzimin gerekli aktiviteyi verdiği pH değerlerini belirlemek amacı ile pH:4-13,2 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı ve lipazın kararlı aktiviteyi verdiği pH aralıkları bulundu.

#### 4.2.8. Optimum Sıcaklık Çalışmaları

Enzimin gerekli aktiviteyi verdiği sıcaklık değerlerini bulabilmek amacıyla 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C'lerde 6 farklı sıcaklıklarda çalışıldı. Bu çalışmaların sonunda en yüksek hidrolitik aktiviteyi veren sıcaklık belirlendi.

#### 4.2.9. Stabil pH Çalışmaları

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği stabil pH değerlerini belirlemek amacı ile pH:11,6, 12, 12,4, 12,8 ve 13,2 arasındaki 0,1M sodyumhidrojenfosfat tamponu hazırlandı. Bu tampon değerleri aralığında çalışılarak enzim aktivite ölçümleri yapıldı ve aspir tohumu lipazının stabil olduğu pH belirlendi. Stabil sıcaklıklarda tekrarlanan amonyum sülfat çöktürmesi sonrası %20-%80 aralığı tekrar çöktürüldü ve pH:12 olacak şekilde çalışıldı.

#### 4.2.10. Stabil Sıcaklık Çalışmaları

Enzimin gerekli olan aktiviteyi gösterdiği stabil sıcaklık değerini belirlemek için 20,30, 40, 50, 60, sıcaklıklarda 5 farklı deneme yapıldı. Bu denemelerin sonunda gerekli aktiviteye ulaşabildiğimiz stabil sıcaklık bulunuldu.

#### 4.2.11. Depo Kararlılığı Tayini

Jel filtrasyonu kromatografisinden sonra toplanılan enzimler belli bir süre soğutucuda alındı. Alınan bu numunelerin beşer gün aralıklarda aktivite tayini yapıldı. Böylece enzimin aktivitesini koruduğu gün oranı belirlenmiş oldu.

#### 4.2.12. $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Belirlenmesi

$K_m$  değeri, enzimin maksimum hızının yarısına eşit olan başlangıç hızına karşılık gelen substrat konsantrasyonu olarak ifade edilir. Ortamda bulunan tüm enzim taneciklerinin aktif kısımlarının sadece yarısını dolduran substrat miktarı olarak adlandırılır. Değişik konsantrasyonlardaki substrat değerleri kullanmak,  $K_m$  değerini net olarak bulabilmek için önem arz etmektedir (Altınışık, 2009).

Enzim saflaştırma çalışmalarında ve farklı dokulardaki enzim aktivitelerinin saptanmasında  $K_m$  ve  $V_{max}$  arasındaki eşitlik daha kolay sonuçlar verir. Böylece enzimin substratına ilgisini belirlemede de kullanılmış olur.

- $K_m$ , bir enzime ve o enzimin substratına özgüdür.
- Enzimin substratına karşı ilgisini açıklayan kavramdır.
- $K_m = \text{mol/L}$  olarak ifade edilir.
- Sıcaklık, substratın yapısına bağlı olarak  $K_m$  değeri değişiklikler gösterebilmektedir (Akbulut, 2014).

Enzim kaynağı olarak kullanılan eluatın  $K_m$  ve  $V_{max}$  kinetik sabitlerini bulmak için sabit hacmine karşılık, substrat olarak kullanılan trioleini farklı derişimlerde (10, 20, 50, 100, 200 ,500 mM) kullanarak aktivite tayini yapıldı.



**BEŞİNCİ BÖLÜM**  
**SONUÇ ve TARTIŞMA**

## 5.1. SONUÇ

Yapılan aktivite çalışmaları değerlendirilmiş tablolar ve grafikler halinde gösterilmiştir.

### 5.1.1. Aspir Tohumu Lipazının Hidrolitik Aktivitesinin Tayini

Enzimin su bazlı aktivitesini tayin etmek için, lipazın hidrolize ettiği yağ asitlerinin, NaOH ile titrasyonunu temel alan titrasyon bir yöntemi ile aktivite tayini yapıldı.

**Tablo 5.1: Saflaştırma Basamakları**

Saflaştırma basamağı	Aktivite (EU/mL)	Spesifik aktivite (EU/mg.protein)
Homojenat	2,12	0,043
Jel Fraksiyon	9,1	0,364

Tablo 5.1’de elde ettiğimiz verilerden saflaştırma işleminde yüksek hidrolitik spesifik aktiviteyi jel fraksiyonu göstermiştir. Ham ekstrakt çözeltisi yaklaşık 9 kat (8,47) artmıştır.

### 5.1.2. Aspir Tohumundan Saflaşan Lipaz Enziminin Saflaştırma Basamakları

Saflaştırılması yapılan homojenat pelletlerin enzimsel aktivite değerleri bulunmuştur. Tablo 5.2’de gösterilmektedir.

**Tablo 5.2: Aspir Tohumundan Saflaşan Lipaz Değerleri**

İŞLEM	Aktivite (EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg Protein)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	2,12	150	49	7350	318	0,043	1
Sephadex G-100	9,1	3	25	75	27,3	0,364	8,47

### 5.1.3. Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Optimum pH'nın Belirlenmesi

Enzimin gerekli yüksek aktiviteyi gösterdiği pH değerlerini tespit edebilmek amacıyla pH: 4- 4,4- 4,8- 5,2 ve 5,6'da 0,1 M 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'de ve 9,2 tris tamponları, pH 9,6-10,0-10,4-10,8 ve 11,2'de 0,1 M sodyumbihidrojenkarbonat tamponları pH ve 11,6-12,0- 12,4-12,8,13,2 0,1 M sodyumhidrojenfosfat tampon çözeltileri hazırlandı.

