

**T.C  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# **BİTKİ TOHUMUNDAN LİPAZ ENZİMİ ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Rüveyde SANCAK**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Billim Dalı : BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gülnur ARABACI**

**Mayıs 2019**

T.C  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİ TOHUMUNDAN LİPAZ ENZİMİ  
ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU**

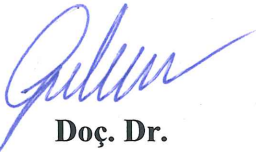
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Rüveyde SANCAK**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

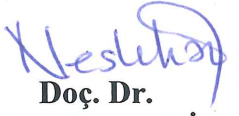
**Bu tez 24/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.**

  
**Doç. Dr.  
Gülnur ARABACI**

**Jüri Başkanı**

  
**Prof. Dr.  
Meryem Nilüfer YARAŞIR**

**Jüri Üyesi**

  
**Doç. Dr.  
Neslihan ŞAKİ**

**Jüri Üyesi**

## **BEYAN**

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Rüveyde SANCAK

20.04.2019

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarında hem bilimsel konularda hemde manevi anlamda yanımda olan, laboratuvar çalışmalarına imkan sağlayıp yardımcı olan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülnur ARABACI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Yardımlarını hiç esirgemeyen tez süresi boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden daima yararlandığım her takıldığım anda kendimi yanında bulduğum çok değerli hocam Sayın Arş. Gör. Esmâ Hande Alıcı'ya teşekkür ederim.

Laboratuvarda bilgilerinden daima yararlanarak pozitif enerjisiyle her an yanımda olan ve aynı laboratuvarda çalışmaktan çok mutlu olduğum Rana ARIDURU'ya çok teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam boyunca deneylerimin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen ve aynı laboratuvarda olmaktan çok mutluluk duyduğum Büşra TOSUN'a teşekkür ediyorum.

Hayatımın boyunca yanımda olan bana güvenen sevgisini hissettiren, maddi ve manevi her daim yanımda olan çok değerli aileme teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarında yardımcı olan her konuda bilgisine güvendiğim maddi ve manevi yardımlarını hiç eksik etmeyen canım eşim Zeki SANCAK'a en içten teşekkürlerimi iletiyorum.

## İÇİNDEKİLER

|                                                            |     |
|------------------------------------------------------------|-----|
| TEŞEKKÜR.....                                              | i   |
| İÇİNDEKİLER .....                                          | ii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....                      | vi  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                     | vii |
| TABLOLAR LİSTESİ.....                                      | ix  |
| ÖZET.....                                                  | x   |
| SUMMARY .....                                              | xi  |
| BÖLÜM 1.                                                   |     |
| GİRİŞ .....                                                | 1   |
| BÖLÜM 2.                                                   |     |
| GENEL BİLGİLER .....                                       | 3   |
| 2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri .....                   | 3   |
| 2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....                     | 5   |
| 2.2.1. Oksidorektüktazlar.....                             | 5   |
| 2.2.2. Transferazlar .....                                 | 6   |
| 2.2.3. Hidrolazlar .....                                   | 6   |
| 2.2.4. Liyazlar .....                                      | 6   |
| 2.2.5. İzomerazlar .....                                   | 6   |
| 2.2.6. Ligazlar .....                                      | 6   |
| 2.3. Enzimlerin Lipitlere Etkisi .....                     | 6   |
| 2.4. Enzim Aktivitesi Ve Üzerine Etki Eden Faktörler ..... | 7   |
| 2.4.1. pH .....                                            | 8   |
| 2.4.2. Sıcaklık .....                                      | 8   |
| 2.4.3. Enzim derişiminin etkisi.....                       | 8   |

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 2.4.4. Substrat derişiminin etkisi .....                 | 9  |
| 2.4.5. Ürün derişiminin etkisi .....                     | 9  |
| 2.4.6. Zamanın etkisi .....                              | 9  |
| 2.5. Enzim Kinetiği.....                                 | 9  |
| 2.5.1. Km ve Vmax değerlerinin önemi .....               | 11 |
| 2.6. Enzim İnhibisyonu.....                              | 13 |
| 2.7. Enzim Kullanmanın Avantajları .....                 | 15 |
| 2.8. Enzimlerin Kullanım Alanları .....                  | 15 |
| 2.9. Lipazlar .....                                      | 17 |
| 2.9.1. Lipaz üretimi .....                               | 19 |
| 2.9.2. Lipaz kaynakları .....                            | 19 |
| 2.9.2.1. Hayvansal lipazlar .....                        | 20 |
| 2.9.2.2. Bitkisel lipazlar .....                         | 20 |
| 2.9.2.3. Mikrobiyal lipazlar .....                       | 21 |
| 2.9.3. Lipazların uygulama alanları .....                | 22 |
| 2.9.3.1. Deterjan endüstrisinde lipazlar .....           | 23 |
| 2.9.3.2. Gıda endüstrisinde lipazlar. ....               | 24 |
| 2.9.3.3. Kağıt endüstrisinde lipazlar. ....              | 25 |
| 2.9.3.4. Tekstil endüstrisinde lipazlar .....            | 25 |
| 2.9.3.5. Kozmetik ve parfüm endüstrisinde lipazlar. .... | 26 |
| 2.9.3.6. Biyodizel endüstrisi. ....                      | 26 |
| 2.9.3.7. Organik madde sentezinde lipazlar.....          | 27 |
| 2.9.3.8. Oleokimyasal endüstrisinde lipazlar.....        | 27 |
| 2.9.3.9. Biyosensör olarak lipazlar. ....                | 27 |
| 2.9.4. Lipaz enziminin saflaştırılması.....              | 28 |
| 2.9.5. Lipaz kaynağı olarak süpürge tohumu .....         | 28 |
| <br>BÖLÜM 3.                                             |    |
| DENEYSEL KISIM.....                                      | 31 |
| 3.1. Materyal.....                                       | 31 |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....                | 31 |
| 3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar .....                 | 31 |

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....                                                      | 32        |
| 3.2. Metotlar .....                                                                                    | 33        |
| 3.2.1. Homojenatin hazırlanması .....                                                                  | 33        |
| 3.2.2. Süpürge tohumundaki proteinlerden yağsızlaştırma yapılması ve ham ekstraktın hazır olması ..... | 34        |
| 3.2.3. Lipaz aktivite tayini .....                                                                     | 34        |
| 3.2.4. Bradford yöntemi ile protein tayini .....                                                       | 36        |
| 3.2.5. Üçlü faz yöntemi ile saflaştırma .....                                                          | 37        |
| 3.2.6. SDS jel elektroforezi (SDS – PAGE) .....                                                        | 37        |
| 3.2.7. Lipaz enziminin hidrolitik karakterizasyonu .....                                               | 39        |
| 3.2.7.1. Substrat spesifikliğı tayini .....                                                            | 39        |
| 3.2.7.2. Optimum reaksiyon süresi tayini .....                                                         | 40        |
| 3.2.7.3. Optimum sıcaklığın tayini .....                                                               | 40        |
| 3.2.7.4. Optimum pH tayini .....                                                                       | 40        |
| 3.2.7.5. Depo kararlılığının tayini .....                                                              | 40        |
| 3.2.7.6. $Ca^{2+}$ nin aktiviteye etkisi .....                                                         | 40        |
| 3.2.7.7. Aktivitede metal iyon etkisi .....                                                            | 41        |
| 3.2.7.8. Aktiviteye etki eden bazı deterjanlar .....                                                   | 41        |
| 3.2.7.9. Km ve Vmax değerlerinin bulunması .....                                                       | 41        |
| 3.2.7.10. Aktivasyon enerjisinin tayin edilmesi .....                                                  | 42        |
| 3.2.7.11. İnhibitörün aktivite üzerindeki etkisi .....                                                 | 42        |
| <b>BÖLÜM 4.</b>                                                                                        |           |
| <b>DENEYLER VE BULGULAR .....</b>                                                                      | <b>43</b> |
| 4.1. Yağsızlaştırma .....                                                                              | 43        |
| 4.2. Enzimin Saflaştırılmasında Protein Tayini .....                                                   | 43        |
| 4.2.1. Bradford yöntemiyle toplam protein tayini .....                                                 | 43        |
| 4.3. Lipazın Hidrolitik Aktivite Tayini .....                                                          | 44        |
| 4.4. Üçlü Faz Saflaştırma Yönteminin Sonuçları .....                                                   | 44        |
| 4.5. Süpürge Tohumu Lipazının (STL) Hidrolitik Karakterizasyonu .....                                  | 45        |
| 4.5.1. Substrat spesifikliğinin belirlenmesi .....                                                     | 45        |
| 4.5.2. Optimum reaksiyon süresi .....                                                                  | 46        |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 4.5.3. Optimum sıcaklığın tayini .....                 | 47 |
| 4.5.4. Optimum pH tayini .....                         | 48 |
| 4.5.5. Depo kararlılığının tayini .....                | 50 |
| 4.5.6. $Ca^{2+}$ iyonunun aktiviteye etkisi .....      | 51 |
| 4.5.7. Aktivitede metal iyon etkisi .....              | 52 |
| 4.5.8. Aktiviteye etki eden bazı deterjanlar .....     | 54 |
| 4.5.9. $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması ..... | 55 |
| 4.5.10. Aktivasyon enerjisinin tayin edilmesi .....    | 57 |
| 4.5.11. İnhibitörün aktivite üzerindeki etkisi .....   | 58 |
| 4.6. SDS-PAGE ile STL Enziminin Karakterizasyonu ..... | 59 |

## BÖLÜM 5.

|                            |    |
|----------------------------|----|
| SONUÇLAR VE TARTIŞMA ..... | 61 |
| KAYNAKLAR .....            | 67 |
| ÖZGEÇMİŞ .....             | 73 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

|                  |                                                                        |
|------------------|------------------------------------------------------------------------|
| °C               | : Santigrat derece                                                     |
| dk               | : Dakika                                                               |
| EDTA             | : Etilendiamin tetraasetik asit                                        |
| K <sub>m</sub>   | : Michealis-Menten sabiti                                              |
| mg               | : Miligram                                                             |
| MBHHM            | : 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorürmonohidrat             |
| mL               | : Mililitre                                                            |
| mM               | : Milimolar                                                            |
| µg               | : Mikrogram                                                            |
| PAGE             | : Poliakrilamid jel elektroforezi                                      |
| SDS              | : Sodyum dodesil sülfat                                                |
| STL              | : Süpürge tohumu lipazı                                                |
| TEMED            | : N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin                                   |
| V <sub>max</sub> | : Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Enzim-substrat ilişkisi.....                                       | 5  |
| Şekil 2.2. Michaelis-Menten denklemi .....                                    | 10 |
| Şekil 2.3. Lineweaver-Burk grafiği.....                                       | 12 |
| Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiğine ait denklem .....                        | 13 |
| Şekil 2.5. Yarışmalı bir enzim inhibisyonu.....                               | 14 |
| Şekil 2.6. Yarışmasız inhibisyon.....                                         | 14 |
| Şekil 2.7. Yarı yarışmalı inhibisyon.....                                     | 14 |
| Şekil 2.8. Yağların hidroliz reaksiyonu.....                                  | 17 |
| Şekil 2.9. Lipazın tepkimeyi katalizinin bir şema şeklinde gösterilmesi ..... | 18 |
| Şekil 2.10. Süpürge tohumu .....                                              | 29 |
| Şekil 3.1. Hacimsel aktivite denklemi.....                                    | 36 |
| Şekil 3.2. Hacimsel spesifik aktivite denklemi .....                          | 36 |
| Şekil 3.3. Arrhenius denklemi.....                                            | 42 |
| Şekil 4.1. Alt ve üst fazın optimum pH'sı.....                                | 45 |
| Şekil 4.2. Reaksiyon süresinin aktivite üzerindeki etkisi.....                | 47 |
| Şekil 4.3. Sıcaklığın süpürge tohumuna lipazına etkisi .....                  | 48 |
| Şekil 4.4. pH'nın süpürge tohumu lipazına olan etkisi .....                   | 49 |
| Şekil 4.5. STL'nin depo kararlılığı .....                                     | 51 |
| Şekil 4.6. $Ca^{2+}$ iyonunun STL aktivitesine etkisi .....                   | 52 |
| Şekil 4.7. STL aktivitesine metal iyonlarının etkisi .....                    | 53 |
| Şekil 4.8. STL'na deterjan etkisi .....                                       | 55 |
| Şekil 4.9. Michaelis-Menten grafiği .....                                     | 56 |
| Şekil 4.10. Lineweaver-Burk grafiği.....                                      | 56 |
| Şekil 4.11. STL'nin aktivasyon enerjisi .....                                 | 58 |
| Şekil 4.12. STL'ye inhibitörün etkisi .....                                   | 59 |

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.13. SDS-PAGE ile elde edilen STL'nin karakterizasyonu ..... | 60 |
|---------------------------------------------------------------------|----|



## TABLÖLER LİSTESİ

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.1. Bazı enzimlerin endüstrideki görevleri .....                                 | 16 |
| Tablo 2.2. Mikrobiyal kaynaklarla üretilen lipazların sıcaklık ve pH aralıkları .....   | 21 |
| Tablo 2.3. Lipazların endüstriyel uygulamaları .....                                    | 23 |
| Tablo 3.1. SDS-PAGE için bileşenlerle birlikte miktarlarının gösterimi .....            | 38 |
| Tablo 4.1. Süpürge tohumundan yağsızlaştırma ile elde edilen yağ miktarları .....       | 43 |
| Tablo 4.2. Süpürge ekstratı ve üçlü faz sistemindeki protein içeriği .....              | 44 |
| Tablo 4.3. Süpürge tohumu lipazının saflaştırılmasıyla elde edilen aktiviteler. ....    | 44 |
| Tablo 4.4. Farklı substratlarla ve farklı çözücülerle elde edilen aktivite değerleri .. | 46 |
| Tablo 4.5. Optimum reaksiyon süresi ve sarfıyatı. ....                                  | 46 |
| Tablo 4.6. Süpürge tohumu lipazından optimum sıcaklığın tayini .....                    | 47 |
| Tablo 4.7. Süpürge tohumu lipazının optimum pH'nın tayini .....                         | 49 |
| Tablo 4.8. STL'nin depo kararlılığı .....                                               | 50 |
| Tablo 4.9. $Ca^{2+}$ iyonunun STL aktivite değerleri .....                              | 51 |
| Tablo 4.10. STL aktivitesine metal iyonlarının bağlı aktivite değerleri .....           | 53 |
| Tablo 4.11. STL deterjan değerleri .....                                                | 54 |
| Tablo 4.12. Farklı substrat konsantrasyonlarında STL enzimi aktiviteleri .....          | 55 |
| Tablo 4.13. STL'nin aktivasyon enerjisi değerleri .....                                 | 57 |
| Tablo 4.14. STL'na inhibitörün etkisinin değerleri .....                                | 58 |

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Süpürge tohumu, lipaz, saflaştırma, karakterizasyon.

Hidrolazlar grubunda olan lipazlar sulu olan ortamlarda trigliseritlerin hidroliz olmasını sağlayan enzimlere denilmektedir. Bu çalışmada süpürge tohumundan (*Sorghum vulgare*) lipaz izole edilerek, saflaştırılıp karakterizasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Süpürge tohumu lipazı Üçlü Faz Sistemiyle 2 kat saflaştırılmıştır. Titrimetrik yöntem ile de süpürge tohumundan lipaz enzimi aktivitesi tayin edilmiştir.

Süpürge tohumu lipazında 7 farklı substrat kullanıldı. Süpürge tohumu lipazına uygun substrat ise zeytinyağı olarak belirlendi. Kinetik çalışmalarda ise tribütirin substratı için Michealis-Menten sabitleri  $K_m$ : 19,28 mM ve  $V_{max}$ : 45,87 U/dk.mg.enzim olarak belirlenmiştir.

Süpürge tohumundan elde edilen lipazın optimum reaksiyonun süresi 6 dakika olarak bulunmuştur. Saflaştırılmış olan enzim pH = 6 ve 60 °C’de maksimum aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Depo kararlılığın bulunmasında ise -20 °C’de 1 yıl bekleyen süpürge tohumu lipazının aktivitesinde meydana gelen kayıp %25.6 olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinde  $CaCl_2$ ’ün aktivatör olarak görev yaptığı belirlenmiş ve 2 mM’lık  $CaCl_2$  konsantrasyonunda enzim aktivitesindeki artış %121 olarak belirlenmiştir.

Süpürge tohumu lipazı ile hesaplanan aktivasyon enerjisi 11,34 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bazı metaller ve EDTA’nın enzim aktivitesine etkisi incelendi ve yapılan çalışmalar neticesinde EDTA ve  $Cu^{2+}$ ’ın enzim aktivitesini yaklaşık 4 kat artırırken  $Fe^{2+}$  ise yaklaşık 2 kat artırdığı belirlenmiştir.  $Mg^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  ise aktivitenin %6-10 aralığında artışını sağlamıştır. Diğer test edilen metaller ise %10 ile %40 aralığında enzimi inhibe etmiştir.

Deterjanların süpürge tohumu lipaz enzim aktivitesine etkileri de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, anyonik deterjan olarak kullanılan sodyumdeoksikolat enzim aktivitesinde değişime neden olmazken katyonik deterjan olan CTAB ise %60 enzim aktivitesinin artmasına neden olmuştur. Non-iyonik olarak kullanılan Triton X-100 ise aktiviteyi 2 katı artırırken Tween-80 ise %50 oranında artırdığı belirlenmiştir. Kullanılan deterjan örneklerinin hiçbirinde enzim aktivitesi inhibe edilmemiştir.

# ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE ENZYME FROM PLANT SEED

## SUMMARY

Keywords: Broom seed, lipase, purification, characterization

Lipases in the group of hydrolases are called enzymes that provide hydrolysis of triglycerides in aqueous media. In this study, it was aimed to isolate and characterize lipase enzyme from the broom seed (*Sorghum vulgare*). Broom seed lipase was purified 2-fold by using Triple Phase System and the enzyme activity was determined from the broom seed by titrimetric method.

7 different substrates were used to determine the substrate specificity of broom seed lipase. Olive oil was determined as the best substrate for the broom seed lipase. In the kinetic studies, Michaelis–Menten values for tributyrin were found as  $K_m$ : 19,28 mM and  $V_{max}$ : 45,87 U/min.mg.enzyme.

The optimum reaction time of the lipase obtained from the broom seed was determined as 6 minutes. The purified enzyme had the maximum activity at pH = 6 and 60 °C. In the determination of the storage stability, the loss of the activity of the broom seed lipase waiting at -20 °C for 1 year was determined as 25,6%. It was determined that  $CaCl_2$  acted as activator in enzyme activity and the increase in enzyme activity at 2 mM  $CaCl_2$  concentration was determined as 121%.

The calculated activation energy of broom seed lipase was 11,34 kJ / mol. In addition, the effect of some metals and EDTA on enzyme activity was investigated and the activity of enzyme was increased approximately 4-fold with EDTA and  $Cu^{2+}$ , whereas  $Fe^{2+}$  increased the enzyme activity approximately 2-fold.  $Mg^{2+}$  and  $Co^{2+}$  increased activity in the range of 6-10%. However, the other tested metals inhibited the enzyme in the range of 10% to 40%.

The effects of detergents on the activity of broom seed lipase enzyme were also investigated. According to the results, the sodium deoxycholate used as anionic detergent did not cause any change in enzyme activity. However, the cationic detergent CTAB caused 60% increase in enzyme activity. The non-ionic Triton X-100 increased activity by 2 times while Tween-80 increased by 50%. The enzyme activity was not inhibited in any of the examples of detergent used.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Metabolizmada meydana gelen reaksiyonları genelde hızlandırıp düzenleme görevi yapan protein yapısında bulunan biyolojik katalizöre enzim denir. Reaksiyon hızları yeterli koşullar sağlandığı takdirde  $10^{10}$ - $10^{12}$  kat daha artmaktadır. Reaksiyonlarda enzim kullanımı şimdiki zamandan çok daha eskiye dayanmaktadır. O zamanlardan günümüze kadar yapılan çalışmalarda 4000 kadar enzimlerin yapıları hakkında bilgi edinilmiştir. Yaklaşık olarak 200 civarındaki enzimler ise ticari amaca uygun olup kullanılabilir. Güneçtikçe gelişen metotlarla birlikte enzimler arzu edilen miktarlarda üretilmeye başlanmıştır. Buna bağlı olarak enzim sayısında artış olup bu artışın ticarete kullanımı yaygınlaşmaya başlamaktadır. Lipazlar çeşitli kaynaklardan elde edilmektedir. Uygulama açısından mikrobiyal lipazlar daha çok olsa da bitki ve hayvansal açıdan lipazlar ticari olarak önemlidir. Mikrobiyel olarak fazla olmasının sebebi ise mikroorganizmaların kısa sürede sonuç vermesi ve hem sentetik olarak hemde hidrolitik olarak oluşan reaksiyonları katalizlemede etkin olmasıdır [1].

Lipazlar, ortamda suyun bulunduğu veya bulunmadığı yapılması oldukça zor olan reaksiyonların oluşmasını sağlayan biyokatalizörler içindeki en önemlilerden biridir. (sınıflandırılmasında hidrolazlar (E.C.3.), ester bağlarının parçalanması (E.C.3.1.), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1.) ve son olarak triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3.) şeklinde sıralanmaktadır). Su ve yağdan meydana gelen arayüzeydeki trigliseridlerin hidrolizini lipazlar katalizlemektedir. Deney sırasında reaksiyon ortamında bulunan suyun azlığı veya çokluğu reaksiyonun ne yönde olması gerektiğini belirtmektedir. Suyun azlığı veya hiç olmamasında transesterifikasyon, çokluğunda ise hidroliz şeklinde reaksiyonun yönü olacaktır.

Geçtiğimiz on yıl içinde lipazlar organik olarak sentezleme ile ilgili amilazlar ile proteazlarla birlikte çok büyük önem arz etmektedir. Günümüzde birçok kullanım

alanında lipazlar görev aldığından dolayı organik-biyokimyacıların, biyoteknologların, eczacıların, mikrobiyologların, biyofizikçilerin vb. birçok dal tarafından seçilme nedenidir [2].

Son zamanlarda biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte lipazlarında biyoteknolojiye bağlı olarak uygulanması oldukça genişlemektedir. Günlük bakım için ihtiyaç duyulan maddelerin sentezinde, gıda sektöründe kullanılan maddelerin aromalarının daha çok artırılmasında, ilaç sektöründe, deterjan ve birçok tekstil maddelerinin sentezinde, bitkisel olarak kullanılan yağların yerine olası maddelerden sentezlenmesi ve birçok sentetik olarak sonuç veren reaksiyonların biyokatalizörlüğü için organik kimyada lipazlar kullanılmaktadır [3].

