



***ONOBRYCHIS TOURNEFORTII* (WILD.) DESV.'İN TOHUMUNDAN LİPOLİTİK  
BİR FRAKSİYONUN SAFLAŞTIRILMASI VE TEMEL KİNETİK  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**HİLAL KARAKAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**2018**

**SİVAS**



T.C.

SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ONOBRYCHIS TOURNEFORTII* (WILD.) DESV.'İN TOHUMUNDAN  
LİPOLİTİK BİR FRAKSİYONUN SAFLAŞTIRILMASI VE TEMEL  
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİLAL KARAKAŞ**

**(20169245001)**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Salih GÖRGÜN**

**SİVAS**

**Hilal KARAKAŞ**'ın hazırladığı ve “*ONOBRYCHIS TOURNEFORTII* (WILD.) DESV.'İN TOHUMUNDAN LİPOLİTİK BİR FRAKSİYONUN SAFLAŞTIRILMASI VE TEMEL KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı Doç. Dr. Salih GÖRGÜN**

Cumhuriyet Üniversitesi

**Jüri Üyesi Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS**

Cumhuriyet Üniversitesi

**Jüri Üyesi Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK**

Aksaray Üniversitesi

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

**Prof. Dr. İsmail ÇELİK**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.



*Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-551 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Hilal KARAKAŞ, 2018

## ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

14.12.2018

Hilal KARAKAŞ

## KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimde olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi sürecinde 2 yıl boyunca benden engin tecrübelerini ve değerli bilgilerini esirgemeyen, deneysel süreci gerçekleştirirken sabırlı ve hoşgörülü bir şekilde bana yardımcı olarak birçok şey kazandıran saygıdeğer danışman hocam sayın Doç. Dr. Salih GÖRGÜN'e, tez çalışmamda benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Mazen ALTHALJI'ye, çalışmamı gerçekleştireceğim laboratuvar ortamı ve deneysel süreçte lazım olan kimyasalların teminini sağlayan Cumhuriyet Üniversitesine, Fen Fakültesine ve Fen Bilimleri Enstitüsüne, tez projem için gerekli maddi desteği sağlayan Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP)'a, laboratuvarlarını kullanmamda bana yardımcı olan Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Arş. Gör. Serap ÇETİNKAYA'ya, gerek lisans gerekse yüksek lisans eğitimimde bilgi ve birikimleri ile destekçim olan Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü hocalarıma, yaşamım boyunca fiziki ve ruhsal, maddi ve manevi tüm desteklerini, sevgilerini benden esirgemeyen ve esirgemeyecek olan canım aileme ve yine her anlamda yanımda olan beni yalnız bırakmayan yol arkadaşım Semih CANIKLİGİL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

### ***ONOBRYCHIS TOURNEFORTII* (WILD.) DESV.'İN TOHUMUNDAN LİPOLİTİK BİR FRAKSİYONUN SAFLAŞTIRILMASI VE TEMEL KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hilal KARAKAŞ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Salih GÖRGÜN**

**2018, 62+xiv sayfa**

Bu çalışmada, sırasıyla Q sefaroza anyon değişim ve Sefakril S-200 HR kolon kromatografilerini kullanarak, *Onobrychis tournefortii* (Desv.)'in tohumundan esteraz aktivitesine sahip olan lipolitik bir fraksiyon 1.361  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein spesifik aktivite ve 7.08 kat saflıktaki saflaştırma parametreleriyle kısmi olarak saflaştırılmıştır. Nativ-poliakrilamid jel elektroforezi (Nativ-PAGE) çalışmaları yerine getirilerek, homojenat örnekleri molekül kütlelerinin 95 kDa, 59 kDa ve 42 kDa olduğu üç esterolitik band göstermiştir. Kısmi saflaştırılmış tohum esteraz fraksiyonu, 59 kDa ve 42 kDa'luk molekül kütlelerine sahip olan esteraz bantlarını içermiştir. Bu fraksiyonun sıcaklık ve pH optimumları sırasıyla 40 °C ve 8.0 olarak belirlenmiştir. Esterolitik aktivite üzerine dört farklı substratın (p-nitrofenil asetat; p-NPA, p-nitrofenil butirat; p-NPB, p-nitrofenil dodekanoat; p-NPD, p-nitrofenil palmitat; p-NPP) etkisi karşılaştırıldığında, en yüksek aktivite p-NPB üzerinde sergilenmiştir. Substrat olarak p-NPB kullanılarak,  $V_{\text{max}}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 0.2635  $\mu\text{mol.ml}^{-1}\text{dk}^{-1}$  ve 0.0808 mM olduğu bulunmuştur.

Sonuçlarımız bu bitki türünün tohumundan daha saf bir esteraz enzimi elde etmek için, daha fazla kromatografik adımın gereksinildiğini önermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Onobrychis tournefortii*, esterolitik enzimler, kromatografi, saflaştırma.



## ABSTRACT

### PURIFICATION AND DETERMINATION OF BASIC KINETIC PROPERTIES OF A LIPOLYTIC FRACTION FROM THE SEED OF *ONOBRYCHIS TOURNEFORTII* (WILD.) DESV.

Hilal KARAKAŞ

Master of Science Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Salih GÖRGÜN

2018, 62+xiv pages

In this study, a lipolytic fraction having esterase activity from the seed of *Onobrychis tournefortii* (Desv.) was partially purified with purification parameters of 1.361  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein specific activity and 7.08 fold purity, using Q sepharose anion exchange and Sephacryl S 200 HR column chromatographies, respectively. Homogenate samples showed three esterolytic bands in which molecular masses are 95 kDa, 59 kDa and 42 kDa, carrying out Native-polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE) studies. Partially purified seed esterase fraction consisted of the esterase bands having molecular masses of 59 kDa and 42 kDa. Temperature and pH optimums of this fraction were determined as 40 °C and 8.0, respectively. When compared to the effects of four different substrates (p-nitrophenyl acetate; p-NPA, p-nitrophenyl butyrate; p-NPB, p-nitrophenyl dodecanoate; p-NPD, p-nitrophenyl palmitate; p-NPP) on the esterolytic activity, the highest activity was exhibited on p-NPB. Using p-NPB as a substrate,  $V_{\text{max}}$  and  $K_m$  values were found to be 0.2635  $\mu\text{mol.ml}^{-1}\text{dk}^{-1}$ , and 0.0808 mM, respectively.

Our results have suggested that more chromatographic steps are needed to obtain the more pure esterase enzyme from the seed of this plant species.

**Key Words:** *Onobrychis tournefortii*, esterolytic enzymes, chromatography, purification.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>iii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enzimler .....	1
1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması .....	1
1.3 Esterazlar (EC 3. 1. 1. X) .....	2
1.4 Esterazların Sınıflandırılması.....	3
1.5 Esterazların Fonksiyonları .....	4
1.6 Esterazların Kataliz Mekanizması.....	4
1.7 $\alpha/\beta$ Hidrolaz Katlı Enzimler .....	6
1.8 Esterazların Uygulama Alanları .....	8
1.9 <i>Onobrychis</i> Familyasının Genel Özellikleri.....	9
1.10 Lipolitik Enzimler İle Yapılan Çalışmalar .....	10
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>17</b>
2.1 Kullanılan Kimyasallar .....	17
2.2 Kullanılan Çözeltiler .....	17
2.3 Kullanılan Cihazlar .....	17
2.4 Bitki Örneklerinin Temini.....	18
2.5 Esteraz Enziminin Saflaştırılması İçin Temin Edilen <i>Onobrychis tournefortii</i> Bitki Tohumunun Homojenizasyonu .....	18
2.6 Santrifüjleme İşlemleri.....	19
2.7 Kromatografik İşlemler .....	19
2.7.1 Q sefaroz anyon değişim kromatografisi .....	19
2.7.2 Sefakril S-200 HR jel filtrasyon kromatografisi .....	19
2.8 Esteraz Enzim Aktivitesi Tayinleri .....	20
2.9 Protein Miktar Tayinleri.....	21
2.10 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazına Sıcaklığın Etkisi.....	21
2.11 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazına pH Etkisi .....	22

2.12 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazına Substrat (p-NPB) Derişiminin Etkisi.....	22
2.13 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazına Substrat Zincir Uzunluğu Etkisi .....	22
2.14 Elektroforetik alışmalar .....	22
2.14.1 özeltiiler .....	23
2.14.1.1 Akriamid / Bisakriamid özeltisi .....	23
2.14.1.2 Ayırma jeli tamponu (4X).....	23
2.14.1.3 Yükleme jeli tamponu (4X) .....	23
2.14.1.4 % 10 SDS .....	23
2.14.1.5 %10 Amonyum persülfat (APS) .....	23
2.14.1.6 Örnek uygulama tamponu (2X) .....	23
2.14.1.7 Tank Tamponu (5X).....	23
2.14.2 Gümüş boyama .....	23
2.14.2.1 Fiksatif özeltisi .....	24
2.14.2.2 Ön geliştirme özeltisi.....	24
2.14.2.3 Gümüş nitrat (% 0.1'lik) .....	24
2.14.2.4 Bant oluşturma özeltisi.....	24
2.14.2.5 Sitrik asit özeltisi (2.3 M).....	24
2.14.3 Native-PAGE işlemi .....	24
2.14.4 SDS-PAGE işlemi.....	25
2.15. İstatiksel Analiz.....	27
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>28</b>
3.1 Homojenat İle İlgili Bulgular .....	28
3.2 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazının Saflaştırılması.....	28
3.2.1 Q-Sefaroz anyon değişim kromatografisi ile saflaştırma.....	28
3.2.2 Sefakril S-200 HR jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma.....	29
3.2.3 <i>O. tournefortii</i> tohum esterazı saflaştırma sonuçları.....	29
3.3 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazına Sıcaklığın Etkisi.....	33
3.4 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazına pH'ın Etkisi .....	35
3.5 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazına Substrat (p-NPB) Konsantrasyonunun Etkisi .....	37
3.6 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazına Substrat Zincir Uzunluğunun Etkisi .....	39
3.7 <i>O. tournefortii</i> Tohum Esterazı Elektroforetik Bulguları .....	40
<b>4. TARTIşMA ve SONUÇ .....</b>	<b>48</b>