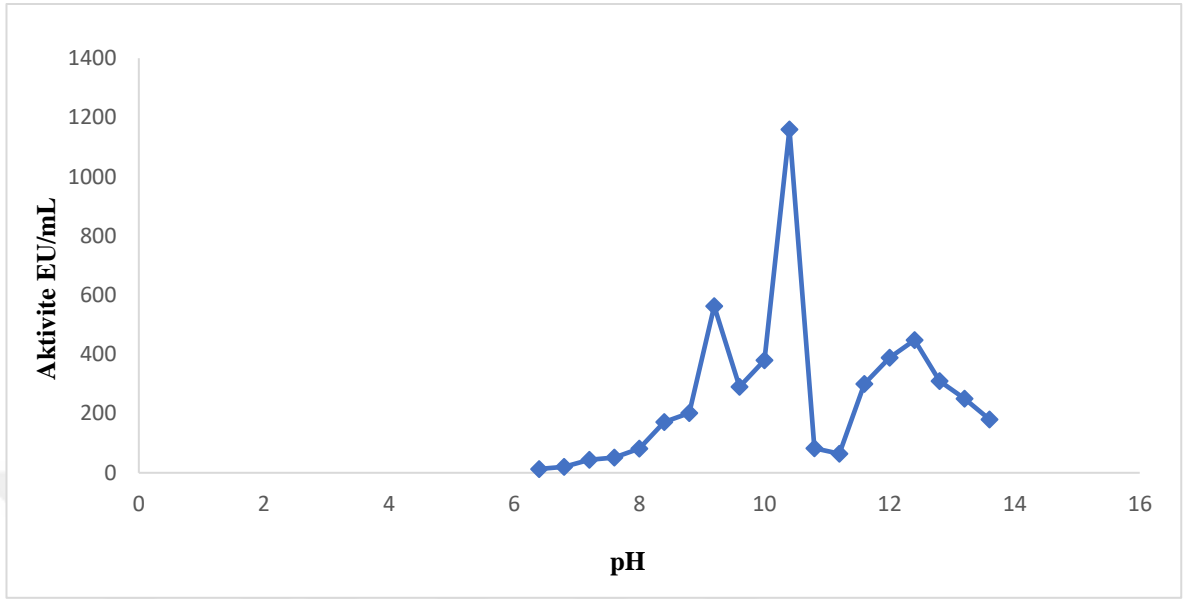
Optimum pH değerleri çalışılırken jel kolonundan elde edilen 13-14-15-16 nolu enzimlerin oluşturduğu tüplerden havuz oluşturuldu ve yapılan saflaştırma işlemleri için havuzundan enzim kullanıldı. Absorbans değerleri çok çok yakın olduğundan dolayı bir sakınca görülmedi. Ayrıca asetik tampon çözeltilerinde aktivite gözlenmedi (pH: 4- 4,4- 4, -5,2- 5,6). Saflaşan lipaz enziminin optimum pH değerleri Tablo 5.3'de verilmektedir.

Bu tamponlardan yararlanılarak aspir tohumunun, daha önce lipazın su bazlı aktivite tayinlerine bakıldı ve enzimin gerekli değeri pH'taki karşılığı 10,4 olarak belirlendi.

**Tablo 5.3: Saflaşan Lipaz Enziminin Optimum pH Değerleri**

pH	Aktivite(EU/ mL)	pH	Aktivite(EU/mL)
4,0	-	9,2	563
4,4	-	9,6	290
4,8	-	10,0	380
5,2	-	10,4	1160
5,6	-	10,8	83
6,4	13	11,2	64
6,8	20	11,6	300
7,2	44	12,0	389
7,6	52	12,4	448
8,0	82	12,8	310
8,4	172	13,2	250
8,8	202	13,6	180

**Şekil 5.1:** Aspirden Safılaştırılan Lipaza Karşı Optimum pH'ı



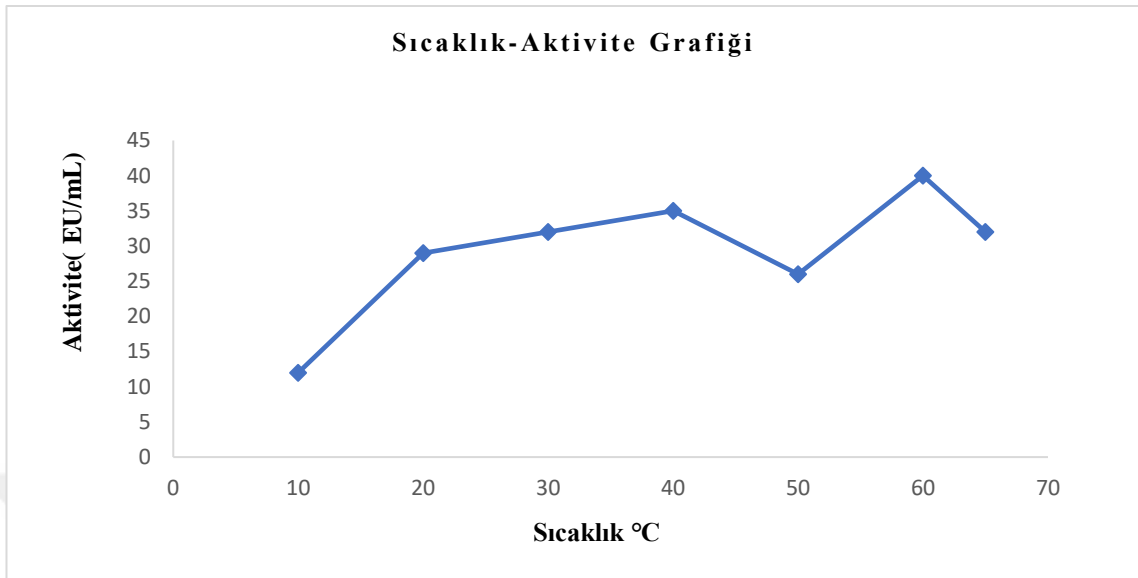
#### 5.1.4. Aspir Tohumundan Safılaştırılan Lipazın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

10°C-60°C'de pH:12,0 karşılığında 1M NaOH ile aspir tohumu lipazının su bazlı aktivitesi ölçüldü tespit edilen aktivitenin gerekli sıcaklığı 60°C olarak tespit edildi.