Bu çalışmada, ülkemizin bazı bölgelerinde yetiştirilebilen süpürge tohumuyla (*Sorghum vulgare*) lipaz enzimi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Süpürge tohumunun anavatanı Afrika olup ülkemizde de özellikle Trakya Bölgesinde yetişip Marmara Bölgesinin güneyinde de yetiştiği bilinmektedir. Bu çalışmamızda lipazın ilk defa süpürge tohumundan saflaştırılıp karakterizasyon çalışmaları uygulanmıştır.

## **BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri**

Metabolizmada meydana gelen reaksiyonları genelde hızlandırıp düzenleme görevi yapan protein yapısında bulunan biyolojik katalizöre enzim denir. Canlı olan hücreler ile katalizör üretimi sağlanır fakat çalıştırmak istendiğinde canlı hücrelerin varlığına gerek yoktur [4].

Biyokimyanın geçmişine bakıldığında enzim üzerine yapılan çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Bu alanda etin sindirilmesi için mideden salgılanan enzimler kullanılıp 1700'lü yıllarda yapılan ilk çalışma olmuştur. Birçok bitkiden faydalanılarak nişastadan şeker elde edilmesiyle ilgili çalışmalarda 1800'lere kadar devam etmiştir [5].

Daha sonra yapılan çalışmalarda 1850 yıllarında Pasteur fermentler sayesinde şekerlerin maya ile birlikte alkole fermantasyon olayının gerçekleştiğini savunup bu olayın canlı olan hücrelerde olduğunu belirtmiştir. Liebig ise Pasteur'ün fermantasyon olayının canlı hücrelerde olması gerektiğinin aksine cansız olan hücrelerde de gerçekleşeceğini savunmuştur. Frederick W.Kühne ise 1878 yılında Pasteur'ün fermantasyon olayında katalizlenmesini sağlayan fermentleri enzim şeklinde adlandırmıştır. W.Kühne cansız olan ortamlarda da enzimin canlı ortamdaki gibi işleviyle aynı olduğunu gözlemleri sonucu tespit etmiştir. 1920'li yıllara doğru ise karışık olan enzimlerden saf enzim elde etmek için çalışmalar yapılmıştır [6].

James Summer ise 1926 yıllarında üreaz enzimi üzerine çalışıp bu enzimi izole ve kristalize etmeye çalışmasıyla yeni birtakım öngörüler sağlanmıştır. Summer, başka herhangi bir örnek olmadığında enzimlerin hepsine protein demiştir. John Northrop ile

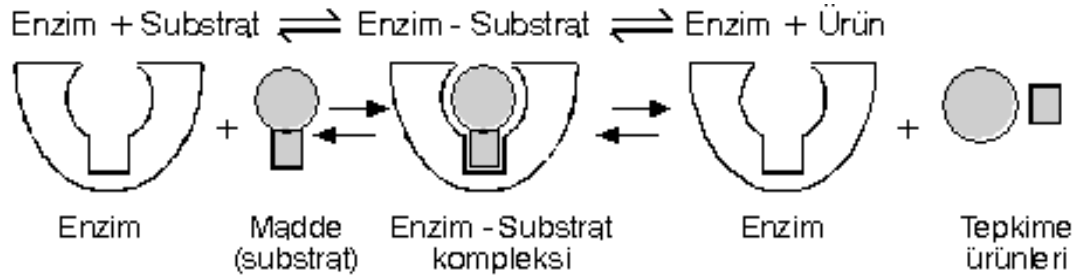
Moses Kunitz ise sindirim enzimleri olan pepsin ve tripsini kristallendirip bu enzimlerin de protein oldukları bulunmuştur. Sonuç olarak Summer'ın düşüncesi kabul görmüştür.

20.yy'ın bitimine doğru enzimle yapılan çalışmalarda sayısız enzimin saflaştırılması sonucu enzimlerin saf olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Birçok enzimin yapısı aydınlatıldı ve kimyasal olarak mekanizması açıklanmasıyla birlikte enzimlerin çalışma şeklinin anlaşılması sonucuna ulaşılmıştır [7].

Enzimler reaksiyonların hem kontrollü şekilde oluşmasını hemde daha hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Enzimlerin reaksiyonlarda etkiledikleri maddeye substrat denir. Reaksiyon bittiğinde miktar olarak artış olur ve yeni bir madde oluşumuna ise ürün denilmektedir. Enzim substrata dıştan başlayarak iç yüzeye doğru etki edip şeklinin değişmesiyle birlikte ürün oluşumu sağlanmış olur. Reaksiyon sonuçlandıktan sonra enzimler herhangi başka maddeye etki edebilirler. Bu enzimlerin sürekli olarak kullanılabilirliklerini göstermektedir. Tekrar olarak enzimler kullanılabilirse de protein yapısında olduğundan sıcaklığın yükselmesiyle denatüre olup etkilerini kaybederler [8].

Pepsin, hidrolaz, üreaz ve tripsin gibi enzimlerin yapısında sadece protein vardır. Bazı enzimlerde ise proteinin yanında metol iyonun varlığında görülmektedir. Bu şekilde metal iyonu bulunduran enzimlere metaloenzim denilmektedir.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  vb. iyonlar enzimlerde kofaktör olarak görev alır. Enzimler tarafından koparılan veya eklenilen kimyasal olan gruplarda taşıyıcı olarak görev yapan organik moleküllere ise koenzim denir. Aktivatörler ise pasif olan enzimlerin aktif dönüşümünü sağlar. Koenzimin veya kofaktörün varlığında enzim aktif ise holoenzim olarak adlandırılmaktadır. Kofaktör ve koenzimin enzimden ayrılmasıyla enzim aktifliğini kaybedip inaktif durumda olmasına apoenzim denilmektedir. Protein yapısında olan apoenzim aktif kalabilmesi için hem kofaktörüne hemde koenzimine ihtiyaç duymaktadır. Enzimle koenzimlerin birbirine bağlanması gevşek bir şekildedir. Bunun tersine sıkı olarak bağlanması prostetik grubun oluşacağını göstermektedir [9].

Substrat değişip ürün oluştururken enzim aynı şekilde reaksiyondan çıkmaktadır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Enzim-Substrat İlişkisi

Enzimler reaksiyon ortamında fonksiyonel grubu veya atomları substrattan ya ayırma görevini yapar ya da substrata ekleme görevini üstlenir. Enzimle substrattan oluşan komplekste küçük aktif bir merkez bulunur. Bu merkezde substratın bağlanması için veya katalitik aktiviteyi sağlayan bölgeler bulunmaktadır. Bu alanlar aminoasitten kalan kalıntılarla oluşmuş özel alanlardır [10].

Enzimler tarafından yürütülen reaksiyonların aktivasyon enerjisi düşüktür. Çünkü enzimler aktivasyon enerjisinin düşmesini sağlarlar. Bir enzim sadece bir reaksiyonun yönetiminden sorumludur. Substrat yüzeyinin artmasıyla enzimin de aktivitesi artmaktadır. Enzimler sulu ortamlarda ve organik ortamlarda aktifliğini sağlamaktadırlar. Enzim bulunan birçok reaksiyonlar tersinirdir [11].

## 2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

### 2.2.1. Oksidorektüktazlar

Molekülden başka bir moleküle elektronun aktarılmasını sağlayan enzimlere oksidorektüktazlar denilmektedir. Kısaca redoks reaksiyonun iki tane substrat arasından katalizlenmesidir.

### 2.2.2. Transferazlar

İki tane substratın arasında fonksiyonel olan grupları taşıyan tepkimelerin katalizlenmesini sağlamaktadırlar.

### 2.2.3. Hidrolazlar

Birçok farklı bağlara suyun ortama eklenmesiyle bağların birbirinden kopup parçalanmasına neden olmaktadır. Bu şekilde hidroliz reaksiyonlarının katalizlenmesi sağlanmış olmaktadır.

### 2.2.4. Liyazlar

Oksidasyon ile hidroliz dışındaki diğer yöntemlerle bağın kırılması tepkimelerinin katalizlenip bunun sonucu olarak çift bağın oluşumunu sağlayan enzimlere liyazlar denmektedir.

### 2.2.5. İzomerazlar

Molekülün hem geometrik olarak hemde birbirleriyle olan değişikliklerin kontrol edilmesini sağlarlar.

### 2.2.6. Ligazlar

Enerjisini ATP'den alarak iki tane herhangi bir molekülün birbirleriyle bağlanıp katalizlenmesini sağlamaktadırlar. Ligazların diğer bir adı ise sentetazlardır [12].

## 2.3. Enzimlerin Lipitlere Etkisi

Lipazlar meyvelerde, sütte, sebzelerde, yağlı tohumlarda ve tahıllarda bulunmaktadır. Sıcaklık düşük olduğu takdirde aktif olarak durabilirler. Lipazlar, lipidlerin hidrolizini katalizlemektedirler. Lipazların katalizlediği tepkimenin hızı hem gliseritin tipine hem

de yağ asidine bakılarak farklılık göstermektedir. Eğer yağ asidi küçük moleküllerden oluşmuşsa hidroliz oldukça hızlıdır. Hidroliz sonucu yağın verdiği tat ve kokuda değişimler olup bu değişimler olumsuz yöndedir [13].

#### **2.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler**

Birim zamanda meydana gelen substratın mol sayısı enzimin aktivitesine eşittir. Kısacası reaksiyon hızı ile hacminin çarpımına denktir. Enzimin aktivitesi var olan aktif enzimin ne kadar olduğunu gösteren bir ölçüdür. Enzimin katalitik olarak aktivitesine bakılarak enzimin miktarı bulunabilmektedir. Enzim aktivitesi kısaca birim olarak EU şeklinde gösterilmektedir.

Enzim Ünitesi (EU) : Şartlar optimal olduğu takdirde 1 dakikanın sonunda 1  $\mu$ mol olan substrattan ürün oluşmasını sağlayan enzim miktarına denir. Bir enzimin aktivitesinin tespit edilirken şu durumlar bilinmelidir:

1. Enzim tarafından katalizi yapılan reaksiyon denklemindeki katsayıların,
2. Enzimin yanında kofaktöre ya da metal iyonlarından herhangi birine gerek duyulup duyulmadığı,
3. Km değerlerinin substrat için belirlenmesi,
4. Optimum pH'ya bakılması,
5. Enzimin aktivitesine bakıldığında hangi sıcaklıkta daha yüksek olduğu aralığının tespiti,
6. Reaksiyonda substratın ortadan yok oluşu ya da ürün meydana gelirkenki hızlarından elde edilen analitik metodların öğrenilmesi gerekmektedir.

Enzimin gösterdiği optimum pH ile doygunluğa ulaştığı noktalardaki substratın konsantrasyonları bulunarak enzimin aktivitesi belirlenmektedir. Bu şekilde sıfıncı mertebeden oluşan bir reaksiyon sağlanmış olmaktadır.

Protein içinde bir miligramdaki enzimin ünite miktarının sayısı spesifik aktivitesinin bulunmasını sağlamaktadır. Kısaca ünite/mg protein olarak ifade edilmektedir [4].

### 2.4.1. pH

Her enzimin farklı özellikleri vardır. Bu özelliklerinden dolayı optimum pH noktaları veya pH aralıkları birbirinden farklıdır. pH skalasında bazıları yüksek değerde aktivite gösterirken bazıları düşük değerde aktivite göstermektedir. Hem substratların hemde enzimlerin aktif olan kısımları asidik ve baziktir. Genel olarak optimum pH'sı 5 ile 7 aralığında yoğunlaşmış durumdadır. Bazılarında ise örneğin tripsin gibi enzimler pH 8'de optimumdur.

### 2.4.2. Sıcaklık

Enzimlerde sıcaklığın artışından dolayı üç boyutlu olan yapılarında gözlemlenen değişimler sonucu bozunmaya uğradığı belirlenmiştir. Bu şekilde sıcaklığın artması ile enzimlerin dayanıklılığı ters orantılıdır. Genel olarak 50-60 °C olan sıcaklıklarda enzim aktivitelerini kaybetmektedir.

Enzimlerin reaksiyon hızlarında da sıcaklık etki göstermektedir. Sıcaklığın 10 °C'lik yükseltilmesiyle reaksiyonun hızında iki kat artış sağlandığı belirlenmiştir. Bu şekilde belli bir yere kadar artış sağlanır. Sıcaklığın maksimum olduğu değerden sonra olumsuz yönde etkiye neden olmaktadır. Hızda meydana gelen değişimler takip edilerek maksimum olduğu zaman optimum sıcaklığında bulunması sağlanmaktadır. Sıcaklığın artışıyla birlikte molekül yapısı değişikliklere uğrayarak reaksiyondaki hızın azalması hatta durmasına bile sebep olmaktadır.

### 2.4.3. Enzim derişiminin etkisi

Enzimin derişimi artmasıyla birlikte tepkimenin hızı da artmaktadır. Bu durum tepkime esnasında substratın bitmesi gibi olaylar olması sonucu hız azalır.

#### 2.4.4. Substrat derişiminin etkisi

Reaksiyon başlarında substrat derişiminden dolayı enzim hızında artış görülür. Belli bir noktaya kadar bu durum devam etmektedir. Belli zaman sonrasında enzim substrata karşı doygunluğu tamamlanmış olur. Doygunlaşan enzimin hızı ulaşabilceği en üst seviyede olup bu hızda reaksiyonun devam etmesini sağlar. Bu ulaşabilceği maksimum hıza  $V_{max}$  denilmektedir.

#### 2.4.5. Ürün derişiminin etkisi

Ürün derişiminin değişmesiyle ters orantılı olarak hızda değişmektedir. Derişimin atması hızı azaltır. Bunun sebebi ise feed-back adlı mekanizmayla geriye dönüşmeli olan reaksiyonu durdurmasından dolayı tepkimenin hızında azalmaya yol açmaktadır.

#### 2.4.6. Zamanın etkisi

Reaksiyon sonrası oluşan ürünler zaman geçtikçe birleşip ters yönde reaksiyonun başlamasına neden olabilmektedir. Bunun sonucunda enzimler sahip oldukları aktivitelerinin son bulmasına ve substratın tükenmesine neden olmaktadır. Bundan dolayı da tepkime hızında düşmeler görülmektedir [14].

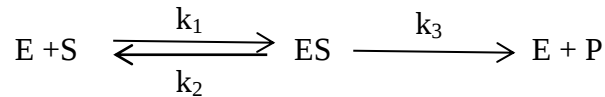
### 2.5. Enzim Kinetiği

Enzimle katalizlenen reaksiyonlardaki hızın ayrıntılı şekilde incelenmesi enzim kinetiği olarak adlandırılmaktadır. Reaksiyon hızıyla birlikte reaksiyon mekanizmasında kimyasal kinetikle incelenmektedir.

Bilim adamlarından Leonor Michaelis ile Maud Menten enzimlerin kullanıldığı tepkimelerde önemli bir model ortaya atmışlardır. Bu modelle birlikte enzimlerin kullanıldığı tepkimelerde kinetik olarak özelliklerinin aydınlatılmasında kullanılmıştır. Enzimle oluşan tepkimelerde ilk olarak enzim-substrat birleşerek bir kompleks oluşturmaktadır. Kompleksin meydana gelmesi ile enzimler reaksiyonlarda doygun

özelliklerinin olduğunun incelenmesi sonucu modelin gelişmesine olanak sağlanmıştır. Enzimin derişiminin aynı kalıp substratın derişimi üzerinde değışiklikler yapılmıştır. Bu şekilde tepkime hızı enzime göre değil substratın derişimi değıştirilerek araştırmalar yapılmıştır [15].

Michaelis- Menten'nin oluşturdukları reaksiyonun denklemi aşağıdaki gibidir.



Denkleme göre; E harfi enzimi, S harfi substratı, k harfi hız sabitini, ES birleşimi enzimin substratla oluşturduğı kompleks ve P harfi de ürünü göstermektedir.

Denklem incelendiğinde  $k_1$  ile gösterilen hız sabiti enzim ile substratın meydana getirdiğı kompleksi ifade etmektedir.  $k_2$  ise birleşen enzim ile substratın ayrıldığını göstermektedir. Bu şekilde tepkimenin çift yönlü olarak gerçekteştiğı gösterilmektedir.  $k_3$  ile gösterilen hız sabitinde ise enzim ile substrattan oluşan kompleksin ürüne dönüştüğünü ifade etmektedir. Denklemden görüldüğü gibi enzim tepkimeden aynı şekilde çıkıp bir sonraki reaksiyon için kendini hazırlamaktadır. Michaelis-Menten'nin elde ettikleri denklemde substratın değışen konsantrasyonlarına göre tepkime hızında meydana gelen değışimler gözlemlenir. Michaelis-Menten bu denklemi kurarken bazı ifadeler dile getirmişlerdir (Şekil 2.2.).

$$V_o = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Şekil 2.2. Michaelis-Menten denklemi

$V_o$  = ilk başlangıçtaki hız

$V_{max}$  = ulaşılabilir maksimum hız

$K_m$  = Michaelis-Menten sabiti formülü ise  $= (k_2 + k_3)/k_1$

$[S]$  = Substratın olan konsantrasyonu

Enzim ile substratın konsantrasyonları karşılaştırıldığında substratın konsantrasyonu enzime göre çok daha yüksektir. Bundan dolayı enzim hangi substrata bağlanırsa onun miktarında azalma görülmektedir.

Denge durumunda ise [ES] şeklinde gösterilen kompleks sabittir. ES şeklinde gösterilen oluşum hızı yıkım hızına eşittir. Kısaca (E+S ile E+P) şeklinde gösterilmektedir. Reaksiyonda bulunan bir ara ürünün oluşum hızı eğer yıkım hızıyla aynıysa ara ürün için dengede olduğu belirtilmektedir. Bu durum genel kural olarak bilinmektedir.

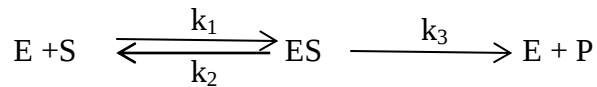
Enzim kullanılarak oluşan tepkimelerde genelde ilk hız kullanılır. Ürünün konsantrasyonunun substrat konsantrasyonuna göre küçük olması sebebiyle substrata gelebilecek ürün hızı yok sayılabilmektedir. Bu sebepten ötürüde enzim ile substratın karıştırıldığı o anda ölçüm yapılmaktadır [16].

### 2.5.1. Km ve Vmax değerlerinin önemi

Her enzimin kendine ait bir Km değeri vardır. Bu Km değeri  $10^{-1}$  M ile  $10^{-6}$  M aralığında olan birçok enzimi bulundurmaktadır. Bu değer enzimin konsantrasyonuna göre değişmemektedir. Substratın iyonik şiddetine, pH, yapısına ve sıcaklığına göre Km değeri değişiklik göstermektedir.

Km değeri iki şekilde yorumlanmaktadır.

1. Enzimlerde bulunan aktif bölgelerin substratın konsantrasyonuyla yarısının dolmasına Km değeri denilmektedir.
2. Km değeri

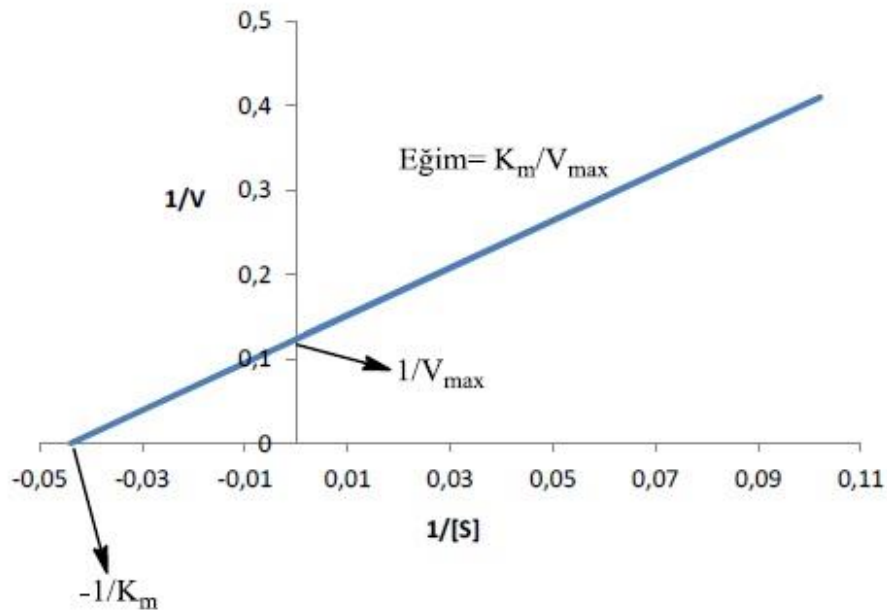


yukarıdaki gibi gösterilip hız sabitleriyle bağlantılıdır. Denklemden de görüldüğü gibi hız sabitleriyle olan ilişkisi  $K_m = k_2 + k_3 / k_1$  şeklinde gösterilmektedir.

Eğer  $k_2 \gg k_3$  ise  $K_m$  burada ES'nin olan ayrışma sabitiyle aynıdır.  $K_m$  değerinin çok yüksek olduğu durumlarda enzimin substratına olan ilgisinin düşük olması sebebiyle zayıf olarak bağlanmayı,  $K_m$  değerinin düşüklüğünde ise enzimin substratına olan ilgisinin yüksek olmasıyla kuvvetli olarak bağlanmasının gerektiğini belirtmektedir.

$V_{max}$  ise enzimin etki ettiği katalitik aktiviteyi göstermektedir.  $V_{max}$  denilince kısaca ürün haline dönüşmüş olan substratın birim zamandaki mol sayısına denilmektedir. Her  $V_{max}$  değeri her enzimin kendisine özgüdür. Substratların iyonik şiddetine, pH, sıcaklık ve yapısına göre  $V_{max}$  değişebilmektedir. Bunun sebebi ise  $V_{max} = k_3.[ET]$  konsantrasyonuna göre enzimle birlikte o enzime ait substratın doymunluğu ile aynıdır.

$K_m$  ile  $V_{max}$  değerleri deneysel hesaplamalarla bulunabilir. Michaelis-Menten grafiğinin çizimiyle doğru elde edilmediğinden  $1/V$ 'ye  $1/[S]$  hesaplamaları sonucu çizilen grafik yardımıyla  $K_m$  ile  $V_{max}$  kesin bir şekilde bulunur (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Lineweaver-Burk grafiği

Aşağıdaki denklem  $y = mx + n$  şeklindeki doğru denklemine benzemektedir.