<b>5. KAYNAKÇA .....</b>	<b>55</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>62</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Elektrostatik sapan modeli lipolitik enzimlerin nasıl çalıştığını göstermektedir (Petersen ve ark., 2001).....	6
Şekil 2 $\alpha/\beta$ hidrolaz katlanması (Nardini ve Dijkstra, 1999). ....	7
Şekil 3 <i>O. tournefortii</i> tohum esterazı Q sefaroz iyon değişim kromatografisi sonuçları. ....	30
Şekil 4 <i>O. tournefortii</i> tohum esterazı Sefakril S-200 HR jel filtrasyon kromatografisi sonuçları. ....	31
Şekil 5 Sıcaklığın <i>O. tournefortii</i> tohum esteraz aktivitesine etkisi. ....	34
Şekil 6 Sıcaklığın <i>O. tournefortii</i> tohum esteraz aktivitesine göreli etkisi. ....	34
Şekil 7 pH'ın <i>O. tournefortii</i> tohum esteraz aktivitesine etkisi. ....	36
Şekil 8 pH'ın <i>O. tournefortii</i> tohum esteraz aktivitesine göreli etkisi. ....	36
Şekil 9 Michaelis-Menten Grafiği. ....	38
Şekil 10 <i>O. tournefortii</i> tohum esterazının Lineweaver-Burk eğrisi. ....	38
Şekil 11 <i>O. tournefortii</i> tohum esterazına substrat zincir uzunluğunun etkisi.....	40
Şekil 12 Markıra ait molekül kütlesi ve $R_f$ değeri çalışmasına ait grafik. ....	41
Şekil 13 Molekül kütlesi ve $R_f$ değerinin lineer gösterimi ....	41
Şekil 14 Opti-Protein XL Marker, bantlara karşılık gelen molekül kütleleri . ....	44
Şekil 15 Homojenat, Q-Sefaroz anyon değişim ve Sefakril S-200 HR kromatografilerine ait Native-PAGE jel görüntüsü ....	45
Şekil 16 Jel görüntüsü.....	46
Şekil 17 SDS-PAGE jel görüntüsü (1 ve 4 Marker, 2,5 ve 7 Homojenat, 3 ve 9 Q-Sefaroz anyon değişim, 6 ve 8 Sefakril S-200 HR) ....	47

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1</b> Standart enzim aktivite ölçüm yöntemi tüp içerikleri .....	21
<b>Tablo 2</b> <i>O. tournefortii</i> tohum esterazı saflaştırma adımları .....	32
<b>Tablo 3</b> <i>O. tournefortii</i> tohum esterazına farklı sıcaklık değerlerinin etkisi .....	33
<b>Tablo 4</b> <i>O. tournefortii</i> tohum esterazına farklı pH değerlerinin etkisi.....	35
<b>Tablo 5</b> <i>O. tournefortii</i> tohum esterazına substrat (pNPB) konsantrasyonunun etkisi .....	37
<b>Tablo 6</b> <i>O. tournefortii</i> tohum esterazına substrat substrat zincir uzunluğunun etkisi .....	39
<b>Tablo 7</b> Markıra ait $R_f$ değerleri .....	43
<b>Tablo 8</b> Homojenat, Q-sefaroze ve Sefakril S-200 HR'ye ait $R_f$ değerleri.....	43

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Enzimler

Enzimler, doğada bulunan kimyasal tepkimeleri katalize eden proteinlerdir ve bu sebeptendir ki hayati öneme sahip moleküllerdir. Bu proteinler hakkında çok etkileyici olan şey, eşsiz bir çeşitliliğe sahip olmaları ve fizyolojik koşullar dahilinde oldukça karmaşık kimyasal dönüşümler gerçekleştirebilmeleri ve birçok organik kimyasal tepkimelerden farklı olarak stereo-özgüllüklerini ve regiospesifliğini koruyabilmeleridir. Büyüklükleri birbirinden farklıdır ve birkaç bin ila birkaç milyon dalton arasında değişken moleküler ağırlığa sahip olabilirler. Enzimler büyük moleküller olsa bile, asıl kataliz sadece küçük bir boşlukta yani aktif bölgede gerçekleşir. Bu bölgede az sayıda amino asit kalıntısı katalitik fonksiyona ve substratların bağlandığı yere katkıda bulunur. (Holliday ve ark., 2006).

Gıda endüstrisi ve diğer endüstri alanlarında enzimlerin kullanımı giderek artmaktadır. Enzim marketinin Avrupa'da yıllardan beri büyüme kaydettiği bildirilmekle birlikte, rakamlarla ifade edilecek olursa yıllık büyüme oranının % 8 olduğu ve 30 milyon Avro'dan daha fazla bir pazara ulaşmasının beklendiği öngörülmektedir. Endüstriyel süreçlerde kullanılan enzimlerin daha çok mikrobiyal ve hayvansal kaynaklı oldukları bilinmekle birlikte, rasemik karışımların rezolüsyonu, sürfektan sentezi veya yağ ve yağ türünden bileşenlerin yeniden şekillendirilmesi gibi süreçlerde lipaz ve fosfolipaz gibi lipolitik enzimler daha yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu bağlamda, bitkilerden elde edilen lipolitik enzimlerin değerlendirilmesi yönünde çalışmalar mevcuttur (Villeneuve, 2003).

## 1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

1956 yılında enzim sınıflandırma ve isimlendirme problemlerini çözmek için Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) olarak adlandırılan Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından Uluslararası Enzimler Komisyonu kurulmuştur. Bu Uluslararası Enzimler Komisyonu 1961'de bir raporda yayınlanmış olan ve 1964 yılında enzimler'in ikinci baskısında genişletilmiş form olan IUBMB tarafından Nomenklatür Komitesi aracılığıyla NC-IUBMB Enzim Listesinde geliştirilen enzim sınıflandırma sisteminin formülasyonu ile sonuçlanmıştır. Buna göre katalizlenen tepkimenin türü dahilinde enzimleri altı gruba ayırmak suretiyle genişletilmiştir. Bu altı

grup sırasıyla, oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır. Bu sınıfların her biri, her enzime benzersiz bir dört haneli kod olan Enzim Komisyonu (EC) numarası verildiğinde daha da fazla bölünmüştür. Birinci basamak enzimin sınıfını içerir. İkinci basamak (alt sınıf), genellikle ilgili bileşik veya grup türü hakkında bilgi içerir. Üçüncü sınıf, alt alt sınıf, ayrıca ilgili tepki türünü de belirtir. Dördüncü rakam, bir alt alt sınıftaki bireysel enzimi tanımlamak için kullanılan bir seri numarasıdır (McDonald ve ark., 2014).

### **1.3 Esterazlar (EC 3. 1. 1. X)**

Hidrolaz sınıfından enzimlerin iki önemli sınıfı “gerçek” esterazlar (E.C. 3.1.1.1, karboksil ester hidrolazlar) ve lipazlardır (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) (Bornscheuer, 2002). Esterazlar (EC 3.1.1.X), mikroorganizma, bitki, hayvansal organizmalarda geniş bir şekilde dağılım gösteren ester bağlarının hidrolizini ve oluşumunu kataliz eden enzimlerdir (Lopes ve ark., 2011). Başka bir tanımlamada ise, bir su molekülünün eklenmesiyle ester bağlarını hidroliz eden enzimler olarak tanımlanmışlardır. Genel olarak bir esteraz, substratın ya alkol ya da asit grubu için özgüdür, fakat aynı anda ikisi için özgül değildir (Fojan ve ark., 2000).

Lopes ve ark., (2011) kütinazlar için iki sınıflandırma önermişlerdir. Bunlardan birisi, kütinazların lipazlar gibi EC 3.1.1.3 olarak triaçilgliserol lipaz (önerilen isim) ve triaçilgliserol açıl hidrolaz (sistemik isim) olarak sınıflandırılabilirliği yönündedir. Aynı kaynak kütinazları EC 3.1.1.74 enzim komisyon numaralı ve kütinaz (önerilen isim) veya kütin hidrolaz (sistemik isim) olarak sınıflandırma yapılabileceğini de bildirmişlerdir. Lipaz ve kütinazların kinetik farklılıkları üzerine yapılan çalışmaların esteraz ve lipazlar arasındaki farklılığı ortaya koyduğu belirtilmektedir.

Lipazlar genellikle suda çözünmeyen triolein ve trioktanoin gibi orta veya uzun zincirli triaçilgliserollerin hidrolizini gerçekleştirdikleri kabul edilmesine rağmen, tripropionin ve tributirin gibi suda zayıf bir şekilde çözünebilir kısa zincirli triaçilgliserollerini de hidroliz etmektedirler. Esterazlar, lipazlar tarafından zayıf bir şekilde hidroliz edilen metil bütirat, etil bütirat ve triasetin gibi kısa zincirli yağ açıl esterlerinin çözümleri üzerinde faaliyet gösteren enzimlerdir (Chahinian ve ark., 2002). Diğer taraftan, Fojan ve ark. (2000), yukarıda açıklananları doğrulamakla birlikte, esteraz ve lipazların genellikle geniş substrat özgüllüklerine sahip olmaları nedeniyle sadece fonksiyonları



yolu ile sınıflandırılmayacaklarını, klonlanmış esteraz ve lipazlara bağılı olarak gelişen sekans bilgisinin olası sekans spesifik motifleri tanımlamakta kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yine Fojan ve ark. (2000)'in bildirdiği üzere, sekans çalışmaları odaklı olarak, çoğu esterazın merkezi aktif bölge serin kalıntılarının etrafında muhafaza edilmiş bir sekans motifinin (GESAG) sergilendiği açıklanmasına rağmen, *Candida rugosa* lipazı gibi bazı lipazlarda da aynı motifin bulunması ilginçtir.

Buraya kadar anlatılanlardan esteraz ve lipazların ayırımının yapılmasında güçlüklerin devam ettiği anlaşılmaktadır.

#### **1.4 Esterazların Sınıflandırılması**

Esterazların sınıflandırılmasına dair ilkin çalışmaların karboksil asit ester hidrolazlar gibi substratın asit grubuna özgülükleri esas alınarak Whitaker ve ark. (1972) tarafından önerilmiştir. Burada bahsedilen enzim günümüzde karboksil esteraz olarak adlandırılmakta olup, bu enzime ek olarak, lipazlar, asetil esterazlar, aril esterazlar, kolin esterazlar ve kolesterol esterazlar da aynı grupta sınıflandırılan enzimlerdir. Tarihsel olarak bu enzimlerin sınıflandırılması, bilinen substrat özgülüklerine göre yada hücrel lokalizasyonlarına göre yapılmıştır (Carriere ve ark., 1998; Fojan ve ark., 2000). Yine de bu şekilde yapılacak bir sınıflandırmanın esterazların karmaşık moleküler yapısına ve hücrel fonksiyonlarına ışık tutmayacağı aşikardır.