**Tablo 5.4:** Safılaştırılan Lipazın Optimum Sıcaklık Değerleri.

	Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/mL)
1	10	12
2	20	29
3	30	32
4	40	35
5	50	26
6	60	40
7	65	32

**Şekil 5.2:** Aspir Tohumu Lipazı Üzerine Sıcaklık Görüntüsü.



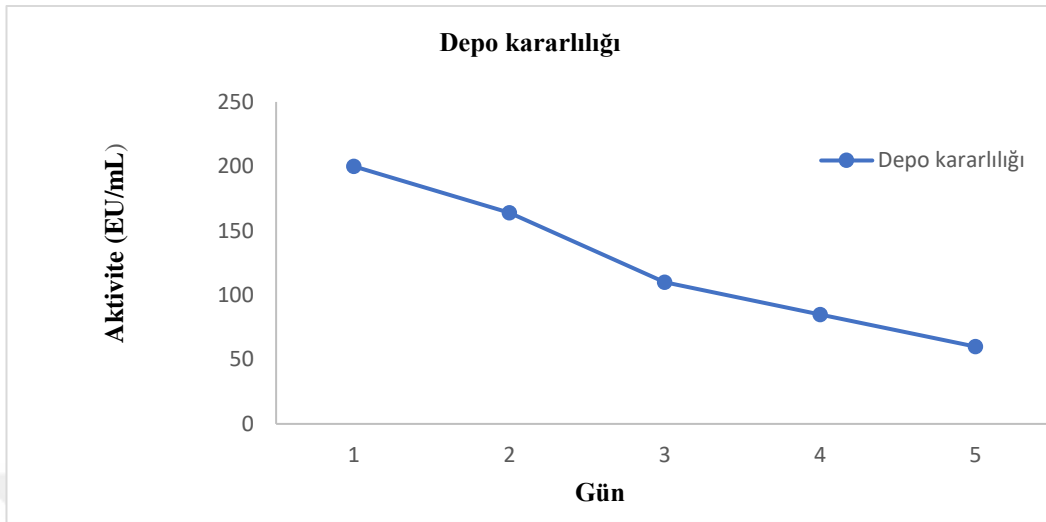
#### 5.1.5. Aspir Tohumu Lipazının Depo Kararlılığının Belirlenmesi

Aspir tohumunun yapılan pH ve stabilisyon işlemlerinin ardından sıcaklık değeri 60°C ve bikorbonat tamponundan çıkan optimum pH değerinin 10,4'te olduğu belirlendi. 5 gün olacak şekilde zeytinyağı substratı eşliğinde aspir tohumu lipazının depo kararlılığı ve aktivite değerleri ölçüldü. Aspir tohumundaki aktivite kaybının %70 olduğu belirlendi.

**Tablo 5.5:** Aspir Tohumu Lipazının Depo Kararlılığı Değerleri

Gün	Aktivite (EU/mL)
1	200
2	164
3	110
4	85
5	60

**Şekil 5.3:** Aspir Tohumu Lipazının Depo Kararlılığı



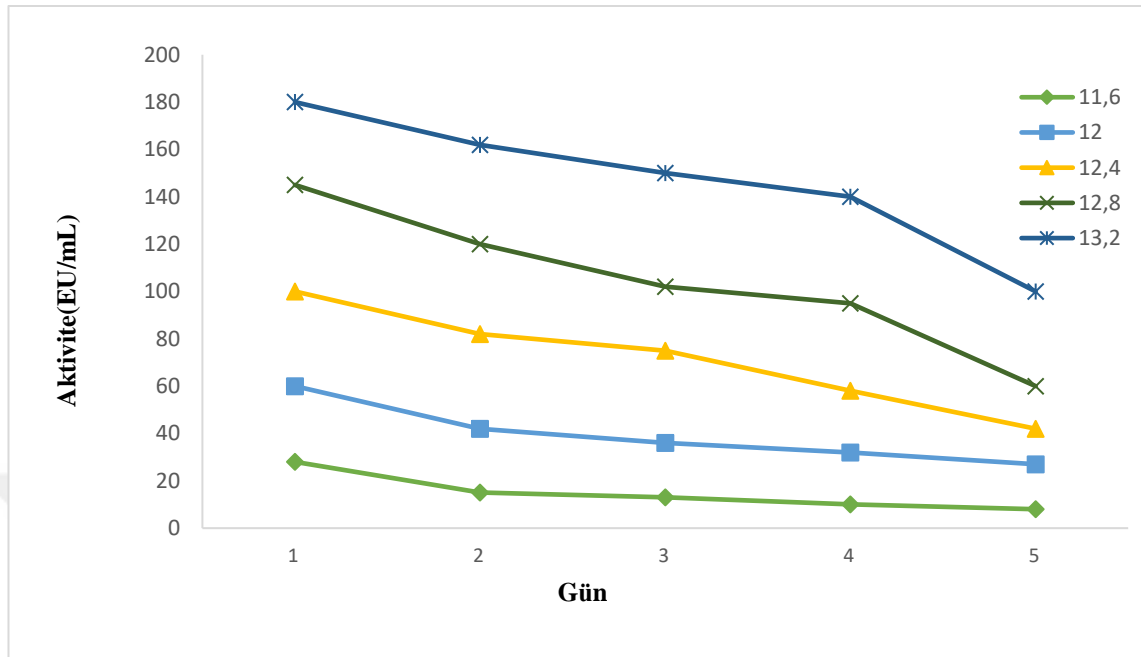
#### 5.1.6. Aspir Tohumu Lipazının Stabil pH Aktivitesinin Belirlenmesi

Stabil pH'ı lipazda belirlemek amacıyla belirlemek amacı ile sodyumhidrojenfosfat tamponu 11,6, 12, 12,4, 12,8, 13,2 ve pH'larda ve 0,1 M NaOH ile hazırlandı.