Grafikte;  $x = 1/[S]$  ,  $y = 1/V$

Eğim (m) =  $K_M/V_{max}$

y ekseninin kesildiği nokta  $1/V_{max}$  olur.

Lineweaver-Burk grafiğine ait denklem oluşmaktadır (Şekil 2.4.) [17].

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

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

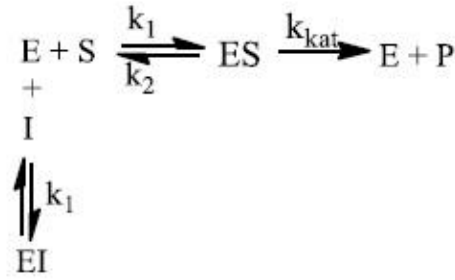
Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiğine ait denklem

## 2.6. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin aktivitelerinin bazı bileşiklerin varlığıyla azalması ya da yok olmasına inhibisyon denir. Enzimler hücresel süreçlerin hepsini katalizlemektedirler. Bundan dolayı enzim aktivitesinin azalmasına neden olan farmakolojik ajanlara enzim inhibitörü denir.

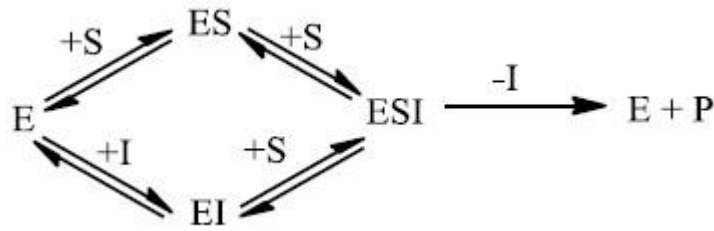
Dönüşümlü ile dönüşümsüz enzimatik inhibisyon olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Dönüşümsüz inhibitör kovalent olarak enzime bağlanmasından dolayı ayrılması da zordur. Sinir gazı zehirlerinin asetil kolin esteraz enzimine olan inhibisyonu bu duruma örnektir.

Dönüşümlü olan inhibitör etkileşimesiyse denge reaksiyonunu gösterir. Bu inhibitör yarışmalı, yarı yarışmalı ve son olarak yarışmasız şeklinde olup üç bölümde incelenir. Yarışmalı inhibitörler substrata benzemesinin yanında en basit olanıdır (Şekil 2.5.). İnhibitör enzimdeki aktif bölgeye bağlanarak substratın bağlanmasına engel olur.



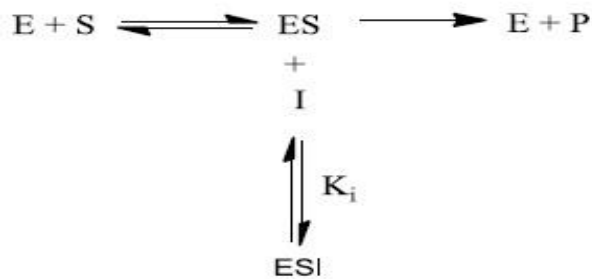
Şekil 2.5. Yarışmalı bir enzim inhibisyonunun gösterimi

Yapısal anlamda substrata benzemeyen inhibitörlere ise yarışmasız inhibitörler denilmektedir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Yarışmasız inhibisyon

Bu inhibitörler enzimde bulunan aktif bölgeler dışındaki yerlere bağlanmasıyla enzimin afinitesinin substrata karşı düşmesini gerçekleştirirler. Substratın konsantrasyonunun yükselmesi yarış halinde olmadıklarından dolayı inhibisyona herhangi bir etki etmemektedir.  $K_m$  sabit değerde dururken  $V_{max}$ 'da azalma görülür.  $ESI$ 'da bulunan  $I$  dönüşümlü ayrışabileceğinden dolayı ürün oluşur sadece katalizleme yavaş olur.



Şekil 2.7. Yarı yarışmalı inhibisyon

İnhibitörlerin ES kompleksine sadece bağlanmasına yarı yarışmalı inhibisyon denir (Şekil 2.7.). Burada substratın konsantrasyonu arttırılarak inhibisyonun da artabilceği görülmektedir. Ortamda bulunan inhibitörle ES kompleksi uzaklaşmasından dolayı  $K_m$  azalır. ESI kompleksi devamlı olacağından dolayı  $V_{max}$ 'da da düşme görülmektedir [18].

## 2.7. Enzim Kullanmanın Avantajları

Enzimler hem substrata hemde tepkimenin türüne özgüdür. Enzim kullanılarak oluşan tepkimelerde herhangi bir yan ürün oluşumu gözlenmez. Enzimatik tepkimeler sonucu verim çok iyidir ve sonucu %100'dür. Kimyasal olarak kullanılan katalizörlere göre oldukça hızlı sonuç verir. Doğal olarak kontrol edilebilen mekanizmalarında çok fazla seçenek vardır. Enzimler reaksiyonda bulunduğu ortama göre aktivitesi ya artar ya da azalır. Reaksiyon bitiminde ise reaksiyona başladığı gibi çıkmaktadır. Bu enzimlerin tekrar kullanılabildiklerinin göstergesidir.

Fizyolojik olarak basınç, sıcaklık ve pH'da kendilerini gösterirler. Önemli özelliklerinden biri ise az enerji ile sıcaklığın düşük olduğu zamanlarda tepkime meydana gelmektedir. Bunu gerçekleştirebilmesinin nedeni ise aktivasyon enerjisini azaltarak sağlamaktadırlar [19].

## 2.8. Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzim teknolojisi denince akla Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD)'nin tanınmasında rol oynadığı bir alandır. Enzimle olan teknolojinin güngeçtikçe büyüyüp gelişmesi, oluşan ürünlerin kullanıldığı alanların artması ve ekonomik anlamda yüksek değerli olması sebebiyle biyoteknolojide enzimler kullanılarak yapılan incelemeler daha önemli hale gelmektedir.

Endüstride birçok amaçla kullanılan enzimlerin elde edilmesinin kaynakları hayvanlar, mikroorganizmalar ve bitkilerdir. Enzimler günlük yaşamda çok kez karşımıza çıkmaktadır. Temizlik malzemeleri, gıda, hayvanlar için yem üretim sanayisi ve tekstil

bunlara örneklerdir. Bu alanlardan en çok %32 olarak yiyecek, %25 ile temizlik ürünleri, %18 hayvanlar için yem ve %7 ile de tekstil sanayileri ile günümüze katkıları oldukça fazladır. Bazı enzimlerin endüstrideki görevleri Tablo 2.1’de gösterilmektedir [20].

Tablo 2.1 Bazı enzimlerin endüstrideki görevleri

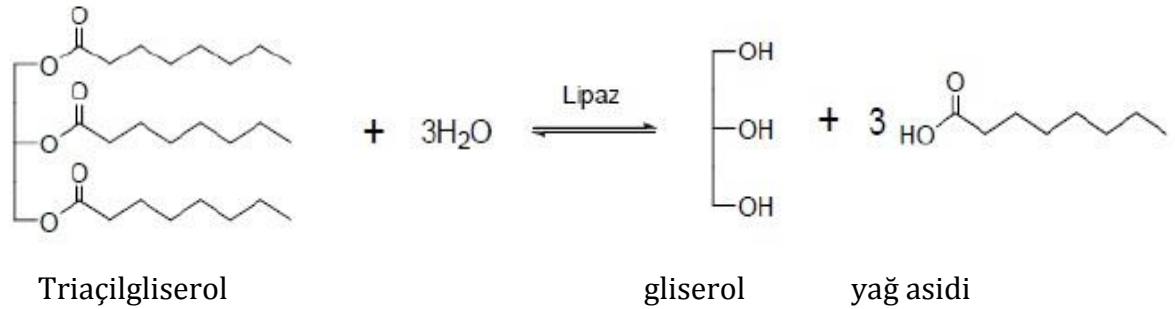
| Enzim Sınıfı      | Enzim               | Görevi                                                                                  |
|-------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Oksidoredüktazlar | Glukozoksidaz       | Hamurun güçlenmesi                                                                      |
|                   | Laktaz              | Aromanın artırılması                                                                    |
|                   | Lipoksigenaz        | Hamurun güçlendirilmesi ve ekmeğin beyaz halini alması                                  |
| Transferazlar     | Siklodekstrin       | Siklodekstrinin üretilmesi                                                              |
|                   | Fruktoziltransferaz | Fruktoz monosakkaritinin oligomerlerinin transferi                                      |
|                   | Transglutaminaz     | Viskoelastik olan özelliklerin modifikasyonu ve hamur ile etin işlemesi                 |
| Hidrolazlar       | Amilaz              | Nişastanın sıvı hale gelmesi, Ekmeğin kabarması ve yumuşak olması, Suların arıtılması   |
|                   | Galaktosidaz        | Hayvanların yedikleri yem olarak kullanılması                                           |
|                   | Lipaz               | Tatlandırıcı, aromatik özellikli moleküllerin sentezi, hamurun kabarması için emülsiyon |
|                   | Proteaz             | Sütte pıhtılaşma, Protein hidrolizi,                                                    |

Tablo 2.1 (Devamı)

| Enzim Sınıfı | Enzim                        | Görevi                                  |
|--------------|------------------------------|-----------------------------------------|
| Liyazlar     | Asetoasetat<br>Dekarboksilaz | Biranın zamanla olgunlaşması            |
| İzomerazlar  | Glukoz izomeraz              | Glukozdan früktoza olan<br>izomerasyonu |

## 2.9. Lipazlar

Hidrolazlar grubunda olan lipazlar sulu olan ortamlarda trigliseritlerin hidroliz olmasını sağlayan enzimlere denilmektedir. Lipazların hidroliz edilmesi sonucu diaçilgliserin, monoaçilgliserin ile gliserin ve son olarak yağ asitleri oluşmaktadır (Şekil 2.8.) [18].



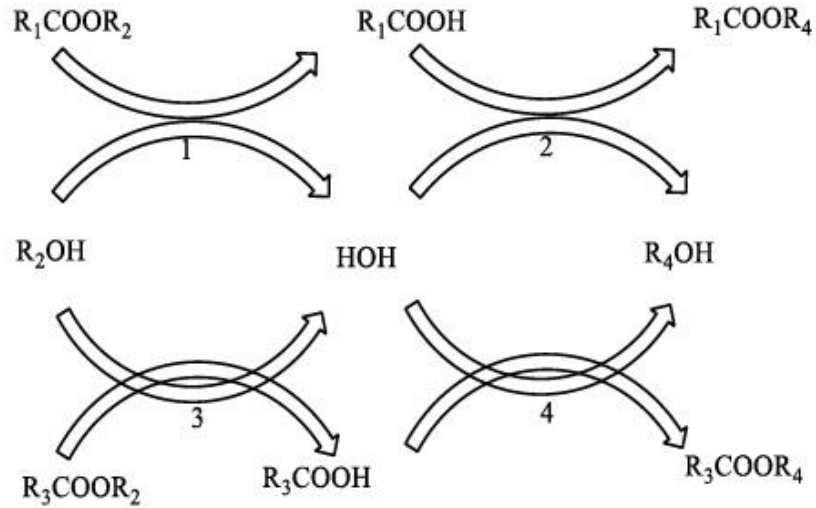
Şekil 2.8. Yağların hidroliz reaksiyonu

Esterlerin sentezlenme tepkimesini katalizleyen lipazların kendilerine özgü seçicilik özellikleri vardır. Yalnızca sulu olan ortamlarda tepkimeye girmeyip organik çözücüler eşliğinde de reaksiyonların katalizlenmesini sağlayan biyokatalizörlerdir. Lipazların önemli özelliklerinden biriside belirli substrat aralığının dışına çıkması, yüksek sıcaklık, pH ve son olarak organik çözücülere karşı istikrarlı bir şekilde özelliklerini koruyabilmesiyle önemli olan biyokatalizörlerden birtanesidir [21].

Lipazlar ikiye ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma karboksilesterazlar ile gerçek lipazlardan oluşmaktadır. Karboksilesteraz dediğimiz gruptaki lipazlar zinciri kısa olan karboksilik

asitten oluşan ve esterleri parçalayıp çözünme olayının suda gerçekleştiği lipazlardır. Gerçek lipaz olarak adlandırılan lipazlar ise zinciri uzun olan açilgliserollerin hidrolizini yapıp su içinde çözünmeyen lipazlardır. Triaçilgliserollerin hidrolizinde rol oynayan lipazlar lipit ile sudan oluşan ara yüzeyde aktif olup trigliseritlerle karşılaştırıldığında aktiviteleri maksimumdur.

Reaksiyon için uygun koşullar sağlanıp bu durumda çalışan ve katalitik olarak potansiyelleri büyük olan lipazlar; oksimoliz, esterifikasyon, aminoliz, transesterifikasyon ve transesterifikasyon yöntemiyle açıl grubu, açıl gliserol ve son olarak alkol arasında yer değişmesiyle oluşumu sağlanan alkoliz ile bir açıl grubu gibi birçok tepkimenin katalizini yapmaktadırlar [22]. Kataliz reaksiyonlarından birkaç örnek aşağıda belirtilmiştir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Lipazın tepkimeyi katalizinin bir şema şeklinde gösterilmesi [23].

Bu şemada 1: Hidrolizi, 2: Ester sentezini, 1-2: Alkolizi, 1-3: Asidolizi, 1-2-3-4: Transesterikasyonu göstermektedir.

### 2.9.1. Lipaz üretimi

Novo Nordisk adlı bir firma tarafından 1994 yılında ticari olarak ilk kez lipazın üretimi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak üretilen rekombinant lipaz ise *Aspergillus oryzae*'dir. Genencor International sayesinde 1995 yılında *Pseudomonas mendocina* varlığıyla Lumafast ile *Pseudomonas alcaligenes*'den bakteriyel olarak lipazın üretilmesi Lipomaxadıyla sağlanmıştır. Trigliseridlerin olmasıyla birlikte serbest olan yağ asitleri, sofr tuzları, gliserol ve hidroliz edilebilen esterler vb. maddelerin varlığıyla burada indükleyici olarak görev almışlardır.

Karbon ile azotun derişimi ve türü, pH, sıcaklık, oksijenin ortamdaki varlığı, inorganik olan tuzların konsantrasyonu vb. birçok faktörler üretimi yapılacak lipaz için önemlidir. Bu faktörler lipazın seviyesinde değişikliklere sebep olmaktadır.

Birçok karbon kaynakları kullanılmaktadır. Bunlar: Soya fasülyesi, zeytinyağı, susamdan yağ eldesi, ayçiçek yağı, yer fıstığından yağ, pamuk yağı, mısır yağı ve palmye yağı vb. bitkisel yağlarla birlikte basit şekerlerdir. Özellikle mısır unundan sağlanan özüt ve maya özütü azot kaynağı olarak mikroorganizmalarla kullanılmasıyla lipaz üretimi yüksek sonuç elde etmiştir. Lipaz sentezinde hızlandırıcı olmasını sağlayan ya da inhibe etmesine neden olan maddeler de vardır. İnhibe edici olarak kullanılan maddeler amonyumsülfat ve üredir. Hızlandırıcı olarak ise Tween-80 ile oleik asit gibi maddeler kullanılmaktadır [24].

### 2.9.2. Lipaz kaynakları

Lipazın keşfi ilk olarak 1856 yılında Claude Bernard aracılığıyla pankreas salgısında bulunmuştur. Ticari uygulamalar için lipaz kaynağı olarak hayvandan elde edilen pankreas özütlerinden sağlanmaktadır. Güngeçtikçe endüstriyel potansiyelin gelişmesiyle hayvansal kaynaklar bu durum karşısında yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı lipazın başka kaynaklardan elde edilmesi araştırılıp bitkiden ve mikroorganizmalardan lipaz kaynakları keşfedilmiştir. Mikroorganizmalardan lipazın izole olması kolay olması sebebiyle bakteri ile mantarlar yaygın olarak kullanılmaya

başlanmıştır. Bu şekilde lipaz kaynakları doğamızdan mikrobiyal, bitkisel ve son olarak hayvansal olarak eldesi sağlanmaktadır [25].

#### **2.9.2.1. Hayvansal lipazlar**

Hayvansal lipazlarda kendi içinde süt lipazı, sindirim ve doku sistemi olarak ayrılmaktadır. Doku lipazları denince akla adipoz, karaciğer ve lipoprotein gelmektedir. Pankreas ve incebağırsak ise sindirim lipazlarıdır.

Lipaz kaynağı olarak balıklarda kullanılmaktadır. Leopar köpek balığı, somon, sardunya, levrek, kefel ve gök kuşağı rengindeki alabalık, sindirim organları, yağlı olan dokular, sindirim bezleri ve karaciğer gibi dokular lipaz kaynağı olarak elde edilmiştir. Yalnızca yengeçler canlı durumdayken pankreası alınarak -20 °C’de tutulup lipaz için kullanılmıştır [26].

#### **2.9.2.2. Bitkisel lipazlar**

Endüstriyel bakımından kullanımı çok fazladır. Enerji sağlayan rezerv dokularda bu lipaz grubu bulunmaktadır. Mısır, buğday ve yulaftan elde edilen lipazlar bitkisel olarak adlandırılan lipazlardır. Kolza tohumu ile birlikte kene otu tohumu gibi bitkilerde lipaz mevcuttur. Türlerine göre farklılık gösteren bazı ağaçlarda da enzim bulunmaktadır. Amerika’nın Teksas’dan başlayarak Kuzey Kaliforniya’da son bulunan ve bu kıyı şeritlerinde yetişen Çin don yağı olarak bilinen ağaç *Sapium sebiferum* L.’den lipaz üretimi sağlanmıştır.

Yağlı tohumlar olan pamuk, ceviz, badem, çam fıstığı ve fındık vb. bitkilerden lipaz elde edilmiştir. Menengiç meyvesinde ve buğday tohumunda da lipaz bulunmaktadır [27].

### 2.9.2.3. Mikrobiyal lipazlar

Verim olarak yüksek getirisi olan mikroorganizmalardan elde edilen lipazlardır. Katalitik olarak aktiviteler yüksek, kolay sağlanan genetik manipülasyon ve değişen mevsimlerin etkilememesi sebebiyle düzenli olarak kaynak sağlamaktadırlar. Gelişimleri zor olmayıp uygun ortamlarda bulunmaktadırlar [28].

Hacmi küçük olan mikrobiyal lipazlar miktar olarak büyük derecede üretilebilmektedir. Bundan dolayı endüstriyel bakımından hayvansal lipazlara göre daha büyük önem taşımaktadır. Bakteri ile mantarların kullanılarak lipaz eldesi de mikrobiyal grubun içinde yer almaktadır. Bazı mikrobiyal kaynaklardan üretilen lipazların sıcaklık ve pH aralıkları Tablo 2.2.'de gösterilmiştir [29].

Tablo 2.2. Mikrobiyal kaynaklarla üretilen lipazların sıcaklık ve pH aralıkları

| Kaynağı                        | Optimum pH | Optimum Sıcaklık |
|--------------------------------|------------|------------------|
| <i>Aspergillus niger</i>       | 5,0-7,0    | 30-40 °C         |
| <i>Mucor japonicus</i>         | 5,5-8,5    | 30-40 °C         |
| <i>Rhizopus delemar</i>        | 5,0-7,0    | 30-45 °C         |
| <i>Rhizopus japonicus</i>      | 5,0-7,5    | 30-45 °C         |
| <i>Penicillium cyclopium</i>   | 4,5-7,5    | 30-50 °C         |
| <i>Penicillium roqueforti</i>  | 6,0-8,0    | 25-35 °C         |
| <i>Humicola lanuginosa</i>     | 5,5-8,5    | 40-60 °C         |
| <i>Candida cylindraceae</i>    | 5,0-8,0    | 30-50 °C         |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>     | 5,0-8,0    | 25-35 °C         |
| <i>Geotrichum candidum</i>     | 5,0-8,0    | 40-60 °C         |
| <i>Pseudomonas fragi</i>       | 7,0-9,0    | 30-55 °C         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 7,0-9,5    | 50 °C            |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 7,0-9,0    | 30-50 °C         |

#### Fungal lipazlar

Fermentasyonda kullanılabilmesi için ekstraksiyon metodunda düşük maliyetlerden dolayı teknolojiye daha çok fungal lipazlar tercih edilmektedir. Funguslardan en önemli olanları ise; *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Humicola*, *Candida*'dır.

## Bakteriyel lipazlar

Arthrobacte, Geobacillus, Chromobacterium, Achromobacter, Burkholderia, Pseudomonas ve Alcaligenes bakteriyel cinslerinden en önemlilerindendir [21].

### 2.9.3. Lipazların uygulama alanları

Lipazların substrata olan seçiciliği ile sterospesifiklik gibi özelliklerinin olmasından dolayı elde edilen ürünün kaliteli olması, ihtiyacı olan aktivasyon enerjisinin düşük olması, ısı ve pH'ın düşük olduğunda tepkime gerçekleştiği için ihtiyacı olan enerjinin azalması, reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin tepkime zamanındaki ortamın ısısının düşük olmasıyla birlikte oluşabilecek zararların azalması vb. özelliklerinden dolayı eczacılar, biyokimyacılar, organik kimyacılar, biyoteknologlar, mikrobiyologlar ve biyofizikçiler tarafından kullanılıp tercih edilmektedir.

Ticari amaçla saflaştırılan enzimler, endüstriyel uygulamalar için lipazlarla birlikte kullanılmaktadır. Ticari amaçla kullanılan enzimlerin %59 oranında proteazlar, %28 oranda karbonhidratlar, %3 ise lipazlar ve son olarak %10'u da diğer enzimler tarafından sağlanmaktadır. 1960 yılların bitimine doğru lipazlar tıp alanında sindirime yardımcı olarak kullanımı yapılırken teknolojinin gün geçtikçe gelişmesiyle kullanım alanında genişlemeye başlamıştır. Böylelikle mikrobiyel, hayvansal ve bitkisel olarak eldesi sağlanan lipazlar endüstriyel amaçla da kullanıma başlanmıştır [30].