Günümüzde esteraz aktivitelerinin fonksiyonel sınıflandırılmasında birincil olarak üç inhibitör grubunun (p-kloromerkuribenzoat (pCMB), organofosfatlar (OP) ve eserin sülfat) teşhis konsantrasyonlarına güvenilmektedir. (Holmes ve Masters, 1967). Bu inhibitörlerin kullanımıyla yukarıda da isimleri geçen enzimlerin sınıflandırılması şu şekilde yapılmaktadır. Asetil esterazlar herhangi bir inhibitör tarafından etkilenmezler ve genellikle asetik asit gerektiren alifatik substratları tercih etmektedirler. Karboksil esterazlar alifatik esterleri tercih ederek, organo fosfatlar tarafından inhibe edilmektedirler. Yüklü substratları tercih eden ve hem organofosfatlar hem de eserin sülfat tarafından inhibe edilen esterazlar kolinesterazlar olarak sınıflandırılmışlardır. Esterazların son olarak dördüncü grubu ise sülfidril kimyasalları ile inhibe edilen aril esterazlardır. Esterazların bu şekilde biyokimyasal karakterizasyonu için testler mikroorganizmalar (Oakeshott ve ark., 1993), omurgalılar (Lith ve ark., 1989) ve böcekler (Lapenta ve ark., 1995) üzerinde yerine getirilmiştir.

Günümüzde  $\alpha$  ve  $\beta$  naftil ester substratları kullanılarak farklı fizyolojik fonksiyonlara sahip esteraz izo enzimlerinin tanısı  $\alpha$ -esterazlar ve  $\beta$ -esterazlar şeklinde de yapılabilmektedir (Carvalho ve ark., 2003). Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) sistemini kullanarak  $\alpha$  ve  $\beta$ -esteraz izozimlerindeki polimorfizmin araştırılması başlangıçta omurgasız ve böcek çalışmalarında kullanılmış ve geliştirilmiştir (Lapenta ve ark., 1995). Bununla birlikte, Pereira ve ark. (2001) bitkilerde esterazların fonksiyonel karakterizasyonu ile ilgili sınırlı çalışmanın ulaşılabildiğini bildirmişlerdir. Bu olgu günümüzde de devam etmektedir.

### **1.5 Esterazların Fonksiyonları**

Esterazlar çeşitli tipteki eksojen ve endojen kısa zincirli yağ asitlerinden oluşan esterlerin hidrolizini katalizleyen enzimler (Bornscheuer, 2002) olmalarının yanı sıra, büyük çoğunluktaki esterazların sentetik substratlar kullanılarak aktiviteleri belirlense de doğal substratlarının neler olduğu hala bilinmemektedir (Dubey ve ark., 2000).

Esterolitik enzimlerin besin veya diğer maruz kalma yollarından birisi vasıtasıyla karşılaşılan yabancı bir substrat için koruyucu ve temizleyici bir fonksiyon yaptıkları bildirilmektedir. Bu enzimler ifade edildikleri hücrelerde büyük farklılıklar göstermeleri nedeniyle, bazıları çoklu hücre tiplerinde bulunurken, diğerleri yüksek bir şekilde seçici ekspresyon göstermektedir. Bu bağlamda esterolitik enzimler bulunduğu canlı grubuna bağlı olarak, plazmaya eksport edilebileceği gibi diğer ekstraselüler alanlara yönlendirilebilir, sitoplazmada bulunabilir ya da hücre altı organellerde konuşlanabilir (Satoh, 2005).

Bitkilerde esterazların büyüme ve gelişme, stoma hareketlerinin gerçekleştirilmesi, enfeksiyon ve insektisitlere karşı direnç, meyve olgunlaşması, absisyon, hücre genişlemesi, üreme, ksenobiyotikleri içeren esterlerin hidrolizi ve sekonder metabolit metabolizması gibi süreçlerde etkin olduğu bildirilmektedir (Bhavith ve ark., 2014).

### **1.6 Esterazların Kataliz Mekanizması**

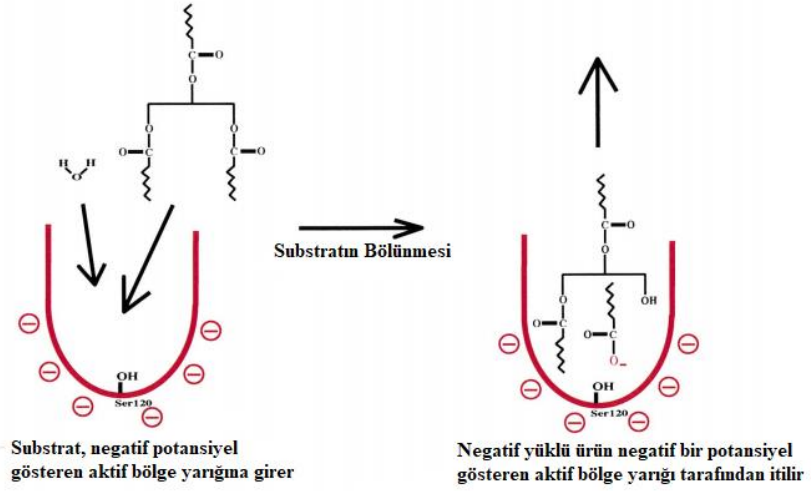
Bir proteinin yüzeyi, protein ve onu saran çevre arasında bir ara yüzey etkileşmesini gerektirir. Bir enzim ve substratı veya inhibitörü, bir reseptör ve ligandı veya başka bir tarz moleküler tanınma, yüzey etkileşimi tarafından belirlenir. Protein yüzeyi, herhangi bir amino asit rezüdesi tipinin bulunabileceği karmaşık bir sterik düzenlenmedir.

Bununla birlikte, farklı rezüdelerin tip ve tam pozisyonu termal kararlılık, substrat özgülüğü, aktivite ve optimum pH gibi fonksiyonel parametreler üzerine hayati etkiye sahiptir. Bununla birlikte, lipaz/esteraz enzimleri moleküler ara yüzeylerde veya yakınında faaliyet göstermeleri nedeniyle protein çalışmalarında özel zorluklar teşkil etmektedirler. Protein yapılanmasındaki molekül içi kuvvetlerin esansiyel olarak elektrostatik orjinli oldukları düşünülmektedir. Bu yüzden bir protein (enzim) ve substratı veya inhibitörü arasındaki başlangıç etkileşiminin moleküler anlaşılması, moleküler tanıma gibi molekül içi etkileşimlerde elektrostatik etkileşimlerin önemini belirtmektedir (Petersen ve ark., 2001).

Elektrostatik etkileşimlerin pH bağımlı olguyu kontrol eden birincil kuvvetler olduklarına inanılmaktadır. Sıklıkla, katalitik rezüdelerin bir veya daha fazlası titre edilebilir rezüdelerdir ve çok büyük bir olasılıkla en az bunlardan birisi çözücü ulaşabilir olacaktır. Bağlanma/katalitik bölge içerisinde yada yakınlarındaki bazı amino asitler de titre edilebilir olanlardır. Fonksiyon yapmak için, enzimlerin katalitik merkezindeki rezüdelerin, optimum pH dizininde uygun protonasyon durumuna sahip olmaları gerekmektedir (Antosiewicz ve ark., 1994).

Yüklü titre edilebilir rezüdelere tarafından üretilen elektrik potansiyelleri substrat bağlanmasını artırma, transisyon durumunu stabilize etmeleri ve etkin ürün salınımına yardım edebilmeleri nedeniyle katalizde önemli role sahiptirler. Bu bağlamda lipaz ve esterazların çalışma mekanizmasında elektrostatik yaklaşım kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmış ve elektrostatik sapan modeli (the electrostatic catapult model) ortaya atılmıştır. Substrat negatif potansiyel gösteren aktif siteye giriş yapar (Şekil 1) ve sonuçta oluşan negatif yüklü ürün yine negatif yüklü aktif merkez tarafından itilir (Petersen ve ark., 2001).

## Elektrostatik Sapan



**Şekil 1** Elektrostatik sapan modeli lipolitik enzimlerin nasıl çalıştığını göstermektedir (Petersen ve ark., 2001).

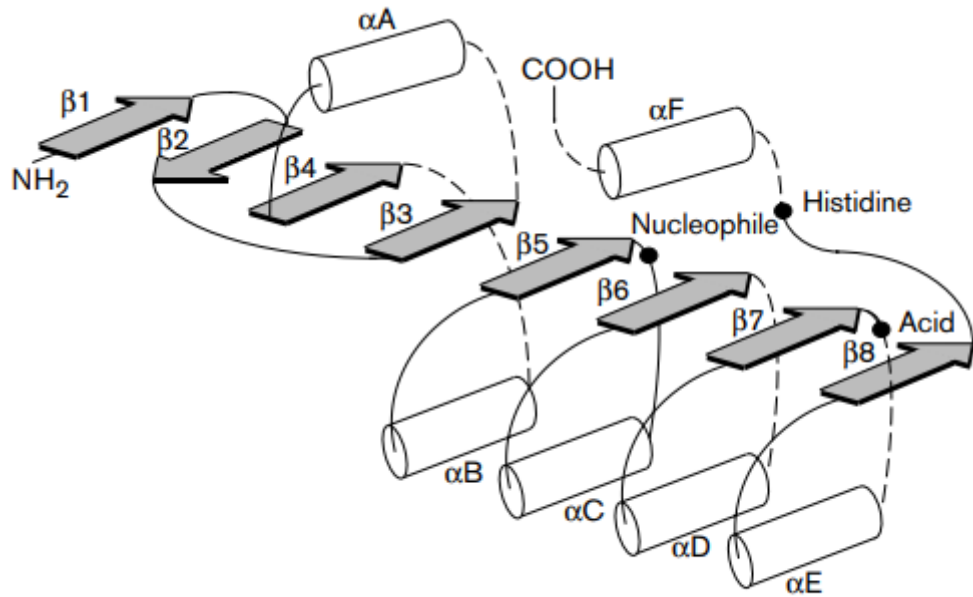
Lipaz/esteraz enzimleri organik çözen-su ara yüzeylerinde ester karboksilat bağlarının katalizini gerçekleştirmektedirler. Ayrıca 1906'da ilk defa gösterildiği üzere, suyun kısıtlandığı çevrelerde tersine tepkime (esterifikasyon) veya çeşitli transesterifikasyon tepkimelerinin bile meydana gelebildiği gösterilmiştir. Transesterifikasyon terimi bir ester ile bir asit arasındaki (asidolizis) gruplarının, bir ester ile bir alkol (alkolizis) gruplarının veya iki ester (interesterifikasyon) grubunun değişimini yansıtmaktadır. Yüksek etkinlik ile bu tepkimelerin kararlı ve çok yönlü bir şekilde katalizlenmesi lipolitik enzimleri ticari açıdan önemli kılmaktadır (Barros ve ark., 2010).