**Tablo 5.6:** Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Stabil pH Değerleri

Gün/pH	Aktivite (EU/mL)				
	11,6	12	12,4	12,8	13,2
1	28	60	100	145	180
2	15	42	82	120	162
3	13	36	75	102	150
4	10	32	58	95	140
5	8	27	42	60	100

Şekil 5.4: Aspir Tohumu Lipazının Stabil pH Aktivitesi



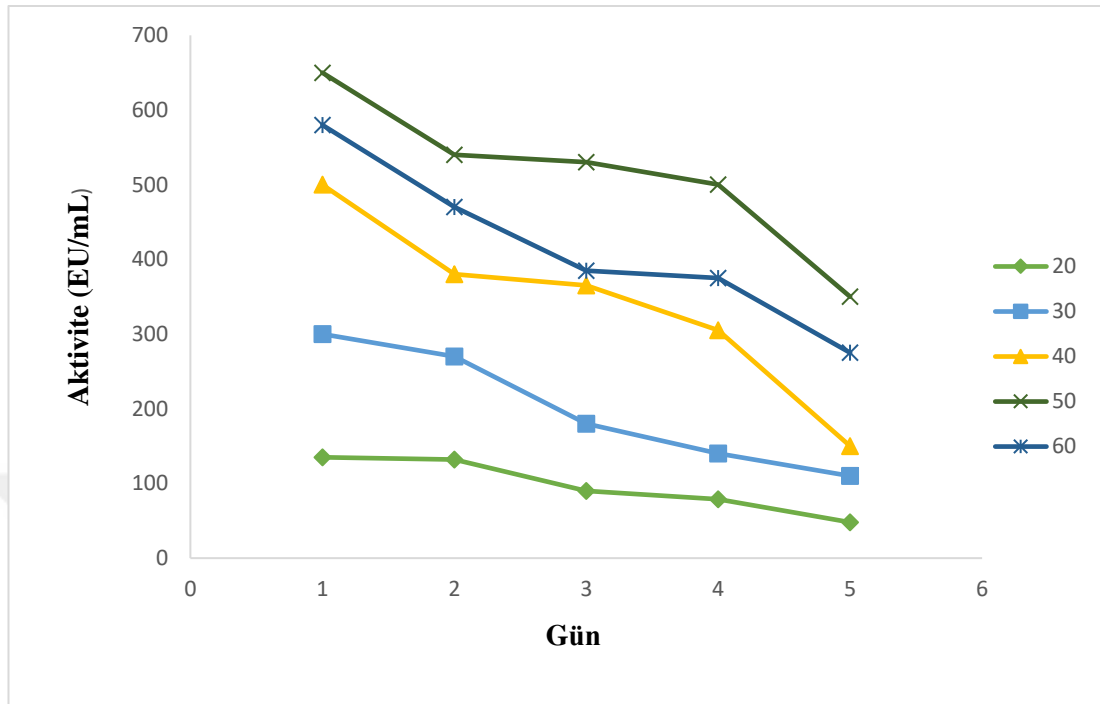
### 5.1.7. Aspir Tohumu Lipazının Stabil Sıcaklık Aktivitesinin Belirlenmesi

Aspir tohumundan elde edilen lipaz enzimin maksimum aktivite gösterdiği stabil sıcaklığı belirlemek için sıcaklıklarda 5 farklı deneme yapıldı. Bu denemelerin sonunda en yüksek hidrolitik aktiviteyi gösteren stabil sıcaklık 50°C olarak gözlemlendi.

**Tablo 5.7: Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Stabil Sıcaklık Aktivite Değerleri.**

Gün/Sıcaklık(°C)	Aktivite (EU/mL)				
	20	30	40	50	60
1	135	300	500	650	580
2	132	270	380	540	470
3	90	180	365	530	385
4	79	140	305	500	375
5	48	110	150	350	275

**Şekil 5.5:** Aspir Tohumu Lipazının Stabil Sıcaklık Aktivite Grafiği



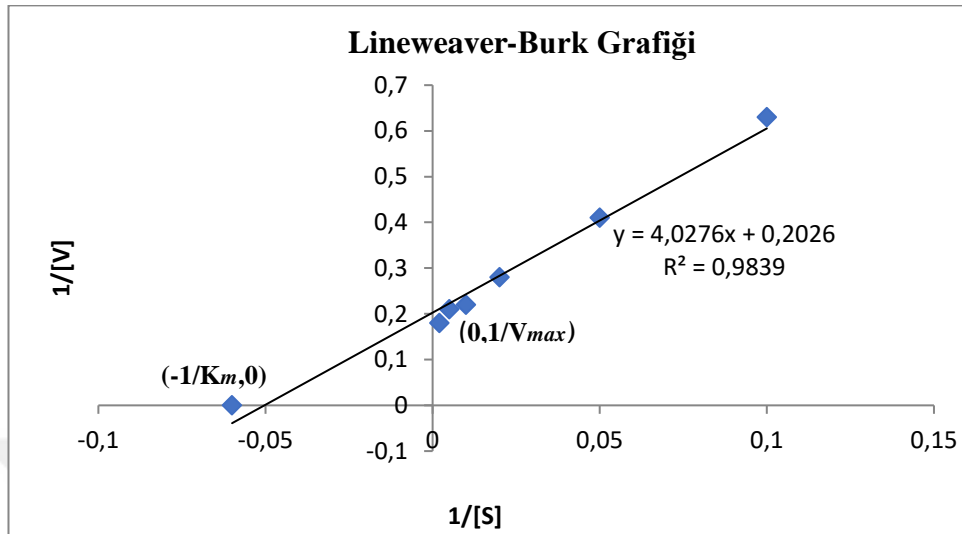
### 5.1.8. Lipaz Enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

Saflaştırma işlemlerimiz gerçekleştirilirken  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini trioleinin aracılığı ile 10, 20, 50, 100 ve 500 mM'lık derişimlerde aktivite tayinine bakıldı.