Günümüzde önemli bir hale gelen atık sularının arıtılmasına yönelik çalışmalarda lipazlar önemli kullanım alanı oluşturmaktadır. Atık sularının arıtımı sırasında tortular oluşur ve tortular fabrikalar tarafından biyogaza dönüştürülmektedir. Bu dönüşümlerde enzimden oluşan karışımlar kullanılmaktadır. Bu karışımın içinde lipaz enzimide yer almaktadır. Kullanıma uygun olan ürünlerin içinde bulunan polietir atıkları da indirgenip laktonların ve esterifiye yapılmamış yağ asitlerinin sentezi de lipazların varlığıyla kullanılan uygulamalardır. Başka bir uygulama alanı ise soğutma araçlarında meydana gelen biyofilm tortularının yok edilmesi, oluşan atık yağların başka bir amaç için değerlendirilmesi ve fabrikaların oluşturduğu atık gazların saf olarak elde edilmesi

ve buna benzer birçok örnekte lipaz enziminin kullanıldığı görülmektedir. Lipazlara ait uygulamalardaki en önemlileri Tablo 2.3.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.3. Lipazların endüstriyel uygulamaları

| Endüstri | Görevi                | Ürün ya da uygulama           |
|----------|-----------------------|-------------------------------|
| Deterjan | Yağın hidroliz olması | Yağın kumaştan atmak          |
| Kozmetik | Sentez                | Nemlendirme yapanlar          |
| Kağıt    | Hidroliz              | Kaliteli kağıt                |
| Deri     | Hidroliz              | Deriden elde edilen ürün      |
| İlaç     | Transesterifikasyon   | Sindirim düzenleyicileri      |
|          | Hidroliz              | Özel olan lipitler            |
| Yağ      | Transesterifikasyon   | Margarin, gliserol, kakao yağ |
|          | Hidroliz              | Mono-diaçil gliseroller       |
| İçecek   | Aromanın gelişmesi    | İçecekler                     |
| Ekmek    | Tadın gelişmesi       | Raf ömrünün çok olması        |
| Temizlik | Hidroliz              | Yağı uzak tutmak              |

Lipazlar biyodizel üretimi, kozmetik, organik madde sentezi, deterjan, tekstil, biyosensör gibi endüstride geniş kullanım alanına sahiptir [31].

### 2.9.3.1. Deterjan endüstrisinde lipazlar

Deterjanda var olan kimyasalların en aza inmesi enzimlerin deterjan endüstrisinde bulunmasıyla olmaktadır. Bu şekilde hem canlının hem de doğal çevrenin zararı en aza inmesi sağlanmaktadır. Buna ek olarak çalıştığı sıcaklık ayarının düşük olmasından dolayı enerji tasarrufu da yapılmaktadır. Yağ lekelerinin oluşumunu sağlayan trigliseritteki çeşitliliğin fazla olmasıyla substratına karşı spesifik olması, 30 °C ile 60 °C aralığında sıcaklığın olması, pH'nın 10-11 olduğunda enzimin stabilliğinin yine aynı

kalması gibi nedenlerden dolayı deterjan endüstrisinde lipazlar başta gelmektedir. Toplam olarak lipazın satışı deterjan enzimlerinde hemen hemen %32'sini oluşturmaktadır. 13 milyon ton üretilecek olan deterjanda her yıl 1000 ton lipaz kullanılmaktadır [32].

Lipaz enzimi günlük hayatta birçok yerde karşımıza çıkmaktadırlar. Evde çamaşırların temizlenmesinde kullanılan deterjanlarda ve bulaşık deterjanlarında bulunan enzimlerdir. Deterjanda bulunan enzimler sayesinde lekeler basit bir forma dönüşüp lekelerin çok kolay çıkmasını sağlamaktadırlar [33].

1998 senesinde *Pseudomonas alcaligenes* M-1 ile üretilen alkali lipazı sayesinde yağlı olan lekelerin çok iyi bir şekilde çıktığı belirtilmiştir. Japonyada bulunan Miyoshi Yushi fabrikasında üretilen *Candida rugosa* lipazı, sabun elde etmek için katı ve sıvı yağlardan hidroliz yapılmaktadır [34].

Lipazların temizleyici olmasının dışında kireçlenmeyi önlemek amacıyla da kullanılmaktadır. Kuru temizleme yapılan yağın bileşenlerinin ayrılıp temizlenme işleminin kolaylığı, derinin yapıldığı endüstrilerde temizleyici olarak kullanılması, lenslerde meydana gelen tortuları temizlemede, olukların yağ parçacıklarıyla tıkanması sonucu temizlemede, boşaltma amacıyla kullanılan borularda, lağım borularında bulunan atıkların parçalanıp temizlenmesinde ve hayvan gübreleri gibi birçok temizleme alanında kullanılmaktadır [35].

### **2.9.3.2. Gıda endüstrisinde lipazlar**

Biyolojik olan malzemelerde besin üretim sanayisinde ve gıdada lipazlar kullanılmaktadır. Peynirin olgunlaşp tatlandırılmasında, meyvelerde, sebzelerde, süt ürünlerinde, birada ve bunlara benzer birçok gıdalarda lezzetin artmasında kullanılmaktadır. Ayrıca balık ile et gibi ürünlerde yağın uzaklaştırılmasında da görev almaktadır [36].

Tereyağı, sıvı-katı yağ, şekerleme, hazır satılan gıdalar, tahıllar vb. gıda maddelerine ek olarak lipazlar katılmaktadır. Kahveye süt yerine katılan beyazlatıcılara, hamurlara ve çorbalara lipaz ilavesiyle modifiye edilip krema şeklinde eklenmektedir. Bunun yanında sütte bulunan yağların hidrolizinde de görev almaktadır [30].

Gıdalarda oluşan bazı mikroorganizmalar bozulmaya sebebiyet vermektedir. Bu bozunmalara neden olan mikroorganizma ile gıdada bulunan toksinler lipazlar tarafından tespit edilebileceği bulunmuştur. Gıdaların bozulup çürümesinde rol oynayan psikotrof organizmalarda etkin olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [37].

Lipitler farklı farklı özellikler göstermektedirler. Bu farklı değişimlerde lipazların görevi, gliseritte bulunan yağ asidi zincirlerinin bulunduğu konumu başka yağ asitleriyle yer değiştirerek özelliklerinin değişmesini sağlarlar. Bu şekilde uygulanan metotta hem daha ucuz hemde lipidin az olması sebebiyle daha kaliteli yağ elde edilmesi sağlanmaktadır [38].

#### **2.9.3.3. Kağıt endüstrisinde lipazlar**

Balmumu ya da katran gibi ağaçlarda hidrofobik olan bileşenlerinin kağıdın hamur ve üretiminin yapılması sırasında problemlere ve oluşan kağıdın kalitesiz şekilde olmasına neden olmaktadır. Burada lipazların görevi kağıt hamurunda bulunan katranın çıkmasını sağlamaktır. Bu şekilde olumsuzluklar ortadan kaldırıldığından dolayı kağıdın üretiminde yer almaktadır. Bu tür sorunları sonuca ulaştırmak amacıyla trigliseritlerin yaklaşık %90 oranında hidrolizini gerçekleştiren *Candida rugosa* adlı fungal lipazı kullanılarak Japonya'da bulunan Nippon Kağıt Endüstrisi yeni bir metod geliştirmiştir. Kağıdın beyaz renkte olması fungal lipaz ile sağlanmaktadır. Funguslar lipazlardan olan *Pseudomonas* türleri kağıt enstitüsünde bulunan türlerdendir [39].

#### **2.9.3.4. Tekstil endüstrisinde lipazlar**

Tekstil endüstrisindeki enzimler içinden özellikle de lipaz enzimi çok büyük öneme sahiptir. Boyanın sebep olduğu yağların kumaştan ayrılmasını sağlayarak güzel bir

şekilde boyanmasını gerçekleştirirler. Kot ile pamuktan oluşan bu iki tür kumaşın şekil almasında kullanılan preparatlarda da bu enzime rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra ürünlerin dayanıklı olması, leke tutmaması, yumuşak olması ve esneklik kazanması gibi amaçlarla lipaz enzimi kullanılmaktadır [21].

#### **2.9.3.5. Kozmetik ve parfüm endüstrisinde lipazlar**

Kozmetik sanayisinin bir parçası olan sürfaktanların üretilmesinde lipaz enziminin önemi büyüktür. Diaçilgliserollerle monoaçilgliserollerin, lipaz enzimiyle katalize olan gliserolün esterifikasyon tepkimeleriyle sürfaktanlar oluşmaktadır.

Bu endüstride transesterifikasyon yöntemiyle parfümde kokuların üretilmesiyle birlikte rasemik ara ürünlerinden hepsinin ayrışmasında lipazlar kullanılmaktadır. Lipazların üretimi *Pseudomonas cepacia* ile sağlanmış olup, sitronelolün bromometoksilasyonu ile oluşan rasemik güldeki oksitlerin ayrışması da lipazlar sayesinde olmaktadır [40].

Gargara için kullanılan sıvılar ile traşta kullanılan kremlerin içinde mentol kullanılmaktadır. Bu mentollerin üretimi esterifikasyon yöntemiyle yapay şekilde oluşturulmaktadır. Doğal olarak mentolün yeterli olmamasından dolayı bu şekilde yapay olarak elde edilmektedir. Lipazların üretiminde *Pseudomonas fluorescens* ile *Pseudomonas cepacia* katkı sağlamışlardır. Lipazların elde edilmesiyle birlikte mentol esterleri üretilmesinden patent alınmıştır [41].

#### **2.9.3.6. Biyodizel endüstrisi**

Alternatif olarak enerji kaynağımız biyodizel, hem yenilenebilir hem de parçalanabilir bir yakıttır. Pirinç kepeği, hurma yağı, soya fasulyesinden yağ, pamuk yağı, hayvandan elde edilen yağ, atıklardaki sıvı yağlar vb. birçok örneklerden biyodizel üretimi sağlanmaktadır. Biyodizel üretimi fosil yakıtlarından da eldesi mümkündür fakat bu çok zor ve pahalıdır. Bundan dolayı bitkisel yağlar kullanılarak enzimatik transesterifikasyon yöntemiyle üretim sağlanmaktadır.

Biyokatalitik, kemokatalitik ve termokatalitik gibi yöntemlerle de biyodizel üretimi olmaktadır. Buradaki biyokatalitik yöntemde biyodizel üretimi için biyokatalizörler kullanılmaktadır. Biyokatalizör görevi yapanlar ise lipazlardır [42].

Katalizörlerin pahalı olması endüstride daha önemli bir sorun haline gelmiştir. Bundan dolayı *Rhizopus oryzae* adlı lipazlar biyokatalizör amacıyla kullanılarak maliyetlerin düşmesini sağlamaktadırlar [43].

#### **2.9.3.7. Organik madde sentezinde lipazlar**

Organik şeklinde gerçekleşen maddelerin sentezinde artık lipazlarda kullanılmaktadır. Hidrofilikle lipofilikden oluşan yüzeylerde enzimler olup, tepkime karışımında bulunan organik çözücülerini etkisizleştirirler. Tepkime sırasında bulunan suyun miktarına göre tepkimenin yönünün nasıl olması gerektiğini lipazlar tarafından belirlenir. Suyun varlığında hidroliz reaksiyonu gerçekleşirken suyun yokluğunda ya da az olmasında transesterifikasyon ile esterifikasyon reaksiyonu oluşmaktadır [33].

#### **2.9.3.8. Oleokimyasal endüstrisinde lipazlar**

Hidroliz, gliseroliz ve son olarak alkoliz sırasındaki enerjiyi koruyup termal derecenin minimum seviyesinde olmasını sağlamak amacıyla oleokimyasal endüstrisinde lipazlar yer almaktadır. Bundan dolayı bu endüstride kullanım alanı büyüktür.

Alkoliz, hidroliz ile gliseroliz reaksiyonlarını içinde barındıran birçok reaksiyonlar, substratların üstünde sıralanmış immobilize olan lipazların kullanılarak gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu şekilde prosesin sürekli olarak işlenmesi sağlanır ve verim oldukça yüksektir [44].

#### **2.9.3.9. Biyosensör olarak lipazlar**

Biyosensörler biyokimyasal, biyolojik, kimyasal ve elektroniklerin birleşmelerinden meydana gelmektedir. Enzimler proteinde, immobilizasyonda, antikorda, hücreler veya

sinyal üretilmesini sağlayan biyosensörlerde bulunmaktadır. Biyoluminesanslı adlı bakteriyel bileşenler tıp alanında çalışılarak gelişmesi sağlanmıştır. Klinik olarak lipazların önemi lipitlerin belirlenmesini sağlamaktadır. Gliserolün sentezinde lipazlar kullanılarak enzimatik reaksiyon ile ayrılan gliserolün miktarının ne kadar olduğu hesaplanabilmektedir [45].

#### 2.9.4. Lipaz enziminin saflaştırılması

Enzimin katılmasıyla katalizlenen reaksiyonların veriminin yüksek olmasıyla saflaştırma önemli hale gelmiştir. Üç boyutlu olan yapısı ve genel aminoasit diziliminin bulunmasında saflaştırma önemlidir. Saf olarak elde edilmiş olan lipazın X ışınıyla yapılan çalışmaları ve yapısının saptanmasıyla birlikte kinetik mekanizmanın nasıl olduğunun öğrenilmesi sağlanmaktadır [46].

Saflığı yüksek olan enzim elde etmek için kromatografik yöntemlerden bir tanesini uygulamak yetersizdir. Jel filtrasyon (GFC), hidrofobik etileşim sağlayan kromatografi (HIC) ve iyon değişim kromatografisi (IEC) vb. yöntemler lipazın saf olarak elde edilmesinde kullanılan yaygın yöntemlerdir [47].

Gelder ile Pauwels lipazın saf olarak elde edilmesinde salgı mekanizmalarından faydalanarak yeni bir yöntemin gelişmesini sağlamışlardır. His-işaretili immobilize olmuş lifi kullanıp saflaştırma işlemi uygulanmıştır. *Pseudomonas cepacia* sayesinde alkalen lipazın saf olarak elde edilmesini sağlarken Amberlit iyon değiştirme reçinesiyle ‘Genişletilmiş Tabaka Absorpsiyonu’ (Expanded Bed Absorption, EBA)’yla saflaştırma yapılmıştır. Bu yeni teknik ile ham enzimin ön saflaştırma yapılmadan direk EBA ile saflaştırılmasıdır [48].

#### 2.8.5. Lipaz kaynağı olarak süpürge tohumu

Anavatanı Afrika olan (Broomcorn Seed) süpürge tohumunun *Sorghum vulgare* türünden olup kuru yem, silaj, süpürge, duvar kaplama, şıra ve benzeri birçok alanda kullanılmaktadır [49].

Sorghumun uzun lifli, sağlam ve esneyebilen bir yapısı olup süpürgein yapılmasında kullanılmaktadır (Şekil 2.10.). Orta Afrika Bölgesi asıl yeri olmasına karşı yetiştirilmesi Akdeniz ülkelerinde daha çok yapılmaktadır. 1500’lü yılların bitimine doğru bu süpürge darısından olan uzun panikulalı türleri İtalya’da ilk kez süpürge yapılmasında kullanılmaya başlanmıştır [50].



Şekil 2.10. Süpürge tohumu

Yurdumuzda ise süpürge darısının en çok Trakya Bölgesi’nde yetişmektedir. Sakarya Bölgesi’nin Kaynarca ilçesinde de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu bölgelerde geniş tarlalara ekilmektedir. Son yıllarda teknolojinin de gelişmesine bağlı olarak her yerde elektrikli süpürgein yaygınlaşmasıyla ve naylon olan liflerden süpürge yapılmasıyla süpürgecilikteki el sanatın körelmesiyle birlikte süpürge ekiminin gün geçtikçe azalmasına neden olmaktadır. Süpürge darısı artık daha çok çiçek salkımı panikulalarıyla yetiştirilmeye başlanmıştır. Süpürgede bulunan tanelerin hayvanlar tarafından beslenmesinde ve sap-yaprak kısımlarının ise kağıt üretiminde kullanılması sağlanmaktadır [51].

Süpürge üzerine yapılan araştırmada saplarından elde edilen yemin değerinin az olduğu fakat olgunlaşan tanelerinden yapılan yemin ise yulafın değerine yakın olduğu bulunmuştur. ABD’nin İllinois Bölgesi’nde süpürge darısından süt veren hayvanlar için silaj yapmak amacıyla üretimi yapıldığı bilinmektedir [52].

Yüksek verim elde etmek ve çevre koşullarına uyum sağlayabilmesi için azota ihtiyaç duymaktadır. Azot içeren gübrenin kullanılmasıyla verimin önemli derecede arttığı araştırmacılar tarafından tespit etmişlerdir. Genel olarak düz geniş alanlarda yetiştirilen sorghum, erozyonun olabileceği eğimli alanlarda da yetiştirilip hem erozyonun önüne geçilir hemde hayvanlar için yem sağlanmış olunur [53].



## **BÖLÜM 3. DENEYSEL KISIM**

### **3.1. Materyal**

#### **3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler**

Gum arabik, metanol, sodyumdeoksikolat, asetik asit,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$  (sodyumdihidrojenfosfat), aseton,  $\text{NaHCO}_3$  (sodyumhidrojenkarbonat),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (sodyumhidrojenfosfat), gliserol, amonyum sülfat, SDS (sodyumdodesilsülfat), N,N-metilenbisakrilamit, Tris (tris (hidroksimetil) aminometan), bromfenolblue, 2-merkaptotanol, N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED), glisin, Coomassie Brilliant Blue R250, Coomassie Brilliant Blue G250, Sephadex G-100, Marker, bütanol, hekzan, NaOH,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  Sigma-Aldrich Fluka ve Merck firmalarından teminatı sağlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan süpürge tohumu ve zeytinyağı piyasadan sağlanmıştır.

#### **3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar**

Öğütücü: Ev tipi

Vortex: Heidolp ReaxTop

Su banyosu: DAIHAN WB-11

Soğutmalı santrifüj: Sigma K30

pH metre: SCHOTT Lab850

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı: DAIHAN MSH-20A

Etüv: BINDER

Buzdolabı: Ev tipi

Saf su cihazı: Merck Millipore

Elektroforez güç kaynağı: HEALTEC Elite300

Spektrofotometre: SHIMADZU UV1700 PharmaSpec

Elektroforez tankı: HEALTEC MiniGES Elite300

Analitik terazi: SHIMADZU ATX220

Mikropipetler: BIOHIT Proline

### 3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. 0,1 M pH = 7,0 fosfat tamponun hazırlanması; 7,801 gram tartılan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (sodyumdihidrojenfosfat) pH'ı 1,0 M NaOH ile pH = 7,0 olarak ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 350 mL'ye tamamlandı.
2. %10'luk gum arabic çözeltisinin hazırlanması; 18 g olarak tartılan gum arabic 180 mL saf su ile çözüldü. Çözülme işlemi manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Daha sonra süzülerek çözelti berrak şekilde elde edildi.
3. %1,6'lık sodyumdeoksikolat hazırlanması; 0,8 g tartılan sodyumdeoksikolat 50 mL saf su ile çözülmesi sağlandı.
4. Tris çözeltisinin hazırlanması; 0,606 g Tris (hidroksimetil aminometan) tartılarak pH = 7,0 olacak şekilde 1 M HCl ile pH ayarlaması yapıldı. Son olarak hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
5. 0,05 M'lık  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  hazırlanması; 15,601 g tartılan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M NaOH ile pH 7,0 olarak ayarlandı. Saf ile de hacim 200 mL'ye tamamlandı.
6. 1 M Tris-HCl'lik pH = 8,8 olan çözeltinin hazırlanması; 12,114 g tartılarak 60 mL'ye yakın saf suda çözülerek 1,0 M HCl ile pH = 8,8 olarak ayarlandı. Hacim 100 mL'ye tamamlanmasıyla 4 °C'ye kaldırılır.

7. 1 M Tris-HCl'lik pH = 6,8 olan çözeltinin hazırlanması; 12,114 g tartılarak 60 mL'ye yakın saf suda çözülerek 1,0 M HCl ile pH = 6,8 olarak ayarlandı. Hacim 100 mL'ye tamamlanmasıyla 4 °C'ye kaldırılır.
8. %10 Amonyum persülfatın hazırlanması; 0,1 g amonyum persülfat tartılıp 1 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
9. %10'luk SDS hazırlanması; 4 g SDS tartılarak 40 mL saf suda çözünmesi sağlandı.
10. Boyamada kullanılmak üzere çözeltinin hazırlanması; %0,1'lik Coomassie Brilliant Blue R250, %10'luk asetik asit ve %50'lik metanolün birbirini içine ilave edilerek hazırlanmaktadır
11. Yıkamada kullanılan çözeltinin hazırlanması; %10'luk metanolün içine %7'lik asetik asitin karıştırılmasıyla oluşmaktadır.
12. 0,01 N NaOH çözeltisinin hazırlanması; 0,1 g NaOH tartılıp balon jojeyle hacmi 250 mL oluncaya dek saf su eklendi.

### 3.2. Metotlar

#### 3.2.1. Homojenatin hazırlanması

Materyal olarak süpürge tohumu kullanılmıştır. Yurdumuzda en çok Trakya'da olup bazı illerimizde de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu tez için kullanılan süpürge tohumu Sakarya'nın Kaynarca ilçesinden sağlanmıştır.

Süpürge tohumunun teminatı sağlanmıştır. Uzun ve lifli sapları kesilerek tarlada kuruyan süpürge otlarının uç kısımlarındaki tohumlar toplanır. Bir öğütücü yardımıyla homojenize edilir. Süpürge tohumunun sert olmasından dolayı öğütücü olarak ev blenderı ile toz haline gelmesi sağlanmıştır. Bu tohumlar kullanıma hazır olup 4 °C'de saklanır. Süpürge tohumundaki proteinlerden yağsızlaştırma işlemi yapılarak ekstrasyon

gerçekleştirilir. Böylelikle süpürge tohumundan ham ekstrat elde edilip daha sonraki çalışmalar için saklanır.

### **3.2.2. Süpürge tohumundaki proteinlerden yağsızlaştırma yapılması ve ham ekstraktın hazır olması**

Öğütülen süpürge tohumundaki proteinlerden yağın giderilme işleminin yapılmasına yağsızlaştırma denir. Yağsızlaştırma işlemi farklı çözücülerle yapılmaktadır. Bu işlemler çözücü kullanılarak 4 °C’de uygulanmıştır. Bu tezde yağsızlaştırma işlemi aseton, hekzan, kloroform ile metanol karışımı (1-1), n-bütanol ve son olarak etilasetat çözücüleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polariteleri farklı olan çözücüler kullanılarak yağdan enzimlere gelebilecek olası zararlar oluşmadan uygun çözücüyle ayrılması sağlanmıştır. Öğütülmüş olan süpürge tohumlarından 50 g alınıp 180 mL çözücü kullanılarak 3 saat boyunca Soxhlet cihazında ekstrakte edilmesi sağlandı. Soxhlet sonrasında ise rotarotaevaporatörde çözücünün uzaklaştırılması sağlandı. Bu şekilde yağsızlaştırılmış süpürge tohumların tartımı yapılarak buzdolabında saklanmıştır.