### 1.7 $\alpha/\beta$ Hidrolaz Katlı Enzimler

Doğada en sık bulunan protein domain katları,  $\alpha$  heliksler tarafından sarılan bir merkezi paralel veya karışık  $\beta$  plakalardan oluşan  $\alpha/\beta$  domainlerdir. 1992 yılında oldukça farklı katalitik fonksiyonlara sahip beş hidrolitik enzimi (dienelakton hidrolaz, haloalkan dehalojenaz, buğday serin karboksipeptidaz II, asetilkolinesteraz ve *Geotrichum candidum* lipazı) karşılaştırılmak suretiyle, bu protein katının bir alt sınıfı olarak  $\alpha/\beta$  hidrolaz katı tanımlanmıştır (Ollis ve ark., 1992). Farklı fonksiyonlarının dışında,  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanmasına sahip protein grubunun üyelerinin ne önemli derecede

sekans dizilimini paylaşmadıkları nede benzer substratlar üzerinde faaliyet göstermedikleri bildirilmekle birlikte, katalitik rezüdelerinin düzenlenmesi, şaşırtıcı yapısal benzerlikleriyle birleştirilerek, yaygın bir atasal formdan geliştiği ileri sürülmüştür (Heikinheimo ve ark., 1999; Nardini ve Dijkstra, 1999).  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanma ailesi içerisinde proteazlar, lipazlar, esterazlar, dehalojenazlar, peroksidazlar ve epoksit hidrolazları içermektedir. Bu bağlamda,  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanma ailesi bilinen en çok yönlü ve geniş protein katlarının birisidir (Nardini ve Dijkstra, 1999).

Kanonik bir yapıya sahip olan  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanması (Şekil 2),  $\alpha$  heliksler tarafından sarılan çoğunlukla paralel sekiz kollu  $\beta$  plakadan oluşur ve bu yapıda sadece ikinci  $\beta$  kolu antiparaleldir (Ollis ve ark., 1992; Heikinheimo ve ark., 1999; Nardini ve Dijkstra, 1999).  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanması çok geniş dizindeki farklı enzimlerin aktif merkezleri için kararlı bir amino asit dizilimi önermektedir. Bu bağlamda, katalitik rezüde daima muhafaza edilmiş bir triad yapısına sahiptir. Bu yapı;  $\beta 5$  kolundan sonra konuşlanan bir nükleofil (serin, sistein veya aspartik asit), daima  $\beta 7$  kolundan sonra konuşlanan bir asidik rezüde, ve son  $\beta$  kolundan sonra konuşlanan tam anlamıyla muhafaza edilmiş bir histidin rezüdesinden oluşmaktadır (Nardini ve Dijkstra, 1999).



Şekil 2  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanması (Nardini ve Dijkstra, 1999).

## 1.8 Esterazların Uygulama Alanları

Laboratuvar veya endüstriyel ölçekli olarak kullanılan lipolitik enzimlerin büyük çoğunluğu seçkin olarak mikrobiyal kökenden gelmektedir (Villeneuve, 2003). Buna karşın, endüstride yüksek üretim fiyatları nedeniyle araştırmacılar farklı enzim kaynaklarının arayışına yönelmişlerdir. Mikrobiyal kaynaklarla karşılaştırıldığında, günümüze kadar, modifikasyona uğratılmış yağların kullanımında bitki lipolitik enzimlerinin kullanımı çok fazla geliştirilememiştir. Bu olguya rağmen, bitkisel enzimler bazı durumlarda hayvansal ve mikrobiyal enzimlerden daha avantajlı olabilmektedir. Şöyle ki, özellikle bitki tohum lipazlarının özgülük, ulaşılabilirlik gibi parametreler açısından diğer gruplardakinden daha kullanışlı olabileceği bildirilmiştir (Villeneuve, 2003; Barros, 2010).

Esterolitik enzimlerin günümüzde kullanım alanlarından birisi yapay olarak geliştirilen ve sıklıkla ester bileşenleri olan pestisitlerin giderimine ek olarak, bu tarz kimyasalların çevresel olarak izlenmesinde kullanılmalarıdır. Mikrobiyal kaynaklı lipolitik enzimlerin bu bağlamda oldukça güvenli olduğu belirtilmektedir (Sood ve ark., 2016).

Detoksifikasyon tepkimelerinin ötesinde sentetik kimyada potansiyel uygulamalar bulan esterazların biyo-kataliz tepkimeleri önem arz etmektedir. Özellikle endüstriyel açıdan önemli kiral bileşiklerin sentezi için “Beyaz Biyoteknoloji (White Biotechnology)” de kullanımları, farmakoloji alanında giderek daha önemli hale gelmektedir. Ağrı kesici olarak yaygın bir şekilde kullanılan non-steroid bir ilaç olan naproksen buna iyi bir örnektir (Littlechild, 2015).

Esterazlar peynir ve diğer süt türevi ürünlerinin yapılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Buradaki rolleri birçok mandıra ürününün aroma, tat gibi özelliklerinin artırılmasıdır. Esterlerin fermente olmuş içeceklerin aroma kazanma süreçlerinde de önemli olmaları nedeniyle esterazlar içecek endüstrisinde de uygulamalara sahiptirler (Sumbly ve ark., 2009).

Esterazlar medikal anlamda da uygulama alanları bulmuşlardır. Özellikle kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan CPT 11, irinotikan (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-

piperidino] ve karbonyoksiamfotekin gibi kimyasal unsurların aktivasyonlarının esteraz enzimleri tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir (Sood ve ark., 2016).

Yukarıda anlatılanların bağlamında, bitki türlerinin lipolitik enzimlerinin araştırılması konusunda çabalar olmakla birlikte, bunların daha çok ticari öneme sahip bitki türlerinin lipazları üzerine olduğu anlaşılmaktadır. Bitki esterazları ile ilgili çalışmaların ise daha nadir olduğu söylenebilir. Bu nedenle bu başlık altında bahsedilen uygulamalar bitkilerde esterazlar dahil olmakla birlikte, daha çok lipazlara atfedilmiştir. Özellikle bitki tohumlarındaki lipolitik aktivitelerin lipit biyotransformasyon tepkimelerinde kullanımları önem arz etmektedir (Villeneuve, 2003). Bitkisel lipolitik enzimleri bu anlamda önemli kılan neden ise; mikrobiyal kaynaklar kullanılarak yapılan pahalı süreçlerin, bitkilerde saflaştırılma yapmaksızın ham doku homojenatlarının kullanımıyla yağların belirli bir içerik açısından zenginleştirilmesi ve transesterifikasyon gibi süreçlerde daha maliyetsiz olarak kullanılacaklarının gösterilmiş olmasıdır (Caro ve ark., 2000; Barros ve ark., 2010). Bu bağlamda, bitki tohumlarından lipolitik aktivite kullanılarak biyodizel üretiminin mikrobiyal enzimlerden daha umut verici bir alternatif olduğu bildirilmektedir (Mounguengui ve ark., 2013). Bu alandaki çalışmalar mikrobiyal kaynaklı lipolitik enzimler ile karşılaştırıldığında sayısının oldukça az olduğu görülmektedir. Buna göre, bitki tohumlarının özellikle de yabancı olan tohumların araştırılmasının bu alanda büyük katkı yapabileceği kanısını taşımaktayız.

### **1.9 *Onobrychis* Familyasının Genel Özellikleri**

*Onobrychis* genusunda yaklaşık 170 tür vardır ve bunların çoğunluğu Güneybatı Asya, Akdeniz bölgesi, ılıman koşulları olan Avrupa ve Asya'da bulunmaktadır. Türkiyenin ise 5 farklı kesiminde 28'i endemik olmak üzere 55 *Onobrychis* türü mevcuttur. Bu türler, mera ve çayır ıslahı, arazi koruma ve rehabilitasyon için önemli bir potansiyele sahip olup, özellikle çiftlik hayvanları ve toprak verimliliği için de oldukça önemli bir besin kaynağıdır ayrıca üreme için de önemli genetik kaynaklar olarak hizmet edebilmektedirler. Yem bitkilerinin tarla koşullarında tarımsal üretimde en çok istenen özelliklerinden birisi hızlı ve tekdüze çimlenme yeteneğidir. Birçok yabancı bitki türü tohumları, uygun çevresel koşullar altında bile düzgün bir şekilde filizlenemezler, çünkü birçok yabancı türün tohumları, su alımını ve gaz alışverişini engelleyen geçirimsiz bir tohum katmanına sahiptirler. Bu sebeple yabancı *Onobrychis* taksonunda bulunan sert tohum katından dolayı oluşan düşük çimlenme, ekimi önleyen en önemli

engeldir. Bunun yanısıra, senkronize olmayan, kötü çimlenme, doğal koşullar altında yabancı türlerin hayatta kalmasına izin verir (Avcı ve ark., 2013).

### 1.10 Lipolitik Enzimler İle Yapılan Çalışmalar

Lipolitik enzimler canlı organizmalardaki rollerinin yanı sıra endüstriyel kullanım potansiyeline sahip olmaları nedeniyle yoğun araştırmalara konu olmaktadır. Yapılan çalışmalar daha çok mikrobiyal ve hayvansal kökene sahip organizmalar olmakla birlikte, bitkilerde yapılan çalışmaların daha kısıtlı olduğu görülmektedir. Bu nedenle, bu bölümde sırasıyla mikroorganizma ve hayvansal kökenli çalışmaların güncel örnekleri ile birlikte bitkilerde yerine getirilen çalışmalara ait örnekler verilmiştir.

Esteraz üreten mikroorganizmaların tanımlanabilmeleri için çeşitli yöntemler ve yine saflık derecesini maksimumda elde etmek için farklı saflaştırma adımları kullanılmaktadır. Esterazların bakteriyel suşların tanımlanabilmesi ve isimlendirilmesinde kullanılabilen önemli moleküler belirteçler olduğu bildirilmektedir (Sayali ve ark., 2013).

Degrassi ark. (1999) *Saccharomyces cerevisiae*'den (maya) hücre içi bir esterazın saflaştırılması, kinetik özellikleri ve enzimi kodlayan geninin tanımlanmasına dair çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Bu organizmadan S-formilglutasyon hidrolaz olarak işlev gören hücre içi esterazı saflaştırmışlar ve mol kütesini jel filtrasyon ve SDS-PAGE kullanarak 40 kDa olarak belirlemişlerdir. İzoelektrik fokuslama tekniği ile izoelektrik noktayı 5.0 olarak kaydetmişlerdir. Enzimin optimal aktivitesini 50°C'de ve pH 7.0'de ölçmüşlerdir. Çalışmanın bulguları dahilinde enzimin, *S. cerevisiae* tarafından S-formilglutasyona metabolize edilebilme olanağı olan formaldehitin detoksifikasyonunda rol oynayabileceği bildirilmiştir.

Mikroorganizma kaynaklı başka bir çalışmada Gao ve ark. (2003) *Archaeon aeropyrum pernix K1*'den bir hipertermofilik esterazın klonlanması ve saflaştırılması işlemini gerçekleştirmişlerdir. İyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirilen mikroorganizma kökenli materyalde, rekombinant protein hem esteraz aktivitesi göstermiş hem de açıl aminoasit salgılayan enzim aktivitesi göstermiştir. Burada elde edilen esteraz enziminin optimum sıcaklığı 90 °C ve pH'sı



8.0 olarak belirlenmiştir. Rekombinant protein farklı zincir uzunluklarına sahip substratlar üzerinde hidrolitik aktivite göstermesine rağmen en yüksek aktivite p-nitrofenil kaprilat substratında elde edilmiştir.