**Tablo 5.8:** Aspir Tohumundan Saflaştırılan Lipazın Farklı Substrat Derişimindeki Enzim- Aktivite Derişimi

[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)
0	0	-0,06	0
10	1,6	0,1	0,63
20	2,45	0,05	0,41
50	3,6	0,02	0,28
100	4,5	0,01	0,22
200	4,8	0,005	0,21
500	5,55	0,002	0,18

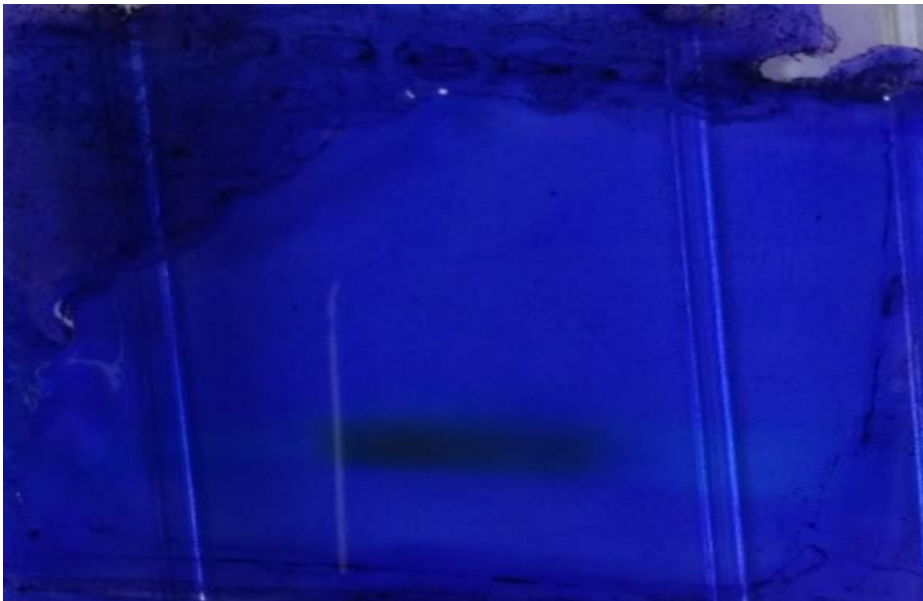
**Şekil 5.6:** Aspir Tohumundan Elde Edilen Lipazın Lineweaver-Burk Grafiği



### 5.1.9. SDS-PAGE ile Lipaz Enziminin Karakterizasyonu

Lipaz enziminin karakterizasyonunda %3,75'lik yığma jeli %12'lik ayrışma jelinin üzerine ilave edildi. Ardından numuneler kuyulara yüklendi ve 100V'da yaklaşık 2 saat 15 dk kadar yürütüldü. Boyama için; %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250 kullanıldı. Yıkama işlemini yapmak için %7'lik asetik asit ve %10'luk metanol kullanıldı. Bantların belirginleştiği gözlemlendi ve ardından fotoğraf olarak kayda alındı.

**Görsel 5.7:** Aspir Tohumu Lipazının SDS-PAGE ile Karakterizasyonu.



## 5.2. TARTIŞMA

Yenilenen ve sürekli kendini güncelleyen günümüz koşullarında enzimlere olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Teknoloji ve sanayini gelişme gösterdiği günümüzde yağlı tohumlara olan ilginin de giderek artmasına neden olmaktadır. Spesifik özellikte olmaları ve belirli kinetiğe sahip olmaları bitki, hayvan ve çeşitli mikroorganizmalardan elde ediliyor olmaları da enzimleri bu konuda çalışma alanı haline getirmiştir (Sökmen, Sarı ve Azap, 2018). Yapmış olduğumuz çalışmada aspir tohumundan, lipaz enziminin saflaştırma ve karakterizasyon işlemi yapılmıştır. Bu çalışma lipaz enziminin zayıflamada bire bir etkisi olması gözetilerek yapılmış ayrıca benzer bir çalışmanın olmaması dolayısıyla, literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Yağlı bitki tohumlarındaki yağ yapısından proteinlerin ayırt edilmesi temeline dayanan Park ve arkadaşlarının 2000 yılında uygulamış olduğu ay çekirdeği tohumundan lipaz saflaştırma çalışma tekniğine benzer şekilde, sunulan çalışmamızda aspir tohumundan lipaz saflaştırma ve karakterizasyonu uygulandı.

Yapılan çalışmalarda çözücü olarak aseton, kloroform, hekzan ve izopropanol gibi çözücüler kullanılabileceği bildirilmiştir (Park, vd., 2000). Sunulan çalışmada aseton çözücüsüyle işlem yapıldı. Aspir tohumları önce minimalist yapıda olması için öğütüldü ve proteinler yağlardan arındırılarak aseton çözücünde işleme tabi tutuldu. Hird ve arkadaşlarının 2000 yılında fındık ve yer fıstığı saflaştırması çalışması ile Park ve arkadaşlarının ayçiçeği üzerine yaptığı proteinlerin yağsızlaştırılması işlemleri baz alınarak sunulan çalışmada aspir tohumlarından lipaz saflaştırılması hedeflenmiştir. Bu saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesi, dializ ve jel filtrasyonu aşamalarından yararlanılarak saflık durumu değerlendirilmiştir.

Lipaz enziminin bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılması ve saf olarak eldesi amacıyla her saflaştırmada pH ve sıcaklık miktarlarının değiştiği bildirilmektedir (Hasan, Shah ve Hameed, 2006). Aktivite çalışmalarında enzim üzerine pH'ın etkisi araştırılmıştır. pH üzerine söz konusu birçok çalışma vardır. Buğday tohumu pH:8,0 (Kapranchikov, Zhrebtsov ve Popova, 2004) pamuk tohumu 10,8 (Akbulut, 2014) kolza tohumu pH:9,0 (Hoppe ve Theimer, 1996) pirinç kepeğinden optimum pH:11,0 (Bhardwaj, Raju ve Rajasekharan, 2001) olarak bulunmuştur. Bunların yanı sıra

mikroskopik canlılarda da pH araştırmaları yapılmış *Penicillium Aurantiogriseum* ile de optimum pH:8,0 olarak bulunmuştur.