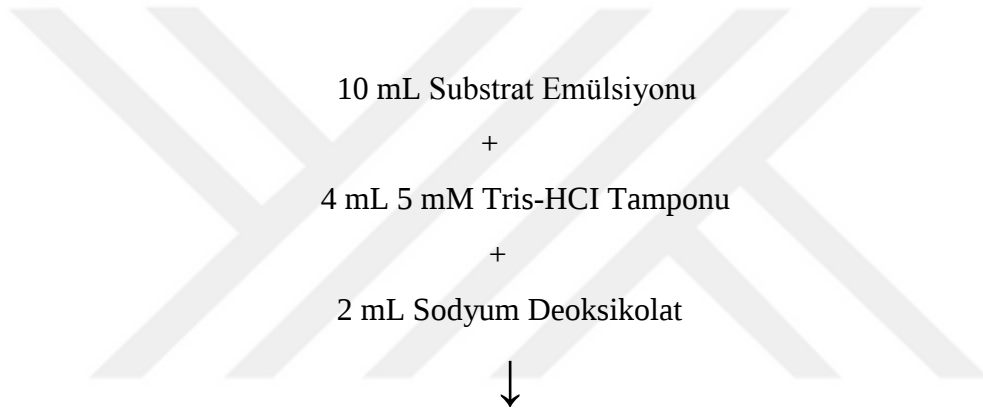
Süpürge tohumundan ham ekstratın elde edilmesi için yağı alınmış 20 g süpürge tohumuna 120 mL 0,06 M’lık sodyum fosfat tamponu pH = 7,0 (1:6, w/v) eklendi. Manyetik karıştırıcıda 1 saat +4 °C’de karıştırma işlemi yapıldı. Sonrasında ise ağzı kapalı bir şekilde buzdolabında bir gece bırakıldı. İki kat tülbent ile homojenizat süzülerek 20000 rpm ve 0 °C’de 30 dakika boyunca santrifüj işlemiyle birlikte süpürge tohumundan ham ekstrat elde edildi.

### **3.2.3. Lipaz aktivite tayini**

Süpürge tohumu kullanılarak elde edilen lipaz enziminin hidrolitik olarak aktivitesinin yapılmasında lipazın, hidroliz sonucuyla oluşan yağ asitlerinin 0,01 N NaOH ile titre edilerek aktivitenin bulunduğu yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem uygulanmadan önce substrat emülsiyonu ilk olarak hazırlandı.

1. 30 mL %10'luk hazırlanan gum arabic (manyetik karıştırıcıda çözülerek süzme işlemi yapıldı ve böylelikle çözeltinin berrak olması sağlandı).
2. 3,5 mL yağ
3. 2,5 g saf su ile hazırlanan buz parçası

Yukarıda bulunan bu üç madde bir beherin içinde karıştırıldı. Manyetik karıştırıcıda sıcaklığın değeri 30 °C'nin aşağısında olacak şekilde ayarlanıp 10 dakika boyunca çözeltinin homojen olması sağlandı. Su banyosu 37 °C olarak ayarlanarak homojen çözelti burada 0,1 N NaOH ile pH = 7 oluncaya dek titre edilip substrat emülsiyonu elde edildi. Daha sonra lipaz aktivitesinin tayini için aşağıda bulunan basamaklar izlendi.



37 °C olan su banyosunda pH = 7,7 oluncaya dek 0,01 N NaOH ile titrasyon yapıldı.



Bu çözeltiye 500 µL enzim çözeltisi eklenir.



Enzimin eklenmesiyle birlikte çözeltinin pH'ında gerçekleşen düşme 0,01 N NaOH ile yapılan titre sonrasında pH yine eski haline (pH = 7,7) ayarlandı.



Titrasyonda NaOH'in ne kadar harcandığı kayıt edildi.

Titrasyon süresince sıcaklığın 37 °C’de sabit kalmasına dikkat edildi. NaOH miktarının ne kadar harcandığı tespit edilerek aşağıda bulunan formüller yardımıyla lipazın hacimsel olarak aktivitesi ile hacimsel spesifik aktivitelerinin hesaplanması yapıldı. Hacimsel aktiviteye ait denklem aşağıdaki gibidir (Şekil 3.1.).

$$\text{Hacimsel Aktivite(HA)} = \frac{\text{Harcanan NaOH miktarı/dk}}{\text{Enzim çözeltisinin hacmi (mL)}} = \text{U/mL}$$

Şekil 3.1. Hacimsel aktivite denklemi

**Spesifik Aktivite:** Bir miligram enzim bulunduran proteinin, bir dakika boyunca değişime uğrayan substratın mikromol cinsinden miktarının tanımlanmasına denir (Şekil 3.2.).

$$\text{Hacimsel Spesifik Aktivite(HA)} = \frac{\text{Hacimsel Aktivite(HA)}}{\text{Enzim çöz. protein miktarı * (mg/mL)}} = \frac{\text{U}}{\text{mg(protein)}}$$

Şekil 3.2. Hacimsel spesifik aktivite denklemi

#### 3.2.4. Bradford yöntemi ile protein tayini

Coomassie Brilliant Blue G-250’nin bulunduğu ortamda fosforik asitin varlığıyla proteinlere bağlanması sonucu kompleks oluşur. Bu kompleksin absoransı 595 nm’de maksimumdur. Protein ile boyanın bağlanma olayı (2 dakika) hızlı gelişmektedir. 1-100 µg aralığında hassasiyet göstermektedir.

Standart olan protein grafiği öncelikle çizilmiştir. Bu grafiğin çiziminde stok çözelti olarak 1 mg/mL BSA’dan (sığır serum albümini) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden farklı hacimlerde alınarak (20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL ve 100 µL) Bradford reaktifiyle son hacimleri 1 mL olacak şekilde tamamlanmasıyla standart protein çözeltilerinin hazırlanması sağlanmıştır. Absorbans 595 nm’ye ayarlanarak ölçüm yapılmıştır. Böylelikle alınan sonuçlarla birlikte grafiğin çizimi yapılmıştır. Bu grafikten yararlanılarak örneklerin protein miktarlarında tayini sağlanmıştır.

### 3.2.5. Üçlü faz yöntemi ile saflaştırma

Daha önce süpürge tohumundan hazırlanmış olan ham enzim ekstratı kullanılır. Bu ekstrattan 2 mL alınarak amonyum sülfatın belli konsantrasyonlarda (%10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 ve %90) eklenmesiyle birlikte amonyum sülfat doygunluğuna getirilmesi sağlandı. Enzim ile /tert-butanolun katılma oranları ise 1-1, 2-1, 1-2 şeklinde uygulanmıştır. Bu işlemlerden sonra karışım oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat kadar bekletilmiştir. Bekleme sonucunda 10 dakika süre boyunca ve 4000 rpm'de santrifüj yapılarak fazların birbirinden ayrımı gerçekleşmiştir. Bu üçlü fazın organik faz olarak adlandırılan üst kısmı herhangi bir pipetle uzaklaştırılmıştır. Alt taraftaki sulu faz pipetle alınmasıyla bu iki fazda birbirinden ayrılmıştır. Geriye enzim içeren faz ise pH = 7 tamponu ile çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak bu iki faz için hem enzimin aktivitesi hem de protein miktarının bulunmasında kullanılmıştır.

### 3.2.6. SDS jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Proteinlerin bulunduğu ortama elektriksel alan koyularak hareket etmeleri sağlanır. Hareket etmesi difüzyon sabitine, molekülün üzerinde bulunan net yüke, molekülün biçimi ve son olarak ağırlığına bağlı olarak sağlanmaktadır. Poliakrilamid jele moleküller yerleştirilir. Buradaki jel sabit fazı gösterir. Elektrik akımı ise hareketli fazdır. Elektroforez yönteminde pH'nın bazik olduğu aralıkta çalışılıp molekül üstündeki yük (-) olur ve böylelikle moleküllerin yönü (+) kutuba doğru olur. Bu şekilde ilerlerken jelin yapısı gözenekli olmasından dolayı ayrışmayı sağlamaktadır. Moleküller jelde ilerlerken jelin dışına çıkmaması için molekül ağırlığı küçük olan (-) yüklü bromfenol mavisi jelde önde giderek jelin bitimine geldiğinde bu işlem durdurulur ve böylelikle moleküller jelde kalmış olur. Sonraki aşama olarak proteinlerin boyanması işlemi uygulanarak görünür olmaları sağlanarak molekül ağırlıkları tespit edilir.

Molekül ağırlığının bulunması esasına göre yapılacak olan elektroforezde çoğunlukla sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi kısaca SDS-PAGE tercih edilmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada %5'lik bir yükleme jeli ile %12'lik bir ayırma jeli kullanarak SDS-PAGE gerçekleştirmiş olduk. SDS-PAGE bileşenlerine ait miktarlar Tablo 3.1'deki gibidir.

Tablo 3.1. SDS-PAGE için bileşenlerle birlikte miktarlarının gösterimi [63].

| Bileşenler                                       | Ayırma jeli (%12) | Yükleme jeli (%5) |
|--------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                                  | -                 | 1,25 ml           |
| Yükleme jeli tamponu<br>1 M Tris-HCl pH = 6,8    |                   |                   |
|                                                  | 2,5 mL            | -                 |
| Ayırma jeli tamponu<br>(1.5 M Tris-HCl pH = 8,8) |                   |                   |
| %10 SDS                                          | 0,1 mL            | 0,1 mL            |
| %30                                              | 4,0 mL            | 1,67 mL           |
| Akrilamid/Bisakrilamid                           |                   |                   |
| Saf Su                                           | 3,3 mL            | 6,87 mL           |
| %10 APS                                          | 0,1 mL            | 0,1 mL            |
| TEMED                                            | 0,004 mL          | 0,01 mL           |

Ayırma jeli gösterilen sıraya göre beherde karıştırılır. Temiz olan cam plaka aralığına mikropipet yardımıyla saf su dökülerek bir sızıntı olup olmadığı test edilerek saf su adi süzgeç kağıdı yardımıyla emilmesi sağlanır. Daha sonra ayırma jeli buraya dökülür. Jelin donması gerçekleştikten sonra hazırlanan yükleme jeli plakalar arası boşluğa aktarılır ve tarakların yerleştirilmesiyle birlikte donmak üzere beklenilir. Jelin donması gerçekleştikten sonra plaka elektroforez tankına koyularak yürütme tamponuyla tankın dolması sağlanmıştır. Standart proteinlerden 1 oranında örneklerden ise 2 oranında alınıp numune tamponuyla karıştırılarak 10 dakika boyunca 95 °C'de denatüre olması sağlanmıştır. Jellerden tarakların çıkarılmasıyla oluşan kuyulara denatürasyon sonrası elde edilen örnekler yüklenmesiyle tank kapatılarak elektroforez başlatılmıştır. Yükleme jelinin bitimine kadar 20 mA'de, ayırma jelinin bitimine kadar ise 25 mA'de proteinlerin yürütülme işlemi gerçekleşmiştir. Bu işlemten sonra elektrik akımı durdurularak jelin çıkarılması sağlanır. Yaklaşık olarak 3,5 saate yakın boyama

çözeltisinde çalkalanması sağlanır. Bu işlemden sonra proteine ait bantların görünür olması için hazırlanan boya giderme çözeltisinde bekletilir. Boyanın jelden ayrılması gerçekleşinceye kadar çözelti sürekli değiştirilerek bu işlem uygulanır.

### 3.2.7. Lipaz enziminin hidrolitik karakterizasyonu

Süpürge tohumundan eldesi sağlanan lipaz enziminin hidrolitik olarak karakterizasyonunun belirlenmesi için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

1. Substrat spesifikliğı tayini
2. Optimum reaksiyon süresi
3. Optimum sıcaklığın tayini
4. Optimum pH tayini
5. Depo kararlılığının tayin
6.  $\text{Ca}^{2+}$  iyonun aktiviteye etkisi
7. Aktivitede metal iyon etkisi
8. Aktiviteye etki eden bazı deterjanlar
9.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması
10. Aktivasyon enerjisinin tayin edilmesi
11. İnhibitörün aktivite üzerindeki etkisi

#### 3.2.7.1. Substrat spesifikliğı tayini

Lipaz enziminin hangi substrata spesifik olduğunu belirleyebilmek için bu tayin yapılmıştır. Substrat olarak ayçiçek yağı, kayısı yağı, zeytinyağı, mısır yağı, argan yağı, fındık yağı ve tribütirin kullanılmıştır. Substratların hepsi için spesifik aktivite ölçümü yapıldı. Aktivitenin en yüksek olmasını sağlayan substrat diğer basamaklarda kullanılmak üzere belirlenmiştir.

### 3.2.7.2. Optimum reaksiyon süresi tayini

Zamanın süpürge tohumu lipazına etkisinin belirlenmesinde 1 ile 15 dakika boyunca farklı sürelerde ölçümler yapıldı. Ölçümler belirlenen zaman aralığındaki aktivitenin maksimum olduğu değer bize reaksiyon süresini göstermektedir.

### 3.2.7.3. Optimum sıcaklığın tayini

Enzim aktivitesinin hangi sıcaklıkta maksimum olduğunu bulabilmek için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve son olarak 90 °C olmak üzere toplamda 8 farklı sıcaklık kullanılarak deneme yapıldı. Bu denemelerden yola çıkarak hidrolitik aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık tespit edildi.

### 3.2.7.4. Optimum pH tayini

Enzim aktivitesinin hangi pH'da maksimum olduğunu bulabilmek için 4, 5, 6, 7 ve son olarak 7,5 pH'larında 0,1 M'lık fosfat tamponları kullanıldı. 8, 8,5, 9, 9,5 pH'larda ise 5 mM'lık Tris-HCl tamponları hazırlanarak kullanıldı. Tamponların kullanılması sonucu yapılan ölçümlerde birlikte aktivitenin en yüksek olduğu pH bulunmuştur.

### 3.2.7.5. Depo kararlılığının tayini

Süpürge tohumu ham ekstratının -20 °C'lik derin dondurucu ile bir yıl kadar saklanmıştır. Belirli zamanlarda (ayda bir) ve hep aynı hacimlerde alınarak standart şartlardaki aktiviteler bulunmuştur. Enzimin aktif kalma süresi tespit edilmiştir.

### 3.2.7.6. $Ca^{2+}$ 'nin aktiviteye etkisi

$Ca^{2+}$  iyonu lipaz enzimi için aktivatör görevini üstlenmektedir. 0,25- 0,5-1-2-3-5-10 mM olarak 7 derişimde  $Ca^{2+}$  iyonunun kullanılması sonucu enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir.

### 3.2.7.7. Aktivitede metal iyon etkisi

Süpürge tohumuyla eldesi sağlanan lipaz aktivitesinin metal iyonlarının varlığında etkisinin bilinmesi için metal içeren çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler 10 mM 50 mL'lik şeklinde  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ve son olarak EDTA kullanıldı. Bu çözeltilerin hazırlanmasıyla aktivite tayini yapımı sırasında emülsiyona belli miktar eklenerek 9 farklı metal iyonun aktivite üzerinde meydana gelen değişimi tespit edildi.

### 3.2.7.8. Aktiviteye etki eden bazı deterjanlar

Deterjanların çözünürlüğün değişmesine sebebiyet vermesinden ötürü proteinin saflaştırılma üzerindeki etkisi büyüktür. Aktivite üzerinde deterjanların etkisini bulabilmek için %1,6'lık birbirinden farklı deterjan çözeltileri kullanıma hazır hale getirilerek aktivite tayini esnasında belli miktarlarda bu çözeltilerden ilave edildi. Anyonik olarak; sodyumdeoksikolat, katyonik olarak; CTAB (setiltrimetil amonyum bromür), non-iyonik olarak; Triton X-100 ve Tween-80 kullanılmıştır. Özellikleri farklı olan deterjanların aktivite üzerindeki etkisi incelendi.

### 3.2.7.9. Km ve Vmax değerlerinin bulunması

Enzim kataliziyle oluşan reaksiyon hızının, ulaşabileceği maksimum hızın yarıya geldiğinde eşit olduğu o andaki substratın konsantrasyonu Km olarak adlandırılır. Km (Michaelis-Menten) sabit bir değeri ifade etmez. Substratın yapısına, pH'a ve sıcaklığa bağlı olarak değişim gözlemlenir. Değeri ise mol/litre olup enzim konsantrasyonuna karşı ilgisi yoktur.

Km ve Vmax kinetik sabitlerini bulabilmek için süpürge tohumu hamekstratı kaynak olarak kullanıldı. Substrat olarak ise tribütirinden farklı hacimler (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400  $\mu\text{L}$ ) alınarak aktivite tayinin yapılması sağlandı. Süpürge tohumu lipazının hangi substratın konsantrasyonunda en yüksek aktivitede olduğu belirlendi.

Verilerin elde edilmesiyle zamana karşı substratın farklı konsantrasyonlarıyla grafiğin çizimi yapılarak hız değerleri elde edildi. Daha sonra elde edilen hız değerlerine karşı substratın farklı konsantrasyonu ile Michaelis-Menten grafiğinin çizimi yapılarak  $K_m$  ile  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi sağlandı.

### 3.2.7.10. Aktivasyon enerjisinin tayin edilmesi

Optimum sıcaklığın bulunması için yapılan çalışmalardan belirlenen aktivite değerleri elde edilmişti. Bu değerlerin logaritmalarının alınarak  $K$  ile gösterilen reaksiyon sıcaklığının tersi olan  $(1/T)$ 'ye karşı grafiğin çizimi yapıldı. Grafiklerin eğiminden yararlanılarak  $(-E_a/R)$  Arrhenius denklemi sayesinde aktivasyon enerjisinin (kJ/mol) olarak hesaplanması sağlandı (Şekil 3.3.).

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

Şekil 3.3. Arrhenius denklemi

k: Hız sabiti

A: Arrhenius sabiti

$E_a$ : Aktivasyon enerjisi

T: Mutlak sıcaklık

R: 8,314 j/K mol

### 3.2.7.11. İnhibitörün aktivite üzerindeki etkisi

Süpürge tohumundan sağlanan lipaza nasıl etki ettiklerini belirlemek için üre, sistein, 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorürmonohidrat ve tiyoasetamid ile yapılan deneyler sonucu aktivitede meydana gelen değişim gözlemlendi.

## BÖLÜM 4. DENEYLER VE BULGULAR

### 4.1. Yağsızlaştırma

Bu tezde yağsızlaştırma işlemi aseton, hekzan, kloroform ile metanol karışımı (1-1), n-bütanol ve son olarak etilasetat çözücülerini kullanılarak soxhlet ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan soxhlet sonucu süpürge tohumundan yağın uzaklaşmasını sağlayan en iyi çözücü metanol-kloroform tespit edilerek Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Süpürge tohumundan yağsızlaştırma ile elde edilen yağ miktarları

|                    | Aseton | Hekzan | Metanol-<br>Kloroform | n-bütanol | Etilasetat |
|--------------------|--------|--------|-----------------------|-----------|------------|
| Yağ miktarı<br>(g) | 1,196  | 1,035  | 2,666                 | 1,494     | 1,504      |

### 4.2. Enzimin Saflaştırılmasında Protein Tayini

#### 4.2.1. Bradford yöntemiyle toplam protein tayini

Bradford yöntemine göre protein tayininde ölçümler yapılarak ham ekstratın miktarı elde edildi. Ham ekstratın ve üçlü faz sisteminin 100 mikrolitresindeki protein miktarları tespit edilmiştir. Bu protein miktarları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Süpürge ekstratı ve üçlü faz sistemindeki protein içeriği

| Saflaştırma Basamağı | Protein İçeriği (mg/mL) |
|----------------------|-------------------------|
| Ham Ekstrat          | 1,242                   |
| Üçlü Faz Sistemi     | 0,845                   |

### 4.3. Lipazın Hidrolitik Aktivite Tayini

Süpürge tohumu kullanılarak elde edilen lipaz enziminin hidrolitik olarak aktivitesinin yapılmasında lipazın, hidroliz sonucuyla oluşan yağ asitlerinin 0,01 N NaOH ile titre edilerek aktivitenin bulunduğu yöntem kullanılmıştır.

Ham ekstrat ve üçlü faz sistemiyle süpürge tohumundan elde edilen lipazın aktiviteleri titrimetrik yöntem ile belirlenmiştir.

Tablo 4.3.'de görüldüğü gibi spesifik aktivite üçlü faz sisteminde en yüksek değeri göstermiştir. Enzimin aktivitesi ham ekstrata göre üçlü faz sisteminde yaklaşık olarak 2 kat artmıştır.