Metin ve ark. (2006), son zamanlarda Aydın (Türkiye) ilinde bulunan Alangüllü termal kaynağından bir termofilik esteraz üreten bakteri (*Bacillus sp.* 4)'yi, 16S rRNA kullanılarak analizlenmiş ve *Geobacillus*'un yeni tanımlanmış olan türüne ait *Bacillus sp.* BGSC W9A59 (%70 sekans ayrılığı) ile yakından ilişkili bulunan *Geobacillus sp.* HBB-4 olarak sınıflandırmışlardır. *Geobacillus sp.* HBB-4'ten çeşitli kimyasalların termostabil esteraz aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemişler ve test edilen çeşitli metal iyonları arasında esteraz aktivitesini  $Mn^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$ 'nin artırırken,  $Hg^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$ 'nin inhibe edip  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Co^{+2}$ 'nin ise etkisinin olmadığını belirlemiştir.

Sana ve ark. (2007) deniz ortamından izole ettikleri *Sundarbans*'ların tuza dayanıklı bir *Bacillus* türünden dimetilsülfoksit toleranslı esterazı saflaştırmış ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Gerçekleştirilen bu çalışmada enzim, %6.4'lük bir geri kazanım (spesifik aktivite 569.2 U/mg protein), ile amonyum sülfat çöktürmesinin ardından anyon ve katyon kromatografileri kullanılarak 42.7 kat saflaştırma yapıldığı bildirilmiştir.

*Bacillus pumilus*'tan yeni bir esteraz enziminin klonlanmasını, ekspresyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştiren Xue ve ark. (2013) enzimin molekül kütleliğini 28.4 kDa olarak buluşlar ve CE1 olarak adlandırdıkları enzimi eksprese etmişlerdir.

Kim ve Baik (2015) insan bağırsak bakterisinden (*Lactobacillus acidophilus* F46) izole ettikleri rekombinant bir yeni sinamoil esterazının özelliklerini belirlemiştir. Saflaştırılan enzimde, SDS-PAGE ile yaklaşık olarak 27 kDa'lık bir molekül kütleliğine sahip tek bir bant bulmuşlardır. En yüksek aktivite pH 7.5 ve 50°C'de belirlenmiştir. Bunun yanı sıra enzimin pH 4.0-9.0 aralığında stabilite sağladığını ve termal stabilitenin ise 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızla azaldığını belirlemiştir. Bu laktik asit bakterisinin endüstriyel uygulamalarda önemli bir potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır.

Sharma ve ark. (2016) *Bacillus pumilus*'dan yüksek molekül kütleli ekstraselüler bir esterazı saflaştırmış ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Esteraz, hücre dışı bir kültür besi yerinden jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak % 22.5 verim ve 7.7

kat saflaştırma parametrelerine sahiptir. Araştırmacılar, SDS-PAGE tekniği ile enzimin molekül kütleini 17 kDa olarak belirlemişlerdir.

Santi ve ark. (2016) bir deniz bakterisini (*Thalassospira sp*) materyal olarak kullanıp, yeni bir soğuk-aktif ve tuz-toleranslı esterazın biyokimyasal karakterizasyonu ve yapısal analizini gerçekleştirmişlerdir. Bir başka psikrofilik enzim çalışması esterazın (EaEST) kristal yapısı ve fonksiyonel karakterizasyonu üzerine gerçekleştirilen çalışmada Lee ve ark., (2017), bu enzimin kaynağı olarak soğuk seven başka bir deyişle psikrofilik *Exiguobacterium antarctium* B7 bakterisini kullanmışlar. Bu bakteriden yeni mikrobiyal karakterde bir esteraz olan EaEST'yi tanımlamışlardır.

Fritsch ve ark. (2017), farklı *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria*'dan sinamoil esterazın karakterizasyonunu gerçekleştirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Gıdanın üretimi aşamalarında kullanılan çok çeşitli bitkiler esterlenmiş hidroksisinamik asit içermektedirler ve bunların serbest formları insan bağırsaklarında anti-oksdatif, anti-karsinojenik etkiler, gelişmiş bir emilim, gelişmiş protein çözünürlüğü ve azaltılmış renk değişimi gibi faydalar sergilediğinden ester bağıını kesip çıkarabilmek için mikrobiyal kabiliyeti yüksek düzeyde tutmaktadırlar.

Yenilebilir türde bir matar olan *Lycoperdon perlatum pers* (*Lycoperdaceae*, *Agaricales*, *Agaricomycetidae*, *Agaricomycetes*, *Basidiomycota*, *Fungi*)'de potansiyel açıdan bir esterolitik aktivite keşfi yapılmıştır. Ham özütlerin doğal jel elektroforezi sonucu Rf değerlerinin 0.34, 0.39, 0.52 ve 0.59 olduğu dört bant gösterilmiştir. Bu çalışmada en uygun substratın belirlenmesinde esteraz en yüksek aktiviteyi p-nitrofenil asetat için göstermiştir. Ham özüt için kullanılan *L. perlatum*'un optimum tepkime koşulları pH 8.0 ve 40 °C'de olarak bildirilmiştir (Çolak ve ark., 2009).

Liu ve ark. (2013), ester üretim alanında ticari kullanıma uygun mükemmel özelliklere sahip esterler olmadığını düşündüklerinden araştırmacılar daha alışılmamış esterazları arayıp, ester sentezi için karakterizasyonlarını ortaya koymak amacı ile çalışmalarını yürütmüşler ve *Rhizomucor miehei*'nin verimi yüksek olan ester sentezini gösteren ilk fungal esterazın biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirdikleri bir çalışma yapmışlardır.

Geçmişten günümüze değin hayvansal organizmaların kullanıldığı birçok lipolitik enzim saflaştırılması çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde endüstriyel alanda kullanılma potansiyeli olan esteraz enzimlerinin tanımlanması ya da esterazların belirteç olarak kullanıldığı çevresel etki değerlendirme çalışmalarının olduğunu görmekteyiz. Buna göre;

Cherif ve ark. (2007) yengeç sindirim lipazını hepatopankreastan saflaştırmışlar ve ilginç kinetik özelliklere sahip olduğunu belirtmişlerdir. 65 kDa molekül kütleli enzimin bilinen diğer sindirim lipazlarından farklı olarak gerek uzun, gerekse kısa zincirli triaçil gliseroller üzerinde maksimum aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Daha önemlisi saflaştırılmış enzim 60 °C’da maksimum aktivite göstermesi açısından biyoteknolojik önem arz ettiği bildirilmiştir.

Kolarich ve ark. (2008), insan plazmasında bulunan yüksek glikolize bir protein olan bütirikolinesterazın (hBChE’nin) karakterizasyonunu, insan plazmasından saflaştırarak gerçekleştirmişlerdir.

50 °C sıcaklık ve 8.5 pH değerlerinde optimum aktivite gösteren bir esteraz hindiden saflaştırılmış olup, endüstriyel ve biyoteknolojik öneme sahip olacağı yönünde bildirim yapılmış ender çalışmalar arasındadır (Cherif ve Gargouri, 2010).

Hepatopankreasın omurgalılarda detoksifikasyon süreçlerinde önemli rolleri olduğu bildirilmektedir. Buna göre, *Macrobium amazonicum*, *M. Jelskii* ve *M. Brasiliense* türlerinin esterolitik aktivitesini değerlendiren bir çalışmada türlerin on iki farklı esteraz bandına sahip olduklarını ortaya koymuştur (Lima ve ark., 2013).

Araújo ve ark. (2016) *Parachromis managuensis*’in beyin asetilkolinesteraz (AChE) kinetik parametrelerini karakterize etmiş ve biyo-belirteç olarak kullanılabilceğini önermişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre; *P. managuensis* beyin AChE’nin çalışılan ağır metaller ve pestisitler için, özellikle tavsiye edilen uluslararası sınır konsantrasyonundan 6 kat daha düşük seviyeler tespit edebilen karbamat karbofuran için potansiyel bir biyobelirteç olduğunu yayınlamışlardır.

Sole ve Sanchez-Hernandez (2015) ilaç ve kişisel bakım ürünlerinin (PPCP) tatlı su ve deniz ekosisteminde bulunan birçok yeni nesil kirleticilerin bir bölümünü oluşturan

duğunu ve bu bileşenlerin çevresel derişimleri düşük olduğunda bile sucul organizmalarda subletal etkilere (örneğin, enzim inhibisyonu) neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada balıklarda karboksil esteraz enziminin inhibisyonu değerlendirilmiştir.

Nöral iletişimden sorumlu sinir impluslarının aralıklı geçmesini sağlayan nörotransmitter asetilkolinin hidrolizi üzerinde etkili olan serin esteraz grubu enzim olan Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7), bazı pestisitlerin etkisi için ana hedeftir ve biyomarker olarak da kullanılabilceği bildirilmektedir. Bu bağlamda Mangrov istiridyesi (*Crassostrea rhizophora*) asetilkolinesterazı karakterize edilmiştir. *C. rhizophorae* solungaçları ve iç organ AChE için en uygun pH ve sıcaklık sırası ile 8.0 / 70°C ve 8.5 / 75°C olarak belirlenmiştir. Her iki dokudaki enzim için Michaelis-Menten sabitini solungaç için  $1.32 \pm 0.20$  mM ve iç organlar (visera) için  $0.43 \pm 0.12$  mM ve  $V_{max}$  değerleri sırası ile  $53.57 \pm 1.72$  ve  $27.71 \pm 1.15$  mU/mg olarak kaydedilmiştir. Termotabil enzime sahip olduğu belirlenen Mangrov istiridyesi'nin çevre kirliliğinin biyolojik gözlemi için umut verici özelliklere sahip bir model organizma olduğu bildirilmiştir (Souza ve ark., 2018).

Pahoja ve Settar (2002) bitkisel, hayvansal ve mikroorganizmalardan lipazların katalitik aktivitelerinin genel bir şemasını çizen önemli bir makale yayınlamışlardır. Bu makalede, böceklerde daha çok plazma, tükürük bezleri, kaslar ve yağ dokularında bulunan lipolitik aktivitenin, memelilerde pankreas ve gastrik mukozanın mukus hücreleri gibi alanlarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bitkisel dokular ile ilgili bildirimleri ise, lipolitik aktivitenin triaçilgliserollerin fazla miktarlarda bulunduğu gelişen tohumların yiyecek depo rezervuarlarında olduğu yönündedir.

El-Kouhen ve ark. (2005) memeli ve mikroorganizmalarda lipolitik enzimlerin yoğun bir şekilde çalışıldığını ancak bitkisel lipazlar hakkında çok az çalışma mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, *Arabidopsis* bitkisi üzerinde cDNA teknikleri kullanılarak yapmış oldukları çalışmalarda memeli asit lizozomal lipazına çok fazla homoloji gösteren bir triaçilgliserol lipazın optimum pH 6'da ve triolein substrat olarak kullanıldığında spesifik aktivitesinin  $45 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein olduğunu belirlemişlerdir.