İşlemler basamağında tepkimelerin etkinliğini göstermesi için farklı substratlar kullanılmaktadır. Probhu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, pirinç kepeği için trbini substrat olarak kullanmıştır (Bhardwaj, Raju ve Rajasekharan, 2001). Yapılan başka bir lipaz eldesi deneyinde ise Pabcci ve arkadaşları; *E.characias* bitkisinin substrat konsantrasyonunda ayçiçek yağı, tribtirin, triasetin, trikaprilin ve keten tohumu kullanmışlar ve en uygun substrat olarak trikoprilin olarak bulmuşlardır. Jinwal ve arkadaşları ise PK-12CS için zeytinyağı, triolein, tribtirin, triol amitin soya yağı, kokonat yağı, hardal yağı, kullanılmış ve en yüksek aktiviteyi badem yağında bulmuştur (Başkurt, 2005; Jinwal, vd., 2003; Tırancioğlu, 2017). Aspir tohumu kullanarak yapmış olduğumuz çalışmada ise substrat olarak zeytin yağı ve triolein kullanıldı. Yapılan değerlendirmede en yüksek aktivite zeytin yağında belirlendi.

Tohumların saflaştırılma işlemlerine göre farklı çalışmalar yapılmıştır. Demirkan 2008 yılında yapmış ceviz tohumunu kullanarak yapmış olduğu çalışmada sırayla amonyum sülfat çöktürmesi, dializ, sephadex G-100 jel filtrasyonu kromatografisi işlemleri uygulanarak lipaz enzimini 29 kat saflaştırmıştır. Palm meyvesi amonyum sülfat çöktürmesi, slfopropil-sepharose kromatografisi ve sephadex G-75 jel filtrasyonu kromatografisi aşamalarından geçirilerek 1250 kat lipaz enzimi saflaştırması yapılmıştır. Farklı bir çalışmada, elde ettikleri protein yapıya, önce amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve Pamuk tohumundan saflaşan bu değer 35 kat olurken, %80 amonyum sülfat ktrmesi California-Laurel (*Umbellularia californica*) tohumlarından yapılmıştır. Saflaşan enzimin saflığını 8-20 kat aralığında olduğu tespit edilmiştir (Saxena, vd., 2003).

Yağlı tohumlar bitki içerikleriyle, lipaz enzim aktiviteleri incelendiğinde sıcaklığında aktivite değişimlerinde ve enzimin dayanıklılığı üzerinde etkileri gözlemlenmiştir. Lipaz enziminin optimum sıcaklık değerlerinin 30°C-60°C ve stabil sıcaklıklarının da değişik aralıklarda olduğu bildirilmektedir (Chen, Danial ve Coolbear, 2003). Aspir tohumu ile yapılan çalışmada lipaz enziminin optimum sıcaklık değeri 60°C olarak bulundu. Gözlemlenen değerlere göre 60°C a kadar artan sıcaklık bu değerden sonra azalmaya başlamıştır. Diğer yapılan çalışmalarda lipazın bitkilerden eldesi

sırasındaki sıcaklık değişmeleri pamuk tohumu 50°C (Akbulut, 2014), hardal tohumu optimum sıcaklığı ise 60, palm yağı 30°C, olduğu bildirilmiştir (Tıranıoğlu, 2017).

Tohumun dayanıklılık düzeyini tespit ederken depo kararlılığı da değerlendirilmelidir. Pamuk tohumu lipazı +4 °C'de saklandığında aktivite kaybı %75 düzeyinde olduğu belirtilmiştir (Akbulut, 2014).

Saflaştırma işlemlerinden geğirilen aspir tohumu lipazının, enzim aktivitesi, optimum pH'ı ve sıcaklık, stabil sıcaklık ve pH, depo kararlılığı,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, SDS-PAGE yöntemi, protein değerleri tespit edilmiştir.

Sunulan çalışmada aspir tohumunun saflaştırılmasında amonyum sülfat, diyaliz ve jel filtrasyonu işlemleri kullanılmıştır. %20-%80 amonyum sülfat doğunluğu aspir tohumu için en yüksek su bazlı aktivite değeri tespit edilmiştir. Amonyum sülfat oktrmesi sonucu biriktirilen spernetantlar fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiş, var olan tuz yapısı diyaliz yöntemi ile giderilmeye çalışılmıştır (burada aktivitenin düştüğü gözlemlenmiştir). Aspir tohumundan lipazı saflaştırmak için uygun yöntemlerle jel kromatografisi (Sephedex G-100) işlemleri yapılmıştır. %20-80 aralığında amonyum sülfat oktrmesi sonrasında aspir tohumunun 8,47 kat saflaştığı gözlemlenmiştir.

Sunulan alışmada Aspir tohumunda da pH'ın önemli bir unsur olduğu gözlemlenmiştir. Aspir tohumundan lipaz eldesinde optimum pH:10,4 olarak tespit edilmiştir (Tablo 5.3).

**(Tablo 5.3.)**

pH	Aktivite(EU/ mL)	pH	Aktivite(EU/mL)
4,0	-	9,2	563
4,4	-	9,6	290
4,8	-	10,0	380
5,2	-	10,4	1160
5,6	-	10,8	83
6,4	13	11,2	64
6,8	20	11,6	300
7,2	44	12,0	389
7,6	52	12,4	448
8,0	82	12,8	310
8,4	172	13,2	250
8,8	202	13,6	180

Yapmış olduğumuz çalışmada aspir tohumunun 20-60°C gibi yüksek sıcaklıklarda aktivitesini ve kararlılığını koruduğu gözlemlenmiştir.

Stabil sıcaklığının belirlenmesine ilişkin Antep fıstığı tohumu üzerine yapılan çalışmada 6 gün boyunca aktivite tayini yapılmış ve bunun sonucunda 6 farklı çalışmada yüksek hidrolitik aktiviteyi veren stabil sıcaklık 30°C olarak saptanmıştır (Mercan Ülkü, 2018). Stabil sıcaklık çalışmalarımızda 5 gün süreyle vardığımız 5 farklı değer göstermiştir ki aspir tohumu en yüksek aktiviteyi 1. günde 50°C'de vermiştir. Aspir tohumu en yüksek stabil aktiviteyi ise pH: 13,2 de verdiği bulunmuştur.