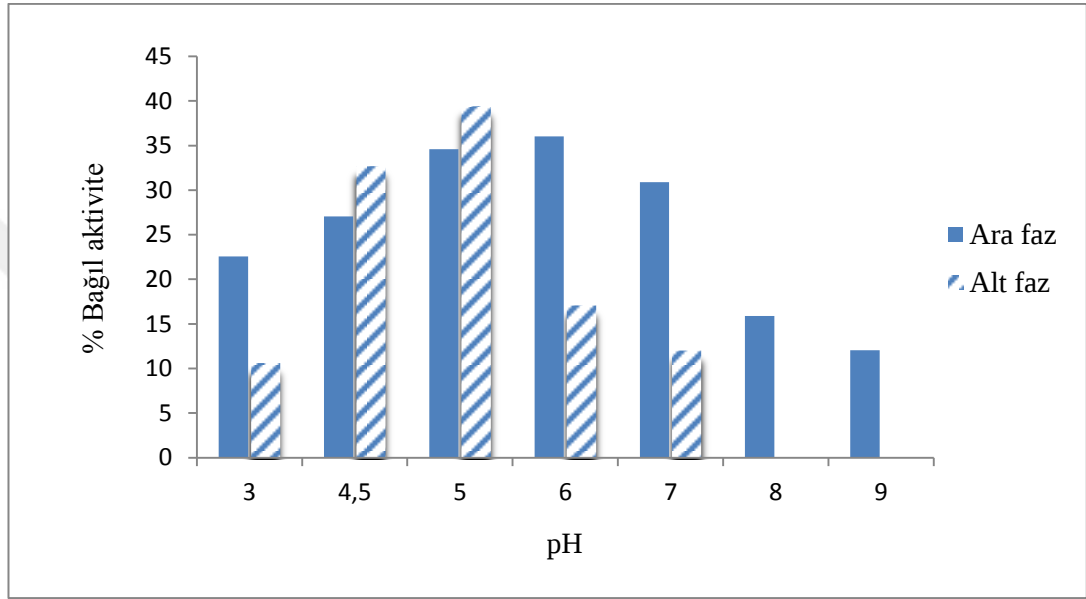
Tablo 4.3. Süpürge tohumu lipazının saflaştırılmasıyla elde edilen aktiviteler

| Saflaştırma Basamağı | Hacimsel Aktivite<br>(U/mL) | Hidrolitik Spesifik Aktivite<br>(U/mg. enzim) |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|
| Ham Ekstrat          | 24                          | 19,32                                         |
| Üçlü Faz Sistemi     | 30,45                       | 36,03                                         |

### 4.4. Üçlü Faz Saflaştırma Yönteminin Sonuçları

Süpürge tohumundan Üçlü Faz Saflaştırma (ÜFS) ile tek adımda saflaştırma yapılmıştır. (1-0, 1-1 ve 2-1) oranlarında enzim/ter-bütanol ile (%10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80 ve %90) farklı derişimlerde amonyum sülfat kullanılmıştır. Yapılan

titrasyon sonuçlarında genel anlamda ara faz en yüksek aktiviteyi vermiştir. Amonyum sülfatın derişimlerinde en yüksek %50 ile ara faz (1-1) oranında enzim/ter-bütanol verirken en düşük amonyum sülfatın derişimlerinden ise %40 ile alt faz (1-1) oranında enzim/ter-bütanol vermiştir. Alt faz ile ara fazın hangi pH da optimum olduğu ise aşağıda gösterilmektedir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Alt ve üst fazın optimum pH'sı

#### 4.5. Süpürge Tohumu Lipazının (STL) Hidrolitik Karakterizasyonu

##### 4.5.1. Substrat spesifikliğinin belirlenmesi

Çalışmalarımızda substrat olarak ayçiçek yağı, mısır yağı, zeytinyağı, fındık yağı, argan yağı, kayısı yağı ve tribütirin kullanılmıştır. Süpürge tohumu beş farklı çözücüyle soxhlet yapılarak yedi farklı substrat için aktivite ölçümleri elde edildi. Bu çalışmaların bitiminde en yüksek aktiviteyi sağlayan karışım ile yağsızlaştırılma yapılan zeytinyağı süpürge tohumu lipazı için substrat olarak en uygun olanı seçilerek Tablo 4.4.'de farklı substratlara ait aktivite değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4.4. Farklı substratlarla ve farklı çözücülerle elde edilen aktivite değerleri (U/dk.mg.e)

|               | Ayçiçek<br>yağı | Mısır<br>yağı | Zeytin<br>yağı | Fındık<br>yağı | Argan<br>yağı | Kayısı<br>yağı | Tribütirin |
|---------------|-----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|------------|
| Aseton        | 12,90           | 11,16         | 19,52          | 10,18          | 5,06          | 5,40           | 4,29       |
| Hekzan        | 10,02           | 10,30         | 17,50          | 10,60          | 6,45          | 12,50          | 13,90      |
| Karışım       | 13,25           | 15,54         | 30,45          | 8,54           | 10,45         | 15,03          | 6,15       |
| n-<br>bütanol | 18,60           | 3,27          | 24,00          | 6,49           | 17,80         | 15,7           | 8,00       |
| Etilasetat    | 17,16           | 22,40         | 16,6           | 14,40          | 11,25         | 9,00           | 10,16      |

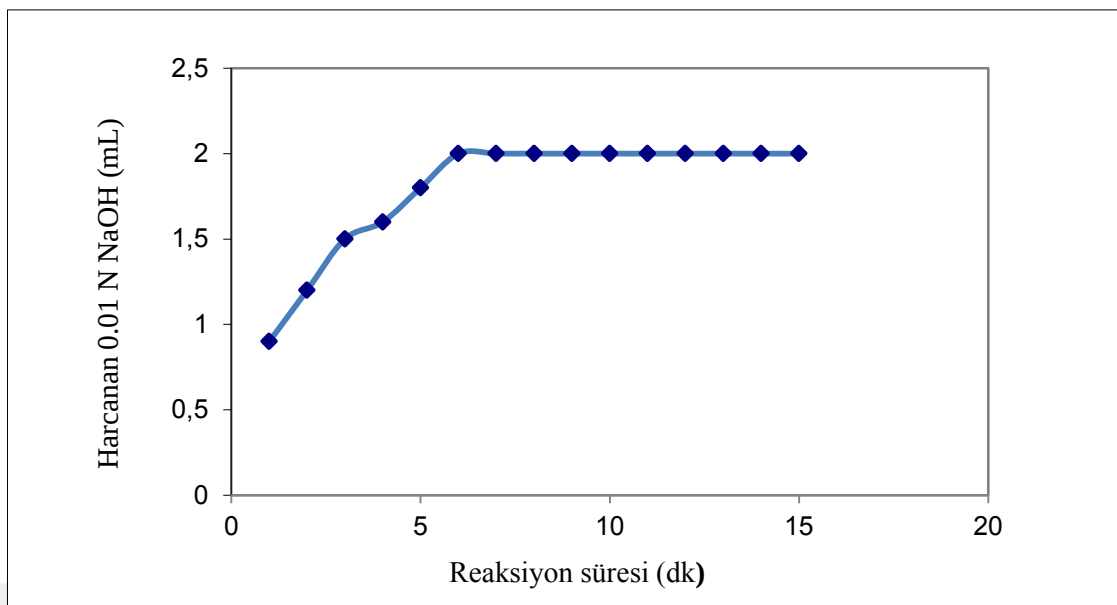
#### 4.5.2. Optimum reaksiyon süresi

STL'nin 1 ile 15 dakika arasında farklı süreler belirlenerek yapılan aktivite ölçümlerindeki en yüksek değer reaksiyon süresini göstermektedir. Bu değer ise 6 dakika olarak bulunup Tablo 4.5.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Optimum reaksiyon süresi ve sarfıyatı

| Süre<br>(dk)     | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| Sarfıyat<br>(mL) | 0.9 | 1.2 | 1.5 | 1.6 | 1.8 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |

Hesaplamalar sonucu süpürge tohumu lipazına reaksiyon süresinin aktivite üzerindeki etkisi grafik çizilerek gösterilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Reaksiyon süresinin aktivite üzerindeki etkisi

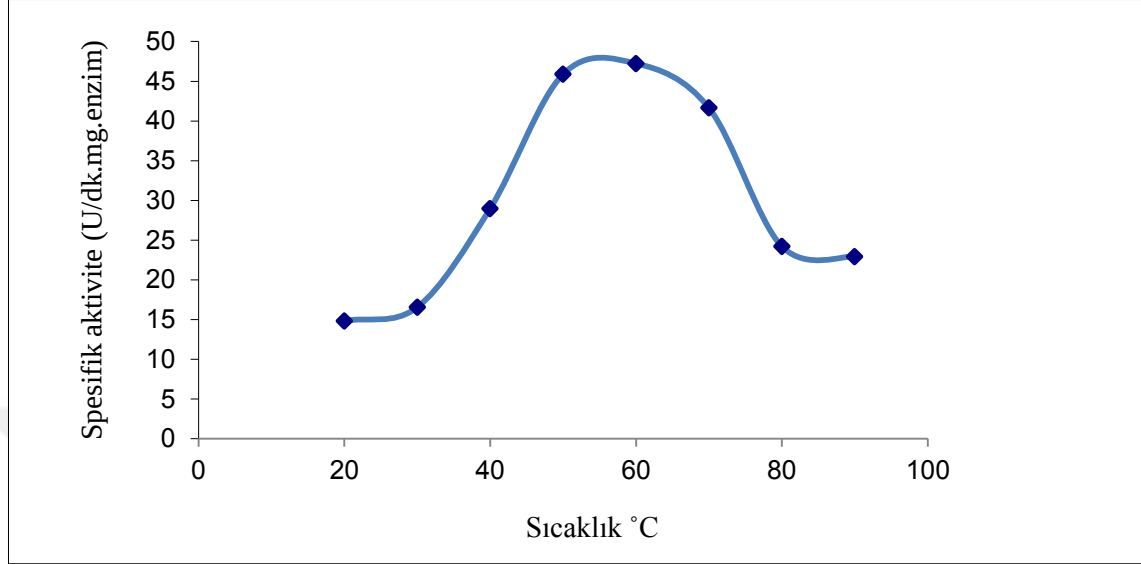
#### 4.5.3. Optimum sıcaklığın tayini

STL'nin aktivitesinin 20 ile 90 °C sıcaklık aralıklarında aktivite ölçümü pH = 7,7'de yapıldı. Hidrolitik olarak en iyi aktivite 60 °C'de bulunup Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Süpürge tohumu lipazından optimum sıcaklığın tayini

| Sıcaklık<br>(°C) | Hidrolitik spesifik aktivite<br>(U/dk.mg.enzim) |
|------------------|-------------------------------------------------|
| 20               | 14,83                                           |
| 30               | 16,56                                           |
| 40               | 28,98                                           |
| 50               | 45,89                                           |
| 60               | 47,23                                           |
| 70               | 41,64                                           |
| 80               | 24,21                                           |
| 90               | 22,93                                           |

Yapılan hesaplamalar sonucu süpürge tohumu lipazına sıcaklığın etkisi belirlenmiştir. Sıcaklık-Spesifik aktivite değerleriyle grafik çizilmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Sıcaklığın süpürge tohumuna lipazına etkisi

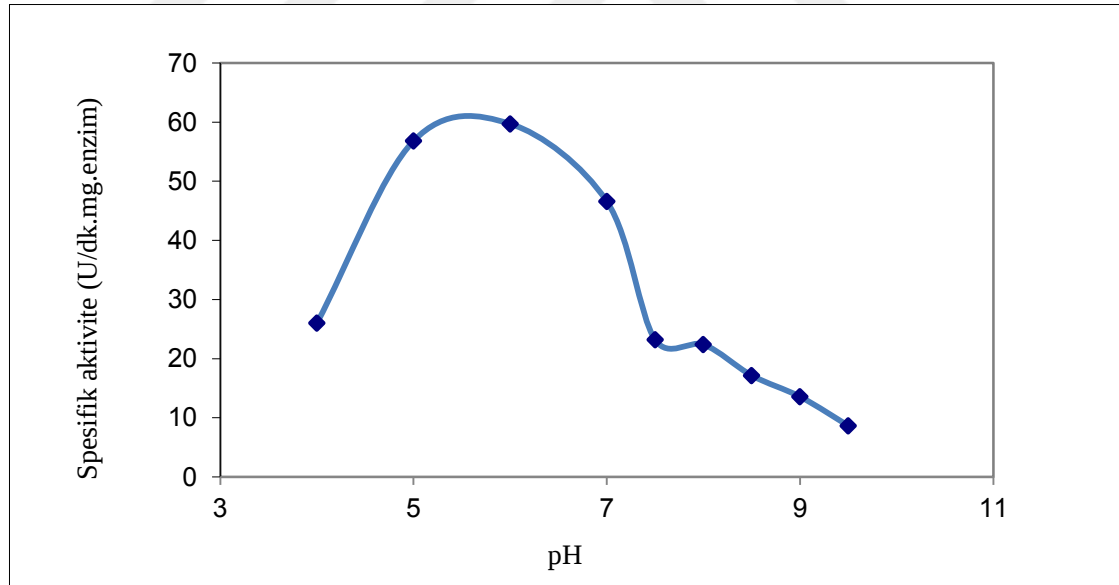
#### 4.5.4. Optimum pH tayini

Enzim aktivitesinin hangi pH'da maksimum olduğunu bulabilmek için 4, 5, 6, 7 ve son olarak 7,5 pH'larında 0,1 M'lık fosfat tamponları kullanıldı. 8, 8,5, 9, 9,5 pH'larda ise 5 mM'lık Tris-HCl tamponları hazırlanarak kullanıldı. Yapılan ölçümlerle birlikte süpürge tohumu lipazının aktivitesinin en yüksek olduğu pH 6 olarak bulunmuştur. Tablo 4.7.'de bu değerler gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Süpürge tohumu lipazının optimum pH'nın tayini

| pH  | Hidrolitik spesifik aktivite (U/dk.mg.enzim) |
|-----|----------------------------------------------|
| 4   | 26                                           |
| 5   | 56,8                                         |
| 6   | 59,7                                         |
| 7   | 46,6                                         |
| 7,5 | 23,2                                         |
| 8   | 22,4                                         |
| 8,5 | 17,16                                        |
| 9   | 13,57                                        |
| 9,5 | 8,65                                         |

Süpürge tohumu lipazının pH ve spesifik aktivite değerleri kullanılarak grafik çizilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. pH'nın süpürge tohumu lipazına olan etkisi

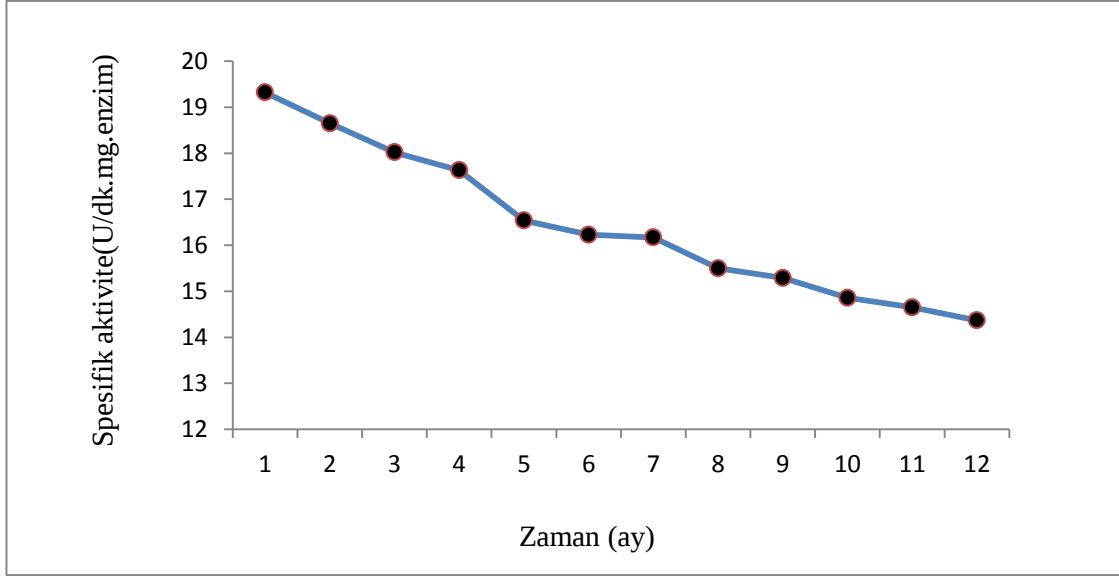
#### 4.5.5. Depo kararlılığının tayini

STL ham ekstratı bir yıl içinde 4 °C derindonduruda saklanmasıyla ayda bir kere sabit hacimde alınmasıyla ölçümler yapıldı. Bu sonuçlardan yola çıkarak STL'nin aktivisinde kaybı %25,6 olarak belirlenmiştir. Süpürge tohumu lipazının zamana karşı spesifik aktivitesi hesaplanarak Tabo 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. STL'nin depo kararlılığı

| Zaman<br>( Ay) | Ham ekstrat spesifik aktivite<br>(U/dk.mg.enzim) |
|----------------|--------------------------------------------------|
| 1              | 19,32                                            |
| 2              | 18,65                                            |
| 3              | 18,02                                            |
| 4              | 17,63                                            |
| 5              | 16,54                                            |
| 6              | 16,23                                            |
| 7              | 16,17                                            |
| 8              | 15,50                                            |
| 9              | 15,29                                            |
| 10             | 14,86                                            |
| 11             | 14,65                                            |
| 12             | 14,37                                            |

Süpürge tohumu lipazının bir yıl boyunca aktivitesinde meydana gelen değişim hesaplanmasıyla spesifik aktivite-zaman grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. STL'nin depo kararlılığı

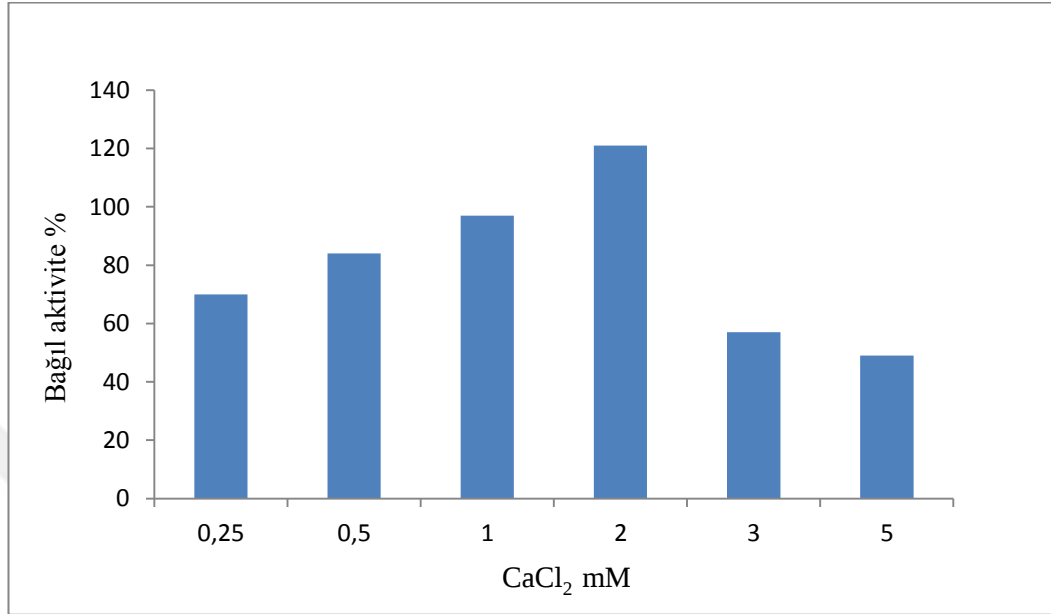
#### 4.5.5. $\text{Ca}^{2+}$ iyonunun aktiviteye etkisi

Titrasyon sırasında substrat emülsiyonuna 0,25-0,5-1-2-3-5 mM olarak 6 derişimde  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunun eklenmesiyle enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler ölçölmüştür. Ölçömler sonucu aktivite değerleri % aktivite olarak hesaplanarak Tablo 4.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9.  $\text{Ca}^{2+}$  iyonuun STL aktivite değerleri

| $\text{Ca}^{2+}$<br>(mM) | Bağıl aktivite<br>(%) |
|--------------------------|-----------------------|
| Kontrol                  | 100                   |
| 0,25                     | 70                    |
| 0,50                     | 84                    |
| 1                        | 97                    |
| 2                        | 121                   |
| 3                        | 57                    |
| 5                        | 49                    |

Yapılan hesaplamalar sonucu  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunun bağıl aktivite üzerindeki etkisi grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6.  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunun STL aktivitesine etkisi

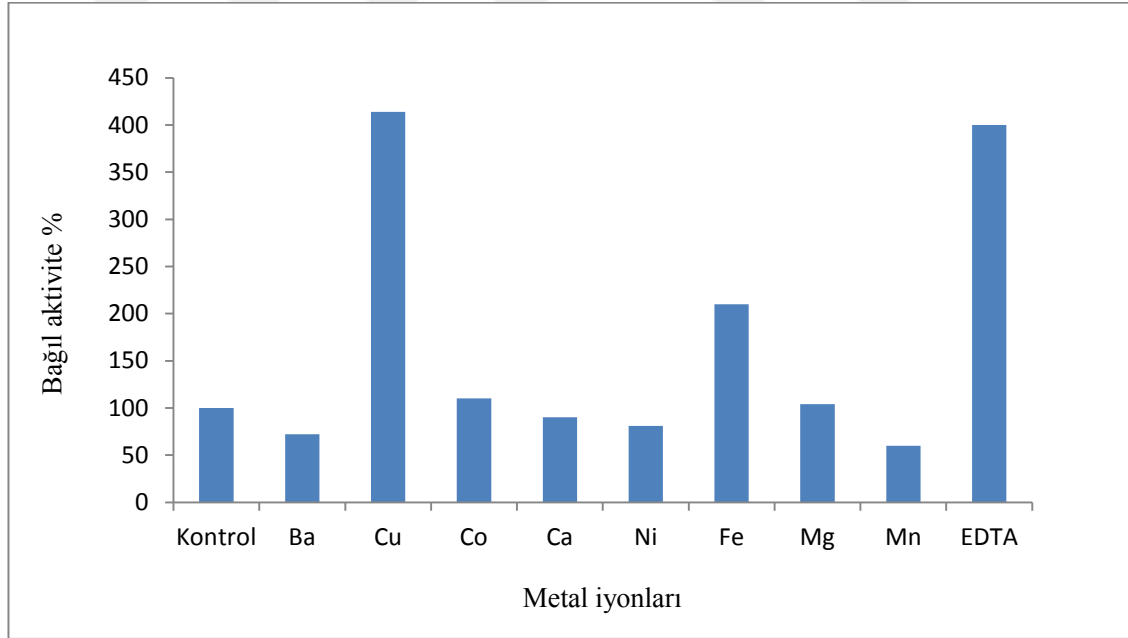
#### 4.5.6. Aktivitede metal iyon etkisi

Lipaz aktivitesinin metal iyonlarının varlığında etkisinin bilinmesi için metal içeren çözeltiler 10 mM 50 mL'lik şeklinde  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ve son olarak EDTA çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin hazırlanmasıyla aktivite tayini yapımı sırasında emülsiyona belli miktar eklenerek 9 farklı metal iyonun STL aktivitesi üzerinde meydana gelen değişimi tespit edildi. Metal iyonları eklemeyen ölçülen enzim aktivitesi ise % aktivite olarak kabul edilip bağıl aktivite hesaplaması yapıldı. Bu hesaplamalar Tablo 4.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. STL aktivitesine metal iyonlarının bağıl aktivite değerleri

| Metal iyonu      | Bağıl aktivite (%) |
|------------------|--------------------|
| Kontrol          | 100                |
| EDTA             | 400                |
| $\text{Cu}^{2+}$ | 414                |
| $\text{Mg}^{2+}$ | 104                |
| $\text{Fe}^{2+}$ | 210                |
| $\text{Mn}^{2+}$ | 60                 |
| $\text{Ba}^{2+}$ | 72                 |
| $\text{Ca}^{2+}$ | 90                 |
| $\text{Ni}^{2+}$ | 81                 |
| $\text{Co}^{2+}$ | 110                |

Süpürge tohumu lipaazının aktivitesine metal iyonlarının etkisi grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. STL aktivitesine metal iyonlarının etkisi

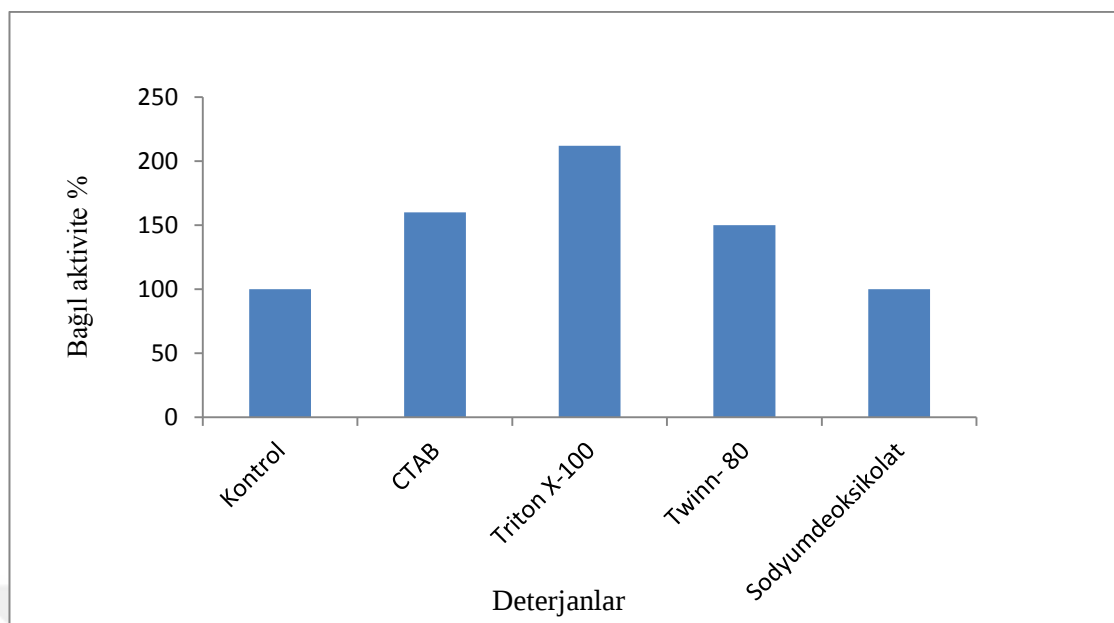
#### 4.5.8. Aktiviteye etki eden bazı deterjanlar

Aktivite üzerinde deterjanların etkisini bulabilmek için %1,6'lık birbirinden farklı deterjan çözeltileri kullanıma hazır hale getirilerek aktivite tayini esnasında belli miktarlarda bu çözeltilerden ilave edildi. Anyonik olarak; sodyumdeoksikolat, katyonik olarak; CTAB (setiltrimetil amonyum bromür), non-iyonik olarak; Triton X-100 ve Tween-80 kullanılmıştır. Özellikleri farklı olan deterjanların aktivite üzerindeki etkisi Tablo 4.11.'deki gibidir. Deterjan eklenmeden ölçülen aktivite değeri ise 100 olarak alındı.