*Linum usitatissimum* (keten tohumu)'nun germinasyon sürecinde yapılan elektroforetik bir saflaştırma çalışmasında, 42 kDa'luk bir lipolitik protein belirlenmiştir. Enzi-

min optimum pH'ı 4.7 olarak belirlenmekle birlikte, triaçilgliserollerin geniş bir dizisinde aktif olduğu bildirilmiştir. Yüksek EDTA ve tuz konsantrasyonlarında hafif bir şekilde etkilenen aktivitenin iyonik olmayan deterjanların yüksek konsantrasyonlarında önemli şekilde inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu veriler *L. usitatissimum*'un germinasyonu esnasında lipitlerin hidrolizinden sorumlu olan bir asit lipazın varlığını önermiştir (Sammour, 2005).

Farklı besin koşulları altında kokonat (*Cocos nucifera linn*) tohumlarının ham doku lipaz aktivitesi kokonat yağı, triolein, tripalmitin ve zeytin yağı kullanılarak belirlenmiştir. Önemli bir bulgu olarak, enzimin en iyi substratının yine nativ substratı olan kokonat yağı olarak bulunmuştur. Enzim 35 °C'da optimum sıcaklığa sahip olup, pH'ın 7.5 ila 8.5 arasında geniş bir dizinde pH optimumuna sahip olduğu bildirilmiştir (Ejedegba ve ark., 2007).

*Olea europaea* (zeytin) bitkisinin polenin germinasyonu esnasında sahip olduğu esterazlar tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Buna göre, yağ kütlesi ve küçük veziküllerde, polen tüp duvarının kalloz tabakası ve polen intininde 20 adet spesifik olmayan esteraz bandı tanımlanmıştır. Ayrıca, apertür, polen kılıfı ve ekzin gibi polen kısımlarında asetilkolin esteraz aktivitesinin varlığı belirlenmiştir. *O. europaea* polenin fonksiyonel olarak karboksilesterazlar, asetilesterazlar, asetilkolin esterazlar ve lipazlar'dan oluştuğu sonucuna ulaşılmasıyla birlikte, bir bitkinin poleninde yapılan ilk esteraz sınıflandırması çalışması olması açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (Rejon ve ark., 2012).

*Ricinus communis*, *Zea mays*, *Helianthus annus* ve *Passiflora edulis* bitkilerinin tohumları, konsantre yağ asidi üretimi için yağı hidrolize etmede uygulamaları için araştırılmıştır. Ayrıca bu bitkilerin lipazlarının katalitik aktiviteleri üzerine pH, sıcaklık, tohum germinasyon periyodu ve farklı zincir uzunluklu substratların etkileri değerlendirilmiştir. Buna göre, *R. communis* tohum ekstraktlarının lipolitik aktivitesi emülsifiye edici unsurların yokluğunda en fazla aktiviteyi sergilemiştir. Bu nedenle çalışılan bitkilerden *R. communis*'in farklı bitkisel yağların hidrolizinde uygun olabileceği bildirilmiştir (Santos ve ark., 2013).

Patui ve ark. (2014) tohum germinasyonu esnasındaki *Coffea arabica* (kahve)'nin lipaz aktivitesini belirlemeye çalışmışlardır. Buna göre, tohumların inhibisyonundan önce mevcut olan lipaz aktivitesinin tohum germinasyon sürecinin ilerlemesiyle arttığı

belirlenmiştir. Ayrıca tohum lipaz aktivitesinin hem endokarp içeren hem de içermeyen bitki tohumlarının özelliklerini karşılaştırması nedeniyle bifazik olduğu belirtilmiştir. Kahve tohum örneklerinde anti-lipaz antikoru ile yapılan immunokimyasal analiz ile enzimin 60 kDa'luk bir protein olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışma, kahve tohumlarının antioksidan özelliği hakkında da bilgi vermiş olup, endokarpın varlığı lipofilik fraksiyonun oksidasyonunu düşürmesi açısından hayati derecede önemli bulunmuş ve endokarplı bitkinin oksidasyona daha az yatkın olduğu bildirilmiştir.

Pirinç tüm dünyada en fazla tüketilen temel gıdalardan birisidir. Pirinç mahsulünün ekonomik değerinin pirinç öğütme süreci esnasında elde edilen bir yan ürün olan pirinç kepeği yağı üretilerek artırılacağı bildirilmektedir. Bu sürecin önündeki en önemli zorluk ise pirincin sahip olduğu lipolitik aktivitenin barındırdığı yağı dekompoze etmesidir. Bu nedenle, biyoinformatik araçlar kullanılarak 125 pirinç (*Oryza sativa ssp japonica*) geni incelenmiş ve pirinç kepeğinde yeni bir lipaz belirlenmiştir. Bu lipazın pirinçte bulunan triaçilgliseroldeki oleik asit ve linoleik aside çok yüksek afinitesi olduğu gösterilmiştir (Tiwari ve ark., 2016).

Lipolitik enzimlerin tüm canlı gruplarında birçok çalışmaya konu oldukları yukarıda verilen literatür bilgilerinden anlaşılmaktadır. Burada genellikle 2000 yılı sonrasında yerine getirilen çalışmaların derlenmesine özen gösterilmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde, lipolitik enzimlerin mikroorganizma ve hayvansal organizmaların düzeyinde gerek biyolojik gerekse in vitro uygulamalarına yönelik çok sayıda çalışma mevcut olmasına rağmen, bitkilerde bu konudaki çalışmaların yetersiz kaldığı ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında endemik bir yabancı bitki türü olan *Onobrychis tournefortii*'nin germine olmamış tohumundan esterolitik bir fraksiyonun saflaştırılması ve elde edilmiş olan bu fraksiyonun moleküler özelliklerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Kullanılan Kimyasallar

EDTA (Etilendiamintetraasetikasit), PVP (Polivinilprolidon), DTT (Dithiothreitol), Tris (Hidroksimetil aminometan), BSA (Bovin serum albümin),  $\alpha$ -naftil asetat, p-NPB (4-nitrofenil butirat), p-NPA (4-nitrofenil asetat), p-NPD (4-nitrofenil dekanolat), p-NPP (4-nitrofenil palmitat), Fast Blue RR Salt, Bradford protein boyası, akrilamid, bisakrilamid, APS (Amonyum Persülfat), TEMED (Tetraetilenmetilendiamin), Glisin kimyasalları sigma marka kullanılmıştır. Hekzan, metanol, etanol, asetonitril, aseton, asetik asit ve diğer çözücüler Merck marka kullanılmıştır. Tüm kullanılan kimyasallar ya Merck ya da Sigma marka olup moleküler biyolojik saflıkta bulunmaktadır.

### 2.2 Kullanılan Çözeltiler

Yapılan deneyler esnasında kullanılan tüm tepkenler ve içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

1. Homojenat Tamponu: 50 mM Tris-HCl pH: 7,40 (0,2 g PVP, 1mM (0,07 g) EDTA, 1mM (0,03g DTT katkılı)
2. Aktivite Tamponu: 50 mM Tris-HCl pH: 8,0 (%4 Etanol katkılı)
3. Kolon Denge Tamponu 1: 20 mM Tris-HCl pH: 7,35 (Jel Filtrasyonu İçin)
4. Kolon Denge Tamponu 2: 20 mM Tris-HCl pH: 7,35
5. Akrilamid/Bisakrilamid (29,2 g + 0,8 g)
6. Ayırıcı Jel: 1.5 M Tris-HCl (pH:8,8)
7. 4X Yükleme Jeli: 0.5 M Tris-HCl pH: (6,8)
8. 5X Tank Tamponu: 15 g Tris, 72 g Glisin (pH:8,3)
9. Substrat Çözeltisi: 50 mM p-NPB (p-nitrofenil bütirat, saf asetonitrilde çözülmüştür)
10. Organik Çözücüler: Metanol, Etanol, Hekzan, Aseton, Asetonitril
11. EDTA (etilendiamintetraasetik asit)

### 2.3 Kullanılan Cihazlar

Ultra-Turrax T 25 Homojenizatör

WiseTis Homogenizer (Wisd Laboratory Instruments)

Universal 320 Hettich santrifüj

Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible spektrofotometre

Sanyo MSE MS 60 soğutmalı ultrasantrifüj

Grant LTD 60 sirkülatörlü su banyosu ısı inkübatörü

pH metre

Vorteks

Isı inkübatörlü manyetik karıştırıcı

Peristaltik pompa

Protein elektroforezi (Dikey)

#### **2.4 Bitki Örneklerinin Temini**

*Onobrychis tournefortii* (Wild.) Desv. bitkisi Sivas ili sınırları içerisinde toplanmış ve laboratuvara getirilmiştir. Bitki örnekleri doğrudan -20 °C'daki bir derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Daha sonra *O. tournefortii* türünün tohumları buzlu ortam altında çıkarılmış ve elde edilen bitki tohumları çalışma materyali olarak kullanılmak üzere yine -20 °C'da depolanmıştır.

#### **2.5 Esteraz Enziminin Saflaştırılması İçin Temin Edilen *Onobrychis tournefortii* Bitki Tohumunun Homojenizasyonu**

Bitkinin tohumları bir makas yardımı ile dikenli kabuğundan ayrılarak toplanmıştır. Tohumlar el değirmeninde öğütülerek hassas bir terazi ile 3,140 g olacak şekilde tartılmıştır. *Onobrychis tournefortii* 50 mM ve pH=7,40 olan PVP'li homojenat tamponu içerisinde bir miktar bekletilmiştir. PVP'li homojenat tamponu içerisindeki örneğe 15 ml olacak şekilde PVP'li homojenat tamponu eklenip buzlu bir ortam sağlanarak 2-3 dakikalık süreyle 24,000 devir.dk<sup>-1</sup> hızda WiseTis (Wisd Laboratory Instruments) markalı homojenizatörde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatta bitki dokusunun parçalarının kalmaması için homojenize edilen örneğe 30 ml olacak şekilde PVP'li homojenat tamponu eklenerek buzlu bir ortamda 1-2 dakika homojenizatörde 1500 devir.dk<sup>-1</sup> hızla tekrar homojenize edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar birleştirilerek enzim saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.



## 2.6 Santrifüjleme İşlemleri

Homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiş olan homojenize örnek Universal 320 Hettich Zentrifugen markalı santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Yeteri derecede çökme işleminin sağlanabilmesi için örnek aynı markalı santrifüjde 10 dk daha santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası homojenat hacmi 23 ml ölçülmüştür. Örnek MWCO (Molecular Weight Cut-Off) değeri 10 kDa olan ultrafiltratörde konsantre edilmiştir. Elde edilen fraksiyonda gerek üst sıvının gerekse çökeltinin enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçülmüştür.