**(Tablo 5.7.)**

Gün/Sıcaklık(°C)	Aktivite(EU/mL)				
	20	30	40	50	60
1	135	300	500	650	580
2	132	270	380	540	470
3	90	180	365	530	385
4	79	140	305	500	375
5	48	110	150	350	275

Çalışmamızda 60 °C'de ve pH:10,4 koşullarında 5 gün boyunca yapılan gözlemlerinde aspir tohumundan elde edilen lipaz enziminin kararlılığı 1. gün en yüksek seviyede olurken daha sonra azalma eğilimindedir ve kayıp olarak %70 değeri bulunmuştur.

**(Tablo 5.5.)**

Gün	Aktivite (EU/mL)
1	200
2	164
3	110
4	85
5	60

Saflaştırılan aspir tohumu lipazının elde edilmesiyle kinetik özellikleri belirlendi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  enzimin substrata olan ilgisini gösteren spesifik parametrelerdir.  $K_m$ ,  $V_{max}$ 'ın

yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonudur; küçük bir değer alması enzimin substrata olan ilgisinin fazla olduğunu göstermektedir.

Çizilen Lineweaver-Burk grafiğinde triolein için  $K_m$  değeri 25,49 mM ve  $V_{max}$  ise 5,6 U/dk.mg.enzim olarak bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda ise; pamuk lipazının triolein kullanılarak elde edilen  $K_m$ :17,5178 mM,  $V_{max}$ : 9,5192 U/dk.mg.enzim (Akbulut, 2014), antep fıstığı lipazının triolein kullanılmasıyla  $K_m$  :10, 948 mM ve  $V_{max}$ :7, 3223U/dk. mg enzim (Mercan Ülkü, 2018), ceviz tohumu lipazının triolein kullanılmasıyla  $K_m$  :48 mM ve  $V_{max}$ :0,0023 U/dk. mg enzim (Demirkan, 2008) olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, karakterizasyon işlemi olarak elektroforez sonuçları aspir tohumundan saflaştırılan lipazın değerlendirilmesi sonucunda istenilen veriler elde edilerek saflaştırılan lipazın aktivite ölçümlerinden sonra 8,47 kat saflaştırıldığı tespit edilmiştir. Bulgular ışığında, Aspir tohumu enerji ihtiyacının arttığı günümüz koşullarında her ortamda yetişebilme özelliği sayesinde enerji ve verim açısından biyodizel olarak kullanıma çok uygun avantajlı bir yağlı tohum olduğu söylenebilir. Koşulları iyileştirildiği takdirde bu alanda önemli işlevlere sahip olacaktır. İçeriğindeki lineloik asit miktarının çok yüksek değerlerde oluşu aspir tohumundan saflaştırılan lipazın gıda, sanayi, kozmetik gibi alanlarda kullanılmasını kolaylaştıracaktır. Lipaz enziminin saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri gözetilerek zayıflama üzerinde de etkin olan lipaz enziminin bu şekilde literatüre kazandırılması amaçlanmaktadır.

## KAYNAKÇA

- Akbulut, N. (2014). *Pamuk Tohumundan (Gossypium hirsutum L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu* (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Altınışik, M. (2009). Enzimler. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, <https://www.mustafaaltinisik.org.uk/sunularim.asp>.
- Babaoğlu, M. (2017). Dünya’da ve Türkiye’de aspir bitkisinin tarihi, kullanım alanları ve önemi. *Tarım Gündem Dergisi*, 6(36), 98-102.
- Balashev, K., vd. (2001). Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie*, 83(5), 387–397.
- Başkurt, L. (2005). *Badem (Amygdalus communis L.) Proteinlerinden Lipaz İzolasyonu ve Özelliklerinin Belirlenmesi* (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Bhardwaj, K., Raju, A. ve 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.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Enzymes. *Medical Biochemistry*, 153–175.
- Bülbül, M. (2019). *Biyokimya*. Kütahya: Gülmat.
- Cardenas, J., vd. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14, 111-123.
- Chen, L., Danial, R. M. ve Coolbear, T. (2003). Detection and Impact of Protease Lipase Activities in Milk Powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255– 275.
- Chen, Y., vd. (2009). Synthesis of biodisel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, 50, 668-673.
- Demirkan, B. (2008). *Ceviz (Juglans regia L.) Tohumu Lipazının Saflaştırılması ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi* (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

- Ergönül, P. G., & Özbek, Z. A. (2020). Cold pressed safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oil. In M. F. Ramadan (Eds.), *Cold Pressed Oils: Green Technology, Bioactive Compounds, Functionality, and Applications* (pp. 323-333). Elsevier Inc.
- Fadıloğlu, S., & Erkmen, O. (2004). Gıda Sanayinde Enzimlerin Önemi. *Gıda*, 29(5), 393-400.
- Fidan, M. S. & Alkan, E. (2014). Bitkisel Hammaddelerden Elde Edilen Biyodizelin Alternatif Enerji Kaynağı Olarak Kullanılması. *GÜFBED/GUSTIJ*, 4(2), 144-160.
- Fuciños, P., vd. (2005). Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. *Journal of Biotechnology*, 117(3), 233–241.
- Gupta, P., vd. (2009). Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Bioresource Technology*, 100, 4074–4076.
- Gündoğdu, S., & Kuruüzüm-Uz, A. (2021). Bitkisel Lipaz Kaynakları ve Kullanım Alanları. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 35-44.
- Hird, H., vd. (2000). Identification of peanut and hazelnut allergens by native two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 21, 2678-2683.
- Hoppe, A., & Theimer, R. R. (1996). Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsion. *Phytochemistry*, 42(4), 973-978.
- Hasan, F., Shah, A. A. ve Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235–251.
- Hasan, F., Shah, A. A. ve Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27, 782–798.
- Ildız, H., Unakitan, G. (2022). Aspir Üretiminin Ekonomik Analizi. *Social Sciences Research Journal*, 11(4), 567-573.