Tablo 4.11. STL deterjan değerleri

| Deterjan          | Bağıl aktivite (%) |
|-------------------|--------------------|
| Kontrol           | 100                |
| Sodyumdeoksikolat | 100                |
| CTAB              | 160                |
| Triton X-100      | 212                |
| Tween-80          | 150                |

Süpürge tohumu lipazı üzerinde deterjanların bağıl aktiviteyi nasıl değiştirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. STL'na deterjan etkisi

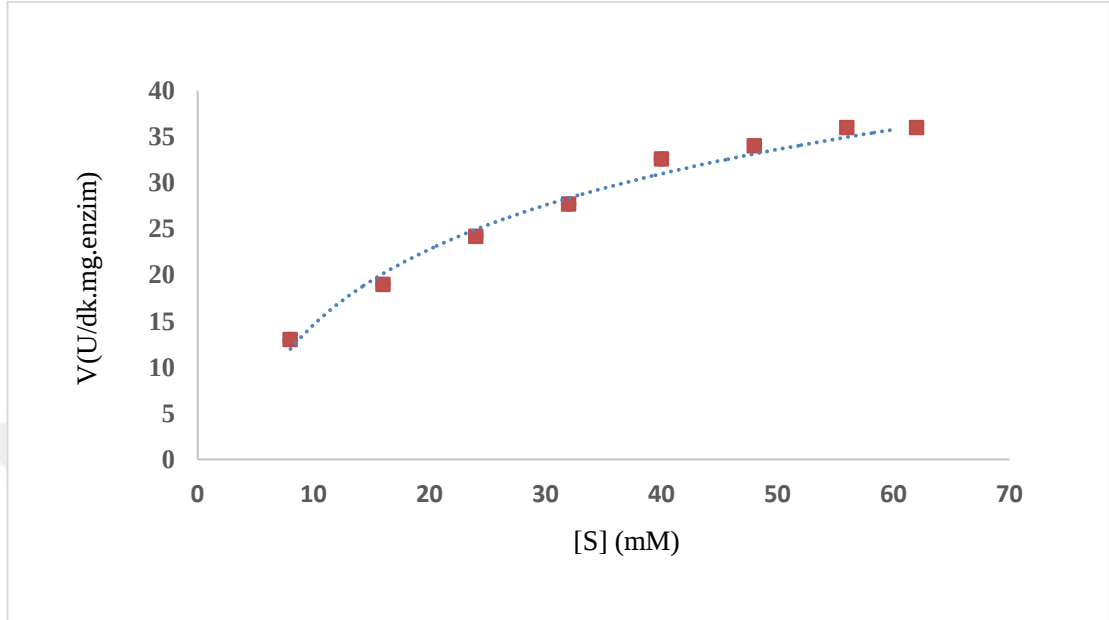
#### 4.5.9. Km ve Vmax değerlerinin bulunması

Km ve Vmax kinetik sabitlerini bulabilmek için substrat olarak kullanılan tribütirin 8-62 mM konsantrasyonlarında hazırlanarak aktivite tayinin yapılması sağlandı. STL'nin aktivitesi 56 mM konsantrasyonunda en çok artışı olup sonraki konsantrasyonlarda sabit şekilde devam etmiştir. Hesaplamalar Tablo 4.12.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.12. Farklı substrat konsantrasyonlarında STL enzimi aktiviteleri

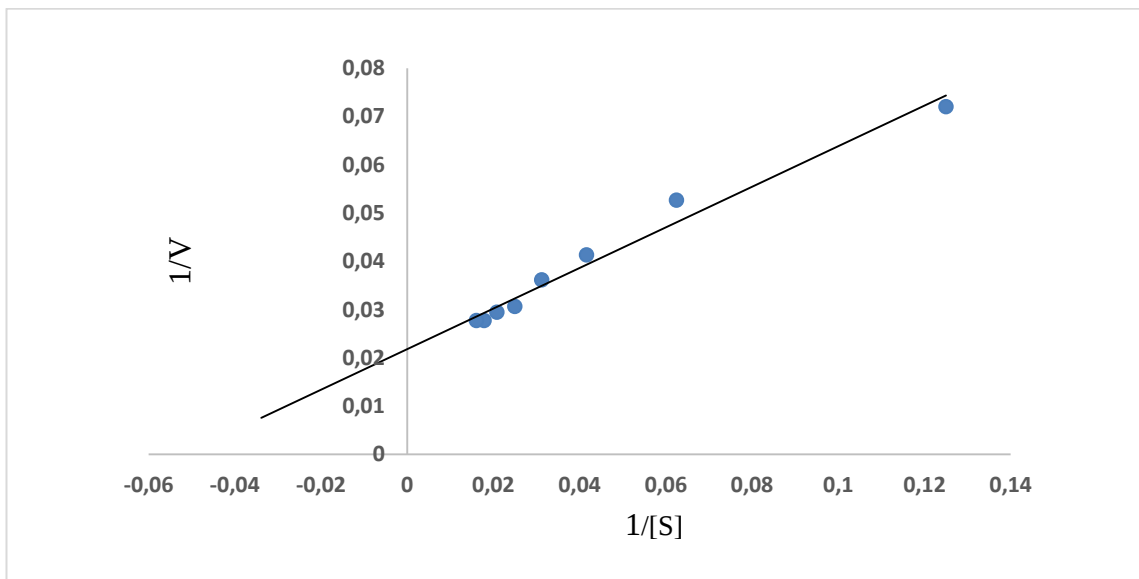
| [S]<br>(mM) | V<br>(U/dk.mg.enzim) | 1/[S] (x 10 <sup>-3</sup> )<br>1/(U/dk.mg.enzim) | 1/V (x 10 <sup>-3</sup> )<br>1/(U/dk.mg.enzim) |
|-------------|----------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 8           | 13                   | 0,125                                            | 0,072                                          |
| 16          | 19                   | 0,0625                                           | 0,0526                                         |
| 24          | 24,2                 | 0,0416                                           | 0,0413                                         |
| 32          | 27,7                 | 0,03125                                          | 0,0361                                         |
| 40          | 32,6                 | 0,025                                            | 0,0306                                         |
| 48          | 34                   | 0,0208                                           | 0,0294                                         |
| 56          | 36                   | 0,0179                                           | 0,0277                                         |
| 62          | 36                   | 0,0161                                           | 0,0277                                         |

Değişen substrat konsantrasyonlarıyla ile birlikte reaksiyon hızları arasında elde edilen grafik Michaelis-Menten grafiğidir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Michaelis-Menten grafiği

$K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini bulabilmek için ise  $1/[S]$  ve  $1/[V]$  değerlerinin hesaplanmasıyla Lineweaver-Burk grafiğinin çizimi yapıldı (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Lineweaver-Burk grafiği

Lineweaver-Burk grafiğinin çizimi sağlanarak  $K_m$  değeri 19,28 mM ve  $V_{max}$  değeri ise 45,87 U/dk.mg.enzim şeklinde bulundu.

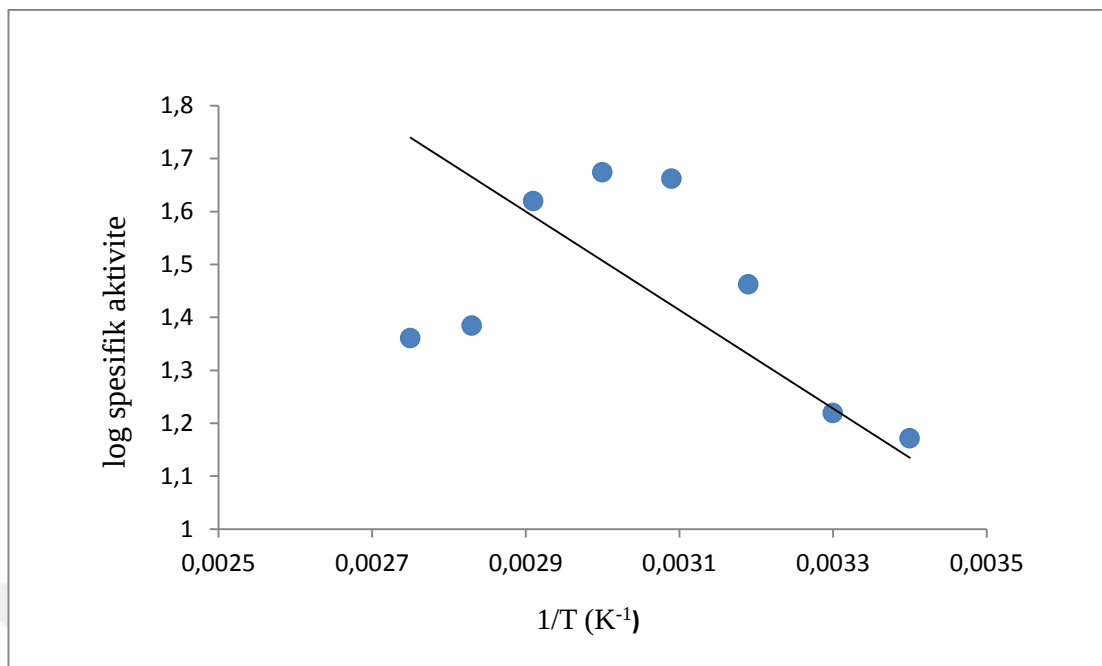
#### 4.5.10. Aktivasyon enerjisinin tayin edilmesi

Optimum sıcaklığın bulunması için yapılan çalışmalardan belirlenen aktivite değerlerinin logaritmalarının alınarak K ile gösterilen reaksiyon sıcaklığının tersi olan  $(1/T)$ ' ye karşı grafiğin çizimi yapıldı. Grafiğe ait hesaplamalar Tablo 4.13.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.13. STL'nin aktivasyon enerjisi değerleri

| Sıcaklık (°C) | Spesifik aktivite<br>(U/dk.mg.enzim) | Log spesifik<br>aktivite | Sıcaklık (K) | $1/T$ ( $K^{-1}$ ) |
|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------|--------------------|
| 20            | 14,83                                | 1,1711                   | 293          | 0,0034             |
| 30            | 16,56                                | 1,2190                   | 303          | 0,0033             |
| 40            | 28,98                                | 1,4620                   | 313          | 0,00319            |
| 50            | 45,89                                | 1,6617                   | 323          | 0,00309            |
| 60            | 47,23                                | 1,6742                   | 333          | 0,00300            |
| 70            | 41,64                                | 1,6195                   | 343          | 0,00291            |
| 80            | 24,21                                | 1,3840                   | 353          | 0,00283            |
| 90            | 22,93                                | 1,3604                   | 363          | 0,00275            |

Grafiklerin eğiminden yararlanılarak  $(-E_a/R)$  Arrhenius denklemi sayesinde aktivasyon enerjisinin 11,34 kJ/mol olarak hesaplanması sağlandı (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. STL'nin aktivasyon enerjisi

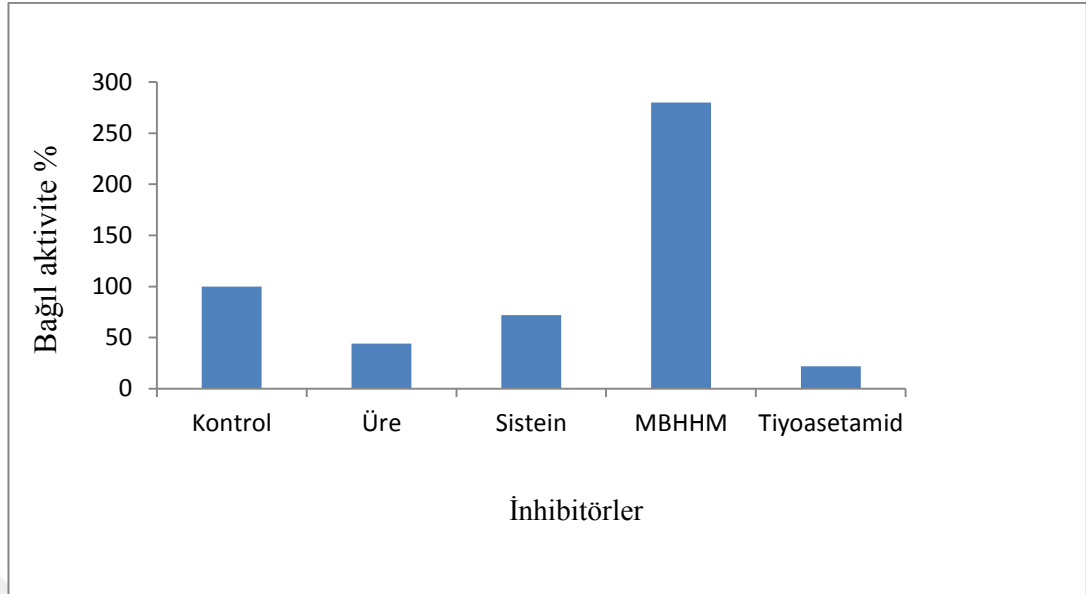
#### 4.5.11. İnhibitörün aktivite üzerindeki etkisi

Süpürge tohumundan sağlanan lipaza nasıl etki ettiklerini belirlemek için üre, sistein, 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorürmonohidrat ve tiyoasetamid ile yapılan deneyler sonucu aktivitede meydana gelen değişimler Tablo 4.14.'de ki gibidir.

Tablo 4.14. STL'na inhibitörün etkisinin değerleri

| İnhibitör madde                                          | Bağıl aktivite (%) |
|----------------------------------------------------------|--------------------|
| Kontrol                                                  | 100                |
| Tiyoüre                                                  | 44                 |
| Sistein                                                  | 72                 |
| 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorürmonohidrat | 280                |
| Tiyoasetamid                                             | 22                 |

STL'ye inhibitörlerin etkisinin hesaplanmasıyla MBHHM aktiviteyi yükselttiği görülmüştür (Şekil 4.12.).

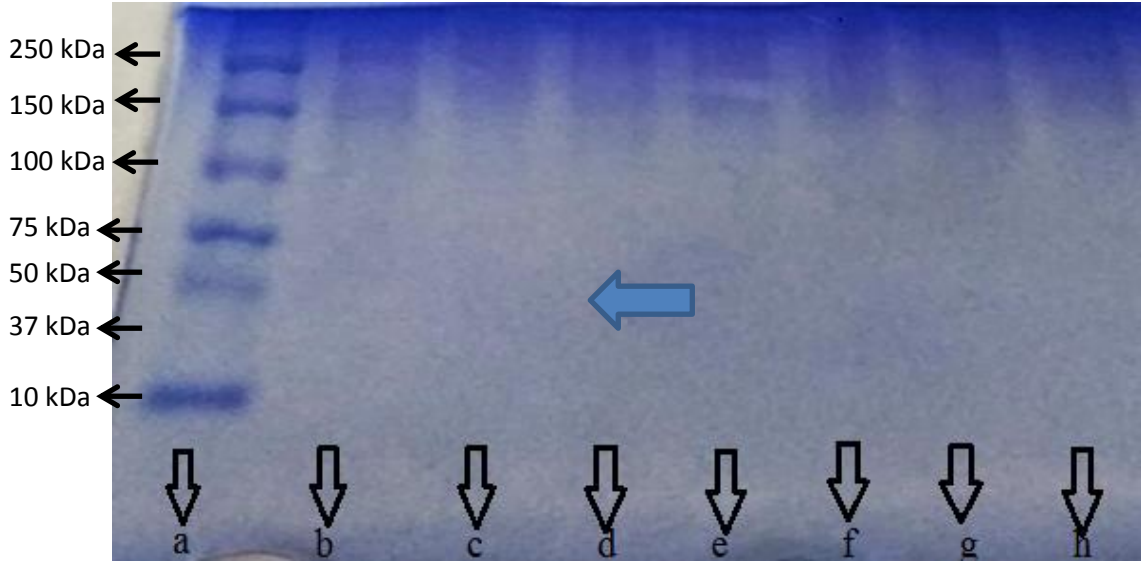


Şekil 4.12. STL'ye İnhibitörün etkisi

#### 4.6. SDS-PAGE ile STL Enziminin Karakterizasyonu

Yaptığımız bu çalışmada %5'lik bir yükleme jeli ile %12'lik bir ayırma jeli kullanarak SDS-PAGE gerçekleştirmiş olduk. Yükleme jelinin bitimine kadar 20 mA'de, ayırma jelinin bitimine kadar ise 25 mA'de proteinlerin yürütülme işlemi gerçekleşmiştir. %0,1 Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyama işlemi yapılmıştır. Daha sonra ise %10 metanol ile %7'lik asetik asitten oluşan yıkama çözeltisi ile yıkanarak bantların görünmesi sağlandı.

Süpürge tohumu lipaz enzimi proteini tek bir band halinde jelde görüntülenmiştir. Marker ile kıyaslandığında ise enzimin molekül ağırlığının 15-20 kDa aralığında olduğu bulunmuştur (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. SDS-PAGE ile elde edilen STL'nin karakterizasyonu

Burada a, b, c, d, e, f, g ve h harfleri sırasıyla şu ekstratlara karşılık gelmektedir: Marker proteinleri, ham ekstrat, TPP 2 ham/1 ter-bütanol, TPP 2 ham/2 ter-bütanol, TPP 2 ham/3 ter-bütanol, TPP 2 ham/4 ter-bütanol, ham ekstrat. Süpürge tohumundan elde edilen ekstratlarla yapılan SDS-PAGE çalışmalarında tek bant d harfi ile gösterilen TPP 2 ham/1 ter-bütanol'de elde edildi.

## BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışma ile süpürge (*Sorghum vulgare*) tohumundan lipaz enziminin saflaştırılarak biyokimyasal özelliklerinin bulunması amacıyla yapılmıştır. Bu araştırmaların hepsi üç aşamada gerçekleşmiştir.

Birinci aşama: Ham ekstratın süpürge tohumundan yapılması aşamasıdır. Kuru olan süpürge tohumlarının öğütülerek proteinlerin yağlarından arınması işlemi için uygun hale getirilir. Bu yağlarından arınma işlemi soxhlet cihazıyla olup çözücü olarak ise aseton, hekzan, metanol-kloroform, n-bütanol ve etilasetat kullanılmıştır. Bu şekilde süpürge tohumu proteinlerinden yağlar arındırılmıştır.

İkinci aşama: Bu kısımda lipazın süpürge tohumundan saflaştırılmasını içerir. Saflaştırma işlemi ise Üçlü Faz Sistemi (TPP) ile yapılmıştır. Saflığı kontrol edilen enzimin SDS-PAGE ile STL'nin molekül ağırlığı tayin edilmiştir.

Üçüncü aşama: Saf bir şekilde elde edilen STL'nin maksimum katalitik olarak performansının bulunabilmesi için optimum reaksiyonun belirlenmesiyle kinetik sabitler elde edilmiştir. Çeşitli metaller, deterjanlar ve inhibitörler ile aktivitedeki değişim bulunmuştur. Lipaz endüstride önemli olup kullanım alanı çok geniştir. Bunun neticesinde substrat spesifitesi, optimum pH ve sıcaklığı, reaksiyonun süresi vb. özelliklerinin bilinmesi kullanım açısından endüstride önemlidir.

STL'nin substratına olan ilgisinin belirlenmesi için hem Michaelis-Menten hemde Lineweaver-Burk grafiklerinin çizilmesiyle  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplanması sağlanmıştır. Bunlara ek olarak aktivasyon enerjisi de hesaplanmıştır.

### 1. Aşama

Süpürge tohumunda bulunan proteinlerden yağın arındırılmasını sağlayan en iyi çözücü olarak metanol-kloroform karışımı kullanılmıştır. Yapılan bu çalışma Hird ve grubunun yer fıstığı ile fındıkta uyguladıkları metot ile Park ve grubunun proteazların ayçiçekten uzaklaşmasını sağlayan yağsızlaştırma metotlarının örnek alınmasıyla birlikte bu yöntemler süpürge tohumuna uygulanmıştır [54].

### 2. Aşama

Süpürge tohumu lipazında en yüksek aktivite Üçlü Faz Sistemi uygulanmasıyla elde edilmiştir. Bu yöntemle birlikte aktivite 2 kat artmıştır. Lipazın saflaştırılmasında Üçlü Faz Sistemiyle saflaştırılma ilk kez denenmiştir.