## 2.7 Kromatografik İşlemler

*Onobrychis tournefortii* bitkisinden esteraz enziminin kromatografik saflaştırma işleminde sıralı bir şekilde, anyon değişim kromatografisi olan Q sefaroze, jel filtrasyon kromatografisi olan Sefakril S-200 HR koşulları aynı olacak şekilde uygulanmıştır.

### 2.7.1 Q sefaroze anyon değişim kromatografisi

*O. tournefortii*'nin tohumundan esterolitik bir fraksiyonun saflaştırılması amacıyla ilk olarak Q sefaroze (% 20 etanol içerisinde kullanıma hazır) iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Bu dolgu maddesinden 20 mL alınarak hazırlanan kromatografi düzeneğindeki kolona doldurulmuş ve kolon etanolü uzaklaştırmak amacı ile kolondan distile su geçirilerek yıkanmıştır. Daha sonra derişimi 20 mM ve pH'sı 7.35 olan kolon denge tamponu ile yıkanan kolon dengelenmiştir. Örnek kolona uygulandıktan sonra pompa yardımıyla kolona bağlanmayan seriler, kolon denge tamponuyla yıkanmak suretiyle toplanmıştır. Kolona bağlanmayan serilerin toplanmasından sonra, bağlı bulunan proteinlerin toplanabilmesi için kolon sırasıyla 100, 200, 400, 500, 800 mM NaCl tuz serileri ile yıkanmıştır. Tüplere toplanan elüsyonların 280 nm dalga boyundaki yaklaşık protein miktarları ve 405 nm dalga boyunda esteraz aktiviteleri belirlenmiştir. Aktivite gösteren tüpler alınarak bir sonraki kromatografi için hazırlanmıştır.

### 2.7.2 Sefakril S-200 HR jel filtrasyon kromatografisi

Saflaştırma çalışmasının ikinci evresinde jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Bu amaçla, yine % 20'lik etanol çözeltisi içerisinde ticari olarak elde edilen Sefakril S-200 HR kolon dolgu maddesi kullanılmıştır. Bu dolgu maddesinden 20 mL alınarak önceden hazırlanmış kromatografi düzeneğindeki kolona doldurulmuştur. Yukarıda Q

sefaroze işleminin bu saflaştırma adımına uygulanmasının ardından etanol uzaklaştırılarak kolon derişimi 20 mM ve pH'sı 7.35 olan 50 mM NaCl katkılı kolon denge tamponu ile kolon dengelenmesi sağlanmıştır. Dengeleme işleminin sonrasında, bir önceki Q-sefaroze kolonundaki aktivite gösteren örnekler konsantre edilerek Sefakril S-200 kolonuna uygulanmıştır. Peristaltik pompa yardımıyla kolona uygulanan örnek NaCl içermeyen 20 mM ve pH'ı 7.35 olan tampon ile toplanmıştır. Toplanan tüm tüplerde yine Q sefaroze iyon değişim kromatografisinde olduğu gibi, protein miktarı (280 nm) ve esterolitik aktivite içerikleri (405 nm) araştırılmıştır. Aktivite gösteren tüpler toplanarak çalışmanın daha ileri evrelerinde kullanılmak üzere derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

## 2.8 Esteraz Enzim Aktivitesi Tayinleri

Bitki dokusu örneğinin esteraz aktivitesi tayinleri Bülow ve Mosbach (1987)'nin yönteminde çeşitli değişiklikler yapılarak ölçülmüştür. Aktivite ölçümü için pH'ı 8,0 olan % 4 etanol katkılı 50 mM Tris-HCl çözeltisi aktivite tamponu olarak hazırlanıp kullanılmıştır. Substrat olarak 50 mM derişimde olacak şekilde saf asetonitrilde hazırlanan 4-nitrofenil bütirat (p-NPB) çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmalar esnasında 5 mL olacak şekilde aktivite tampon serileri taze olarak (4900 µl aktivite tamponu ve 100 µl substrat (p-NPB) çözeltisinden oluşan karışım) hazırlanıp 30°C'de inkübe edilerek aktivite ölçümü için kullanılmıştır. Toplamda hacmi 1 ml olan kuvartz küvetlerden aktivite tüpü 990 µl substratlı aktivite tamponu ve 10 µl homojenat ve kolon örnekleri olacak şekilde hazırlanmıştır. Kör tüpü ise 1000 µl olacak şekilde substratlı aktivite tamponu eklenerek hazırlanmıştır (Tablo 1). Tüm aktivite ölçümlerinde Grant LTD 60 sirkülatörlü su banyosu ısı inkübatörü olarak kullanılmış ve Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible markalı spektrofotometrede aktivite ölçümleri 405 nm ve 30°C'de 3 dk boyunca köre karşı okunmuştur. Çalışma esnasında çok konsantre olup aktivite ölçümü yapılamayan bazı örnekler seyreltilmiş ve hesaplamalarda bu seyreltmeler dikkate alınmıştır. Bir enzim ünitesi (IU) 1 dakika boyunca 30 °C'de 1 µmol p-NPB'nin p-NP (p-nitrofenol)'e dönüşümünü sağlayan enzim miktarı olarak nitelendirilmiştir (Görgün ve Akpınar, 2012; Görgün ve Zengin, 2015)

**Tablo 1** Standart enzim aktivite ölçüm yöntemi tüp içerikleri

<b>Tepkime Bileşenleri</b>	<b>Kör tüpü (µl)</b>	<b>Örnek tüpü (µl)</b>
Substrat (pNPB)'lı Aktivite Tamponu	1000	990
Enzim Çözeltisi	-	10
Toplam tepkime hacmi	1000	1000

## **2.9 Protein Miktar Tayinleri**

Kromatografik işlemler gerçekleştirilirken elde edilen elüsyon tüplerinin protein miktarları 280 nm dalga boyunda kabaca belirlenmiştir. Konsantrasyonları yüksek olup spektrofotometrede ölçümü alınamayan örnekler seyreltilmiş ve hesaplamalar esnasında seyreltmeler dikkate alınmıştır. Saflaştırma tablosunun oluşturulmasında aktivite gösteren elüsyon tüpleri birleştirilerek kolona uygulama öncesinde protein miktarları Bollag ve ark. (1996) tarafından geliştirilen ve boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250'nin kullanıldığı yöntem aracılığıyla 595 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Proteinin standart eğrisinin hazırlanmasında sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. Bu maksatla 1 mg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda BSA hazırlanıp 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 20.0, 30.0 µl olacak şekilde ependorflara eklenmiştir. Yine ependorflara homojenat ve kolon örneklerinin farklı hacimlerde (µl) örnekleri eklenmiştir. Bütün ependorf tüplerine hacimleri 100 µl olacak şekilde distile su eklenmiştir. Ardından ticari olarak temin edilen Bradford boyası bütün ependorflara 1 ml eklenmiş ve tüpler vortekslenerek 15 dakika bekleyeceği şekilde karanlık bir ortama bırakılmıştır. Bekleme süresinin tamamlanmasından sonra spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda tüplerin absorbansı alınmış ve protein miktarları belirlenmiştir.

## **2.10 *O. tournefortii* Tohum Esterazına Sıcaklığın Etkisi**

*O. tournefortii* tohum esterazına sıcaklığın etkisinin değerlendirilebilmesi için farklı sıcaklıklar (4, 10, 20, 30, 40, 60) kullanılmıştır. Bunun için 10 µl örnek hedeflenen sıcaklıklarda 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi tamamlanan enzim çözeltilerine standart aktivite ölçüm yöntemi uygulanmış ve aktivite değerleri üç tekrarlı olacak şekilde elde edilmiştir.

### **2.11 *O. tournefortii* Tohum Esterazına pH Etkisi**

pH değerlerinin 5.7, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 olduğu noktalarda esterolitik aktivite değerlendirilmiştir. Bu amaç için pH'ın 5 ile 7 olduğu aralıkta fosfat tamponu kullanılırken, 8 ile 10 arasındaki pH değerlerinin aktivite üzerine olan etkisini belirlemek için tris tamponu kullanılmıştır. 10 µl enzim örneğini barındıran ependorf tüpler ilgili pH'da 15 dk süreyle inkübe edilmiş ve standart aktivite yöntemi ile bu pH'larda ölçümler yapıp enzim aktiviteleri ölçümler üç tekrarlı olacak şekilde belirlenmiştir.

### **2.12 *O. tournefortii* Tohum Esterazına Substrat (p-NPB) Derişiminin Etkisi**

Substrat etkisinin belirlenebilmesi için p-NPB'nin farklı derişimlerinin aktiviteleri standart enzim aktivitesi yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Bulunan enzim aktivite-  
lerinin hızları dahilinde  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerler elde edilmiştir. Bütün denemeler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **2.13 *O. tournefortii* Tohum Esterazına Substrat Zincir Uzunluğu Etkisi**

*O. tournefortii* tohumundan elde edilen esteraza substrat zincir uzunluğunun belirlenebilmesi amacıyla farklı zincir uzunluklarında substratlar (p-NPA, p-NPB, p-NPD, p-NPP) kullanılmıştır. Farklı substratları içeren enzim örneklerinin aktiviteleri standart enzim aktivite yöntemi ile belirlenmiştir. Tüm ölçümler üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **2.14 Elektroforetik Çalışmalar**

$\alpha$ -esteraz band deseni çalışması Görgün ve Zengin (2015)'e göre bir takım modifikasyonlarla yerine getirilmiştir. Bu amaçla Native PAGE elektroforezi yapılmış ve %8'lik jel kullanılmıştır. Örnekler elektroforez düzeneğinde 1 saat 30 dakika boyunca 300 volt 100 mA akım geçirilerek şekilde Tris-Glisin tampon çözeltisinde (pH 8.3 0.025 M Tris ve 0.192 M Glisin) yürütülmüştür. Elektroforez aşamasında kullanılan çözelti şu şekilde hazırlanmıştır:

## **2.14.1 Çözeltiler**

### **2.14.1.1 Akrilamid / Bisakrilamid çözeltisi**

100 mL distile su içerisinde 29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid çözündürülerek hazırlanmıştır.

### **2.14.1.2 Ayırma jeli tamponu (4X)**

18.15 g Tris tartılmış ve pH'sı 5 N HCl varlığında 8.8 olacak şekilde ayarlanarak distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### **2.14.1.3 Yükleme jeli tamponu (4X)**

3 g Tris tartılmış ve pH'sı 5 N HCl varlığında 6.8 olacak şekilde ayarlanarak distile su ile hacmi 50 mL'ye tamamlanmıştır.

### **2.14.1.4 % 10 SDS**

5 g SDS tartılmış ve hacmi distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

### **2.14.1.5 %10 Amonyum persülfat (APS)**

0.5 g APS katısı tartılarak 5 mL distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır (Taze olması için kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır).