- Iso, M., vd. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, 53-58.
- Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.
- Johnson, R. C., Bergman, J. W. ve Flynn, C. R. (1999). Oil and Meal Characteristics of Core and Non-core Safflower Accessions from the USDA Collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46, 611-618.
- Jinwal, U. K., vd. (2003). Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from a Newly Isolate *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and Chemoselective Hydrolysis of Fatty Acid Ester. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 1041-1046.
- Gül, Ü. D. (2013). Fungal Lipazlar ve Endüstride Kullanım Alanları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*; 13, 1-8.
- Gündoğdu, S., & Kuruüzüm-Uz, A. (2021). Bitkisel Lipaz Kaynakları ve Kullanım Alanları. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1):35-44.
- Kapranchikov, V. S., Zherebtsov, N. A. ve Popova, T. N. (2004). Purification and characterization of lipase from wheat (*Triticum aestivum* L.) germ. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(1), 84-88.
- Keha, E., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2018). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N. (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9, 1.
- Kobuk, M., Ekinci K. ve Erbaş S. (2019). Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Genotiplerinin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(1), 89-96.
- Koç, H., & Altınel, A. (1997). Aspir'de (*Carthamus tinctorius* L.) Farklı Ekim Sıklığı ve Azot Dozlarının Verim ve Verim Öğelerine Etkisi [Sözlü Bildiri]. Türkiye II. Tarla Bitkileri Kongresi: 251-255, Samsun.

- Kurt, O. (2019). *Bazı Kumarinlerin Salgı Fosfolipaz A<sub>2</sub> (Spla<sub>2</sub>) ve Siklooksijenaz-2 (COX-2) Enzimleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi* (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Lowry, O. H. vd. (1951). Protein Measurement With The Folin-Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265- 275.
- Mailer, R. J. (2004). Oilseeds, Overview. In C. Wrigley (Eds.), *Encyclopedia of Grain Science* (pp. 380-386). Elsevier Ltd.
- Mercan Ülkü, D. (2018). *Antep Fıstığı Bitkisinden (Pistacia vera L.) Lipaz Enzimi Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi* (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Nagaraj, G., Devi, G. N. ve Srinivas C.V.S. (2001). *Safflower petals and their chemical composition*. Proceeding V. International Safflower Conference [Sözlü Bildiri], USA, s.123-127.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). W. H. Freeman and Company, New York.
- Öztürk B. (2002). Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*. 12, 20-23.
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2011). An Introduction to Enzymes. *Enzymes*, 2, 13.
- Pandey, A., vd. (1999). The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 119-131.
- Park, H., vd. (2000). Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(5), 931-939.
- Park, H., vd. (2005). Effects of methanol on the catalytic properties of porcine pancreatic lipase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2): 296–301.
- Popov, A. M., & Kang, D. (2011). Analgesic and Other Medicinal Properties of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seeds. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, 995-1002.

- Sağıroğlu, A., & Arabacı, N. (2005). Sunflower Seed Lipase: Extraction, Purification, and Characterization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35(1), 37-51.
- Saraç, N., vd. (2008). Toprak ve Süt Kökenli Gram Pozitif Bakterilerde Lipaz Üretimi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1(2), 23-28.
- Saxena, R. K., vd. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 1-18.
- Schmid, R., D., & Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37, 1608-1633.
- Seren, S. (2013). *Acinetobacter psychrotolerans* Suslarından İzole Edilen Lipazın Karakterizasyonları (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun.
- Seth, S., vd. (2014). An insight into plant lipase research – challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, 95,13-21.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662.
- Sharma, R., vd. (2002). Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*, 37, 1075–1084.
- Singh, V., & Nimbkar, N. (2016). Safflower. In S. K. Gupta (Eds.) *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production: Opportunities and Constraints* (pp. 149-167). Elsevier Inc.
- Sökmen, B. B., Sarı, B. ve Azap, T. (2018). Papatyadan (*Matricaria chamomilla* L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 131-143.
- Sumathy. R, Vijayalakshmi. M., ve Deecaraman. M. (2012). Studies on Lipase production from fungal strains by different inducers at varied concentrations - A

comparative study. *International Journal Of Environmental Sciences*, 3(3), 1072-1078.

Sülüş, Ş. (2019). *Borik Asit Uygulanan Bazı Aspir (Carthamus tinctorius L.) Çeşitlerinin Antioksidan Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişikliklerin Ekofizyolojik Parametreler, Fizyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi* (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilecik.

Tırancıoğlu, M. (2017). *Siyah Hardal (Brassica nigra L.) Tohumu Lipazının Saflaştırılması ve Karakterizasyon Özelliklerinin Belirlenmesi* (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.

Packter, N. (1994). Lipases — their structure, biochemistry and application. *Biochemical Education*, 22(4), 216.

Wang, Y., vd. (1995). Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic Bacillus strain, A30-1 (ATCC 53841). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 433-438.

Yeoh, H. H., Wong, F. M. ve Lin, G. (1986). Screening for fungal lipases using chromogenic lipid substrates. *Mycologia*, 78, 298–300.

Yu, S. Y., vd. (2013). Phenolic Composition, Antioxidant Activity and AntiAdipogenic Effect of Hot Water Extract from Safflower (*Carthamus tinctorius L.*) Seed. *Nutrients*, 5(12), 4894-4907.

**DİZİN****-A-**

Aspir 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12

Aspir tohumu 10, 11, 12, 15, 19, 29, 33, 37, 38, 39

**-B-**

Bitkisel Lipaz 1, 19, 21, 24, 25

**-C-**

*Carthamus tinctorius* L. 1, 4, 5, 52, 54, 55, 57

**-E-**

Enzim 9, 10, 11, 12

Enzim Substratı 58

Enzim İnhibitörü 11, 12, 13, 14

**-H-**

Hayvansal Lipaz 15, 19, 21, 22

Homojenat 29, 32, 36, 37

**-L-**

Lineweaver-Burk grafiği 43, 50

**-M-**

Michaelis-Menten Grafiği 18, 44, 50

Mikrobiyal Lipaz 1, 54

**-P-**

pH 9, 10, 27, 28, 29, 38, 41, 49

**-S-**

SDS-PAGE x 5, 6, 9, 12, 32, 44, 45, 46

Substrat 6, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 20, 33, 43