### 3. Aşama

Substrat spesifikliğinin belirlenmesinde zeytinyağı, argan yağı, fındık yağı, mısır yağı, ayçiçek yağı, kayısı yağı ve tribütirin kullanılmıştır. En yüksek aktivite metanol-kloroform karışımıyla zeytinyağında, en düşük ise n-bütanol çözücüsüyle mısır yağında belirlenmesiyle birlikte zeytinyağı süpürge tohumu lipazının substratı olarak belirlendi.

Önceki yapılan çalışmalarda ise Prabhu ve grubunun pirinç kepeği kullanarak lipazın eldesinde substrat olarak tribütirinin [55] bulurken, yine pirinç kepeğinin kullanılmasıyla yapılan başka bir çalışmadaki en uygun substrat ise triolein olarak bulunmuştur [56]. Palocci ile grubu; E.Characias adlı bitkinin substrat spesifitesinde keten tohumu, tribütirin, ayçiçek yağı, triasetin ve trikaprilin kullanılması sonucu elde edilen verilerle trikaprilin en uygun substrat seçilmiştir [57]. Jinwal ile grubu, PK-12CS için substrat olarak soya yağı, kokonat yağı, zeytinyağı, triolein, tribütirin, trioalmitin, badem yağı, hardal yağı ve trilinolein kullanılmasıyla en yüksek olarak ativityyi badem yağından tayin etmişlerdir [58].

Süpürge tohumu lipazının optimum reaksiyonun süresi olarak 6 dakika belirlenmiştir.

Literatürde ise farklı kaynaklar kullanılarak yapılan optimum reaksiyonların süreleri 10-30 dakika aralığı şeklinde belirlenmiştir.

Süpürge tohumu eldesiyle lipazın optimum pH değeri 6 olarak bulunmuştur. pH üzerine yapılan çalışmalar; kolza tohumu kullanılarak elde edilen lipazın optimum pH = 9 [59], buğday tohumundan optimum pH = 8,0 [60], pamuk tohumundan pH = 10,8 [5], ceviz tohumundan optimum pH = 9,0 [2], Bhardwaj ile grubunun pirinç kepeğinden optimum pH = 11,0 olarak belirtilmiştir [56]. Mikrobiyal kaynaklarda ise; *Bacillus Stearothermophilus* MC 7 ile optimum pH = 7,5-9 aralığında [61], *Penicillium Aurantiogriseum* ile de optimum pH= 8 olarak bulunmuştur [48].

Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında süpürge tohumundan elde edilen lipaz enziminin optimum pH'nın diğer kaynaklara göre daha asidik olarak bulunmuştur.

Süpürge tohumu ile elde edilen lipazın optimum sıcaklık değeri ise 60 °C olarak bulundu. 60 °C'ye kadar hidrolitik aktivite artış gösterirken bu sıcaklık değerinden sonra düşüş göstermiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu lipazın bitkiden elde edilmesindeki optimum sıcaklık 30-80 °C arasındadır. Pamuk tohumunun belirtilen optimum sıcaklık değeri 50 °C [5], ceviz tohumunun belirtilen optimum sıcaklık değeri ise 70 °C'dir [2]. Mikrobiyal kaynaklarında ise; *Bacillus Stearothermophilus* MC 7'nin belirtilen optimum sıcaklığı 75-80 °C, *Penicillium Aurantiogriseum* da belirtilen optimum sıcaklık ise 70 °C'dir [61].

Süpürge tohumunun aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi ölçüldü. Her ay yapılan bu ölçümlerden yola çıkarak süpürge tohumu aktivitesinde meydana gelen kayıp %25,6 olarak bulunmuştur. Bir yıl gibi uzun bir sürede ekstra bir koruyucu içermeyen saklanabilmektedir. Bu özelliğide zaman ile maliyet açısından önemlidir. *Aspergillus terreus* lipazı ile yapılan çalışmada derindondurucuda genel olarak aktivitesini koruduğu, oda koşullarında ise 6 ay saklanabilceği yapılan çalışmalar sonucu belirtilmiştir [47].

$\text{Ca}^{2+}$  iyonun süpürge tohumundaki lipaza etkisinin incelenmesinde yapılan tüm konsantrasyonlarda aktivitede artış görüldü. En yüksek ise 2 mM'da %121 olarak elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda badem tohumundaki lipazına  $\text{Ca}^{2+}$  iyonun etkisinin 1 mM'da %37 [1], ceviz tohumundaki lipazına  $\text{Ca}^{2+}$  iyonun etkisinin ise 0,5 mM'da %287 [2] *Aspergillus terreus* lipazına  $\text{Ca}^{2+}$  iyonun etkisinin 20 mM'da %50 [62], *Bacillus Stearothermophilus* MC 7'nin lipazına  $\text{Ca}^{2+}$  iyonun etkisinin ise de 5 mM'da olup %10'dur [61].

Saflaştırılan süpürge tohumu lipazının elde edilmesiyle kinetik özellikleri belirlendi. Çizilen Michaelis-Menten ile Lineweaver-Burk grafikleriyle tribütirin için  $K_m$  değeri 19,28 mM ve  $V_{max}$  ise 45,87 U/dk.mg.enzim olarak bulunmuştur.

Yapılan diğer çalışmalarda ise; cevizden triolein kullanılarak elde edilen  $K_m$ : 48 mM  $V_{max}$ : 23,06 ( $\times 10^{-3}$ ) U/dk.mg.enzim [2], bademde ise tribütirin kullanılmasıyla  $K_m$ : 25 mM  $V_{max}$ : 113,63 U/dk.mg.enzim [1], P. Cepacia'dan p-nitrofenil palmitat kullanılarak  $K_m$ : 12 mM ve  $V_{max}$ : 188  $\mu\text{mol/dk}$  [63] olarak bulunmuştur.

Sonuçlar göz önüne alındığında farklı kaynaklar kullanılarak lipaz enziminin elde edilmesinde substrat önemli rol oynamaktadır. Genel olarak  $10^{-1} - 10^{-7}$  aralığında  $K_m$  değerleri bulunmaktadır. Süpürge tohumu lipazının ise  $K_m$ : 19,28 mM olup bu değer aralığındadır.

Süpürge tohumu lipazında yapılan çalışma sonucunda grafiklerin eğiminden yararlanılarak Arrhenius denklemi sayesinde aktivasyon enerjisinin 11,34 kJ/mol olarak hesaplanması sağlandı. Aktivasyon enerjisi değerinin yükseklerde olması hız sabitinin sıcaklık üzerindeki bağıllığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda ceviz ve badem tohumundan elde edilen lipazın aktivasyon enerjileri sırasıyla 3,26 kJ/mol [2] ve - 5473,6 cal/mol [1] olarak hesaplanmıştır.

Süpürge tohumundan lipaz aktivitesinin metal iyonlarının varlığında etkisinin bilinmesi için metal içeren çözeltiler 10 mM 50 mL'lik şeklinde  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ve son olarak EDTA çözeltileri hazırlandı. Yapılan çalışmalar necitesinde EDTA ve  $\text{Cu}^{2+}$  aktiviteyi yaklaşık 4 kat ve  $\text{Fe}^{2+}$  ise yaklaşık 2 kat arttırmıştır.  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Co}^{2+}$  ise aktiviteyi %6-10 aralığında artışını sağlamıştır. Diğer metaller ise %10 ile %40 aralığında inhibe etmiştir.

Metal iyonlarının lipaz enzimi üzerindeki etkileriyle yapılan çalışmalar: *Cephaloleia presignis* lipazı aktivitesindeki değişimler  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları tarafından inhibe edildiği,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  ve EDTA'nın ise etkilemediği tespit edilmiştir [64]. Badem tohumuna metal iyonlarının aktivite de etkisi ise;  $\text{Mg}^{2+}$  iyonu %30 azaltırken  $\text{Cu}^{2+}$  ile  $\text{Ni}^{2+}$  inhibe etmiştir.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$  aktiviteyi yaklaşık olarak 3 kat artırırken  $\text{Ba}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  2 kat artmasını sağlamıştır [1].

Aktivite üzerinde deterjanların etkisini bulabilmek için anyonik olarak sodyumdeoksikolat, katyonik olarak CTAB (setiltrimetil amonyum bromür), non-iyonik olarak Triton X-100 ve Tween-80 kullanılmıştır. Anyonik deterjan olarak kullanılan sodyumdeoksikolat aktivitede değişim sağlamamıştır. Katyonik deterjan olan CTAB ise %60 aktivitenin atmasını sağlamıştır. Non-iyonik olarak kullanılan Triton X-100 2 katı artırırken Tween-80 ise %50 arttırmaktadır. Kullanılan deterjan örneklerinin hiçbirinde aktivite inhibe edilmemiştir.

Yapılan çalışmalardaki deterjanın enzim üzerindeki etkileri ise: *Aspergillus terreus* kullanılan iyonik deterjanlardan (sodyum tauroklat, saponin, sodyumdeoksikolat ve SDS) hepsinde inhibisyona uğrarken non-iyonik olan deterjanlarda (Tween-40, Triton X-100, Tween 20 ve son olarak Tween-80) ise aktivitenin arttığı belirlenmiştir [47]. Badem tohumunda ise; anyonik deterjan olan SDS'nin inhibe ederken anyonik olan sodyumdeoksikolat ise %36 aktivitede artış göstermektedir. Katyonik deterjanlarda ise CTAB inhibe edip diğer bir katyonik deterjan olan DTAB ise aktivitede değişim göstermemiştir. Non-iyoniklerde ise Triton X-100 %9 oranın artış olup Triton X-405 de değişim gözlenmemiştir [1].

Süpürge tohumundan sağlanan lipaza inhibitörlerin nasıl etki ettiklerini belirlemek için üre, sistein, 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorürmonohidrat ve tiyoasetamid kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda üre, sistein ve tiyoasetamid enzimi inhibe ederken 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorürmonohidratın ise 3 kata yakın arttırdığı bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda inhibitörlerin etkileri ise; badem tohumu lipazların sistein, tiyoasetamid, üre, potasyum ferrisiyanür enzimin inhibe olmasına neden olurken 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorürmonohidrat, N-bromsüksinimid ve ditiyoeritrol enzim aktivitesini değiştirmedeği bulunmuştur [1]. Ceviz tohumunda ise potasyum ferrisiyanür, N-bromsüksinimid, üre ve potasyumsiyaniür inhibitörleri tarafından inhibe edilirken tiyoasetamidin değiştirmedeği ve son olarak sistein ise aktiviteyi arttırdığı belirtilmiştir [2]. Mikrobiyal lipazların inhibitörlerle olan etkisi ise; *Bacillus stearothermophilus* MC 7 ile lipaz aktivitesi PSMF inhibitörüyle tamamen inhibe olup ditiyoeritrol, N-bromsüksinimid ve PCMB ile de kısmen inhibe edilmiştir. İyodoasetamid ise aktiviteyi değiştirmemiştir [61].

Süpürge tohumu lipazının SDS-PAGE ile saflaştırılmasında tek çizgi bir bant elde edilmiştir. Marker ile karşılaştırma yaptığımızda bu değerin 15-20 kDa arasında olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda ise pamuk tohumu enziminin molekül ağırlığı ise 21 kDa olarak bulunmuştur [5].

Tez çalışmasında kullanım alanı oldukça geniş olan lipaz enziminin süpürge tohumu ile ilk kez saflaştırılması yapılmıştır. İzolasyonu sağlandıktan sonra süpürge tohumuna ait biyokimyasal özellikleri bulunmuştur. Önceki çalışmaların incelenmesiyle süpürge tohumun kaynak olarak kullanılması elde edilen veriler sonucunda doğrulanmaktadır. Yapılan çalışmayla birlikte süpürge tohumu lipazına ait hem saflaştırma hemde karakterizasyon prosedürün oluşması sağlanmıştır. Süpürge tohumunun biyokimyasal olarak özelliklerine bakıldığında endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliği uygundur.

## KAYNAKLAR

- [1] Bařkurt, L., Badem (*Amygdalus communis* L.) Proteinlerinden Lipaz İzolasyonu ve Özelliklerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2005.
- [2] Demirkan, B., Ceviz (*Juglans regia* L.) Tohumu Lipazının Saflaştırılması ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2008.
- [3] Mohamed, M. A., Mohamed, T. M., Mohamed, S. A., Fahmy, A. S., Distribution of lipases in the gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*, *Bioresource Technology.*, 73, 227-234, 2000.
- [4] Bayřu, N., Bayřu Sözbilir, N., Biyokimya, Öncü Basım Evi., 302-305, 2008.
- [5] Akbulut, N., Pamuk Tohumundan (*Gossypium Hirsutum* L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2014.
- [6] Hammamchi, H., *Rhodotorula mucilaginosa*'dan Lipaz Enziminin Üretimi ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2014.
- [7] Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter. W. H. Freeman, Fourth Edition, 2004.
- [8] Bha, M. K., Cellulase and related enzymes in biotechnology, *Biotechnology Advances.*, 18 (5): 355-458, 2000.
- [9] Ası, T., Tablolarla biyokimya, cilt 2, Ankara., 41-43, 1999.
- [10] Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Ersoz, A., Dikmen, N., Menten, G., Özgünen, T., Harper'ın Biokimyası. Barış Kitapevi., 978-975-953-311-3, 1993.
- [11] Aksoy, C., Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2003.
- [12] Yıldız, S., Enzimler, Fakülte Kitap Evi., Baskı 1 28-30, 2007.

- [13] Milli Eğitim Bakanlığı, Gıda Teknolojisi, Ankara., 9-10, 2011.
- [14] Bülbül, M., Biyokimya, Hilal Ofset., 1. Baskı- 29, 2014.
- [15] Tüzün, C., Biyokimya, Palme Yayınları, Ankara, 1997.
- [16] Nelson, D. L., Cox, M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York, USA., 1152 s, 2005.
- [17] Güller, U., Mitokondrial Glutamat Dehidrogenaz Enziminin Koyun Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi., 2014.
- [18] Telefoncu, A., Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskısı., 249-306, 1997.
- [19] Wiseman, A., “Handbook of Enzyme Biotechnology”, and Edition, Jon Wiley Sons, Chicester, England, 1986.
- [20] Akyıl, M. H., Lipazın Trichoderma citrinoviride’den Üretimi Ve Enzimin Bazı Kinetik Özelliklerinin Saptanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2014.
- [21] Çakar, N. E., Aspergillus niger HBF39’dan Lipaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2016.
- [22] Basım, P., Fruktöz-Stearatın T-Butanol: DMSO Çözücü Karışımı ve İyonik Sıvılarda Lipaz Katalizli Sentezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2009.
- [23] Öztürk B., Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. Gıda Mühendisliği Dergisi., 12: 20-23, 2002.
- [24] Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., Production, purification, characterization, and applications of lipases, Biotechnology Advances., 19: 627-662, 2001.
- [25] Tekiner, R., Bacillus megaterium M22’den Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2011.
- [26] Cherif, S., Fendri, A., Miled, N., Trabelsi, H., Mejdoub, H., Gargouri, Y., Crab digestive lipase acting at high temperature: Purification and biochemical characterization. Biochimie., 89, 1012-1018, 2007

- [27] Gao, Y.Y., Chen, W.W., Lei, H., Liu, Y., Lin, X., Ruan, R., Optimization of transesterification conditions for the production of fatty acid methyl ester (FAME) from Chinese tallow kernel oil with surfactant-coated lipase. *Biomass and Bioenergy*, 2008.
- [28] Wiseman, A., Introduction to principles. In: Wiseman A, editor. *Handbook of enzyme biotechnology* (3rd ed.), Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd, Padstow, Cornwall, UK., 3-8, 1995.
- [29] Jaeger, K., Eggert, T., Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*., 13: 390–397, 2002.
- [30] Seren, S., *Acinetobacter psychrotolerans* Suslarından İzole Edilen Lipazın Karakterizasyonları, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2013.
- [31] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol C., R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, U., T., *The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29: 119-131, 1999.
- [32] Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Gupta, L. K., Gupta, J. K., Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1, *Process Biochemistry*., 37: 1075–1084, 2002.
- [33] Hasan F., Shah A., A., Abul-Hameed A., Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Micro Technology*., 39: 235-251, 2006.
- [34] Schmid, R., D., Verger, R., Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 1608-1633, 1998.
- [35] Gandhi, N.N., Review: Applications of Lipase. *Journal of American Chemist's Society*., 74; 621-634, 1997.
- [36] Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U. T., Biotransformations with lipases, In: Rehm, H. J., Pihler, G., Stadler, A., Kelly, P. J. W., *Biotechnology*, New York: VCH., 8: 37–192, 1998.
- [37] Kuo, T. , *Lipid Biotechnology*, New York., 357, 2002.
- [38] Colman, M. H., Macrae, A. R., Fat process and composition, UK Patent No., 1577933, 1980.
- [39] Jaeger, K. E., Reetz, M. T., Microbial lipases from versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*., 16: 396-403, 1998.
- [40] Taneja, S. C., Sethi, V. K., Andotra, S. S., Koul, S., Qazi, G. N., Rose oxides: A facile chemo and chemo-enzymatic approach, *Synth. Commun.*, 35: 2297-2303, 2005.

- [41] Chaplin, J. A., Gardiner, N., Mitra, R. K., Parkinson, C. J., Portwig, M., Mboniswa, B. A., Evans-Dickson, M. D., Brady, D., Marais, S. F., Reddy, S., Process for preparing (-) menthol and similar compounds., United States Patent 7026144, 2006.
- [42] Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., Wang, X., Synthesis of biodisel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor, *Energy Convers. Manage.*, 50: 668-673, 2009.
- [43] Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. ve Shrestha, S., Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *J. Mol. Catal. B. Enzymatic.*, 16, 53-58, 2001.
- [44] Vulfson, E. N., “Industrial Applications of Lipases, In: Wooley, P., Peterson, S. B., editors, “Lipases-their Structure Biochemistry and Applications”, Cambridge University Pres., 271-288, 1994.
- [45] Tutar, H., Candida Rugosa Lipaz Enziminin Sporopollenin Üzenine Adsorbsiyonu Ve Karakterizasyonu, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi., 2009.
- [46] Şengel, B. Ş., Deterjan Katkı Maddesi Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Lipaz Üretim Koşullarının Araştırılması Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, , Yüksek Lisans Tezi., 2007.
- [47] Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., Sheba Davidson, W., Purification strategies for microbial lipases, *Journal of Microbiological Methods.*, 52: 1 – 18, 2003.
- [48] Lima, V. M. G., Kriegera, N. Mitchell, D. A., Baratti, J. C., Filippis, de I., Fontana, J. D., Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 31: 53–61, 2004.
- [49] Güneş, A., Acar, R., Karaman ekolojik koşullarında silajlık sorgum-sudan otu melezinin ikinci ürün olarak yetiştirme imkanlarının belirlenmesi. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi., 19(35): 8-15, 2005.
- [50] Swanson, A. F., Laude, H. H., Varieties of Sorghum in Kansas. Agricultural Experiment Station, Kansas State College of Agriculture and Applied Science., 1934.
- [51] Görtanin, N., Süpürge darısı (*Sorghum technicus*)’dan yararlanma olanakları, Edirne’de süpürge sanatı ve bu sanatın ekonomik önemi. Türk Halk Bilim Araştırmaları Yıllığı, Kültür Bakanlığı, Milli Folklor Araştırma Dairesi Yayınları: 28, Süreli Yayınlar Dizisi., 4: 103-117, 1977.

- [52] Carter, P. R., Hicks, D. R., Kaminski, A. R., Doll, J. D., K. A. Kelling and G. L. Worf. Extension, Alternative Field Crops Manual., 1990.
- [53] Nevens, W. B., Harshbarger, K. E., Broomcorn silage for dairly cattle. Illinois Agricultural Experiment Station, Urbana, Illinois., 1023-1029, 1940.
- [54] Hird, H., Pumpery, R., Wilson, P., Sunderland, J., Reece, P., Idetification of peanut and hazelnut allergens by native two-dimensional gel electrophoresis, Electrophoresis., 21, 2678-2683, 2000.  
Park, H., Yamanaka, N., Mikkonen, A., Kusakabe, L., Kobayashi, H., Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds, Biosci, Biotechnol, Biochem., 64(5), 931-939, 2000.
- [55] Prabhu, V. A., Tambe, S. P., Gandhi, N. N., Sawant, S. B., Joshi, J. B., Rice Bran Lipase: Extraction, activity and stability, Biotechnol, Prog., 15(6), 1083-1089, 1999.
- [56] Bhardwaj, K., Raju, A., Rajasekharan, R., Identification, purification and characterization of a thermally stable from lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. Plant Physiolog., 127, 1728-1738, 2001.
- [57] Palocci, C., Soro, S., Cernia, E., Fiorillo, F., C.M.A., Monacelli, B., Monache, G. D., Pasqua, G., Lipolytic isoenzymes from Euphorbia latex. Plant Science., 165, 577-582, 2013.
- [58] Pseudomonas mendocina PK-12CS and Chemoselective hydrolysis of faty acid ester. Bioorganic & Medicinal Chemistry., 11, 1041-1046.
- [59] Hoppe, A., Theimer, R. R., NTitrimetric test for lipsase activity using stabilized triolein emilsiyon phytochemistry., 42(4), 973-978, 1996.
- [60] Kapranchikov, V. S., Zherebtsov, N. A., Popova, T. N., Purification and characterization of lipase from wheat (Triticum aestivum L.) germ. Applied Biochemistry and Microbiology., 40(1), 84-88, 2004.
- [61] Kambuurova, M., Kirilova , N., Mandeva, R., Derekova, A., Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic Bacillus stearothermorhilus MC 7 . Journal of Moleculer Catalysis B: Enzymatic., 22, 307-313, 2003.
- [62] Yadav, R.P., Sexana , R.K., Gupta, R., Davidson, S., Purification and characterzation of a regiospesific lipase from Aspergillus terreus. Biotechnol. Appl. Biochem., 28, 243-249, 1998.
- [63] Espinosa, R. A., Arreguin, B., Gonzalez, C., Purification and properties of a lipase from Cephalolei presignis (Coleoptera Chrysomelidae). Biotechnol, Apply, Biochem., 31, 239-244, 2000.

- [64] Pencreac'h G., Baratti, J. C., Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme Microb. Technol.*, 18: 417-422, 1996.



## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Sakarya’da doğdu. İlköğretimini Fatih İlköğretim Okulu, ortaöğretimini Dereköy İlköğretim Okulu’nda ve lise öğrenimini ATSO Anadolu Meslek Lisesi’nde tamamladı. 2011 yılında Ondokuz Mayıs Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü’nü kazandı ve 2016 yılında mezun oldu. 2016’da Sakarya Üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisansa başladı.