### **2.14.1.6 Örnek uygulama tamponu (2X)**

2.5 mL yükleme jeli tamponu, 4 mL %10'luk SDS çözeltisi, 2 mL gliserol, 1 mL  $\beta$ -merkaptoetanol, 0.01 g Bromophenol mavisi karıştırılarak hacim distile su yardımıyla 10 mL'ye tamamlanmıştır.

### **2.14.1.7 Tank Tamponu (5X)**

15 g Tris ve 72 g glisin tartılıp hacmi distile su kullanılarak 1 litreye tamamlanmıştır (Seyreltmesi 5 kat olacak şekilde hazırlanarak kullanılmıştır).

## **2.14.2 Gümüş boyama**

Gerçekleştirilen elektroforetik işlem sonrasında jellerin boyanması adımı gümüş boyama tekniği de kullanılmıştır. Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

#### **2.14.2.1 Fiksatif çözeltilisi**

% 40 (v/v) olacak şekilde hazırlanmış metanol çözeltilisi içerisine % 37'lik formaldehit ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) kimyasalından 0.5 mL eklenerek çözeltilinin hacmi distile su ilave edilere 1 L'ye tamamlanmıştır.

#### **2.14.2.2 Ön geliştirme çözeltilisi**

0.2 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Sodyum tiosülfat) tartılarak hacmi 1L olan distile su içerisinde çözüldürülerek kullanıma hazırlanmıştır.

#### **2.14.2.3 Gümüş nitrat (% 0.1'lik)**

Boya çözeltilisi olarak kullanılacak bu çözelti için 0.1 g gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) tartılarak 1 L distile su ile çözüldürülmüştür. Bozunma olmaması için oda sıcaklığında amberli şişe içerisinde muhafaza edilmiştir.

#### **2.14.2.4 Bant oluşturma çözeltilisi**

Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) kimyasalından 30 g tartılıp 20 ml ön geliştirme çözeltilisi ile birlikte 1 L distile su içerisinde çözüldürülmüştür. Çözeltiyi kullanmanın hemen öncesinde % 37'lik Formaldehit çözeltilisinden 0.5 mL ilave edilmiştir.

#### **2.14.2.5 Sitrik asit çözeltilisi (2.3 M)**

22.1 g sitrik asit 50 mL distile su ile çözüldürülmüştür.

#### **2.14.3 Native-PAGE işlemi**

İşlemler detaylı olarak şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Elektroforez işleminin hemen öncesinde elektroforez camları distile su ile yıkanmış ve ardından leke kalmaması ve steril olması için etanol ile silinmiştir. Jel dökme aparatı arasına yerleştirilen camlar arasına %10'luk ayırıcı jel dökülmüştür. Bu işlem için, 50 ml'lik falkon tüpe hacmi 25 mL olacak şekilde 8.3 mL akrilamid/bisakrilamid çözeltilisi, 6.3 mL 4X ayırma jeli tamponu, 10.14 mL distile su, 0.25 mL APS (Amonyumpersülfat) çözeltilisi hazır edilmiştir. Bu çözeltilinin üzerine 10 µL TEMED çözeltilisi ilave edilerek beklemeden karışım camlar arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Damlalık kullanılarak jelin üzerine yüzeyin düzeltilmesi amacıyla az miktarda n-bütanol ilave edilerek tarak jel donmadan hemen yerleştirilmiş ve jelin donması beklenmiştir. Daha sonra jel donunca yüzeyde kalan n-bütanol bir kurutma kağıdı aracılığıyla jelden

iyice uzaklaştırılmıştır. Tarak çıkarıldıktan sonra mevcut örneklerin ve markırın yük-  
leneceği kuyucuklar düzeltilmiştir.

Beş kat seyreltilmiş SDS içermeyen tank tamponu, jelin alt ve üst tabakalarına göre  
doldurulmuştur. Sonra elüsyon tüplerinde bulunan örnekler ile marker kuyucuklara  
yüklenmiştir. Yükleme sırası not alınmıştır. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak  
cihaz 1 saat 20 dk boyunca 300 V 100 mA akım geçirilecek şekilde ayarlanmıştır.  
Markırın en sondaki renkli bandı jelden çıkmaya yakın elektroforez işlemi durdurul-  
muştur. Yürütme için 1 saatin yeterli olduğu gözlenmiştir. Elektroforez işlemi bittikten  
sonra cam jel dökme aparatından çıkarılarak camlar arasında bulunan jel yırtılmama-  
sına dikkat edilerek distile su yardımıyla çıkartılarak boyama işlemi için hazırlanmış-  
tır.

Jel önce 1 ml asetonda çözülmüş 40 mg  $\alpha$ -naftil asetatta daha sonra da 180 mg fast  
blue RR salt ile boyanmıştır. Boyama işlemi sonrasında belirgin bantların oluşumuna  
bağlı olarak jel fiksatif çözeltisi (%60 metanol, % 40 asetik asit) içerisinde 20 dk fikse  
edilmiştir. Fiksasyon sonrası jel fazla boyanın giderilmesi amacıyla distile su/meta-  
nol/asetik asit (80/8/12 ml) çözeltisinden oluşan destain çözeltisinde bekletilerek fo-  
toğraflanmıştır. Jel üzerinde örnek ve markırların üzerindeki bantların yürüme mesa-  
feleri ölçülerek jelin tüm boyunun hesaba katılmasıyla  $R_f$  değerleri hesaplanmıştır.  
Elektroforetik analizde kullanılan protein markırları yardımıyla mevcut bantlara ait  
molekül kütlesi belirleme işlemi yapılmıştır (Görgün ve Zengin., 2015).

#### **2.14.4 SDS-PAGE işlemi**

SDS-PAGE çalışmaları Temizkan ve Arda (1999)'a göre yerine getirilmiştir. Yöntem  
şu şekilde uygulanmıştır: SDS katkılı %10'luk jel hazırlanarak elektroforez camlarının  
arasına hava kalmayacak şekilde doldurmuş ve üzerine yüzeyin düzeltilmesi için bir  
miktar n-bütanol ilave edilerek tarak yerleştirilmiş ve jelin donması beklenmiştir. Jel  
donduktan sonra bir kurutma kağıdı vasıtası ile n-bütanol iyice uzaklaştırılmıştır.  
Ependorftaki örnekler buzluktan alınıp, çözüldürüldükten sonra örneklerden eşit  
protein miktarında alınmış ve 10  $\mu$ l'lik örnek uygulama tamponu bulunan ependorflara  
eklenmiş, sonrasında da denatürasyon işleminin gerçekleşebilmesi için örnekler sıcak  
su banyosunda beş dakika olacak şekilde bekletilmiştir. Donan jelden tarak çıkarılmış  
ve hava kabarcığı olmayan kuyucuklara örnekler yüklenmiştir. Elektroforez güç  
kaynağına bağlanarak elektroforez aparatının içine SDS katkılı 5X tank tamponu jelin

alt ve üst tabakasında belirlenmiş olan seviyelere kadar boşaltılmıştır. Güç kaynağı 300 V 100 mA’de 1 saat 5 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

Yürütme işleminin sonlanması ardından jel elektroforez camlarının arasından herhangi bir zarar görmesine müsaade etmeyecek şekilde çıkarılmıştır. Çıkarılan jel alkole ve aside dayanıklı uygun plastik yada cam bir kaba alınmış ve üzerine 200 mL formaldehit fiksatif çözeltisi ilave edilerek 20 dk boyunca çalkalanmıştır. Jel fikse edildikten sonra fiksatif jelden uzaklaştırılarak iki defa 10’ar dakika olacak şekilde distile su ile hafif çalkalanarak yıkanmıştır. Son yıkama suyu uzaklaştırıldıktan sonra jel 200 mL Sodyum tiyosülfat (0.2g/1L) çözeltisinde 1-2 dk kadar çalkalanmıştır. Sodyum tiyosülfat çözeltisi jelden uzaklaştırılarak jel 2 defa 40’ar saniye distile su ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra jel, 200 mL boya çözeltisi (0.1g Gümüş nitrat/1L)’nde 20 dk hafifçe çalkalanmıştır. Görüntünün oluşması amacı ile jel 200 mL taze hazırlanmış görüntü oluşturma çözeltisinde kahverengi bantlar oluşana dek hafifçe çalkalanmıştır (tahmini 3-5 dk). Bantlar belirlendikten sonra ortamın nötrleşmesinin gerçekleşebilmesi ve tepkimenin durdurulması için sitrik asit çözeltisi 10 mL olacak şekilde eklenmiştir. Bant oluşumu tamamlandıktan sonra (sıklıkla 8 saat sonunda) kaptaki çözelti uzaklaştırılmış ve jel distile su içerisinde saklanmıştır. Bantların belirgenleştiği jel fotoğraflanmış ve kullanılan protein markırı ile mevcut bantların molekül kütlesi belirlenmiştir.

Jelde bantları daha iyi bir şekilde görebilmek için Coomasse Brilliant Blue R-250 boyası ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Önce fiksatif çözeltisi (%40 su, %50 metanol, %10 asetik asit) hazırlanarak jele dökülmüştür. Fiksatif jelden uzaklaştırıldıktan sonra boyama çözeltisi (%40 su, %50 metanol, %10 asetik, %0.05 Coomasse Brilliant Blue R-250) hazırlanıp jele dökülerek jelin boyanması sağlanmıştır. Bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için destain çözeltisi (%5 Metanol, %7 Asetik asit, %88 su) hazırlanıp jele döküldükten sonra bantların yerinin daha iyi belirli olması için 1 gün boyunca karanlık bir yere alınarak saklanmıştır.



## 2.15. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizin gerçekleştirilmesinde ‘‘SPSS 15.0 for Windows’’ istatistik paket programından yararlanılmıştır. Deneylerin hesaplanan ortalamaları ve yapılmış olan tekrarlarının arasındaki farkların kontrolü, Duncan (1955)’in Multiple Range Test’i ile gerçekleştirilmiştir. Bu mevcut ortalamalar arası farkın 0.05 olasılık derecesinde P değeri karşılığından daha buyk olduğunda önemli olduğu anlaşılmıştır.



### 3. BULGULAR

#### 3.1 Homojenat İle İlgili Bulgular

Yapılan bu tez çalışmasında endemik bir bitki türü olan *Onobrychis tournefortii*'nin tohumları kullanılmıştır. Sağlam tohumlar seçilerek homojenize edilmiş ve hacmi 23 mL olan homojenat elde edilmiştir. Santrifüjleme işlemleri esnasında elde edilen tortularda yüksek miktarda protein varlığına rağmen oldukça düşük esterolitik aktiviteye rastlanmıştır ve bu nedenle çalışmalarda üst sıvı (süpernatant) kullanılmıştır. Buna göre, elde edilen homojenata ait protein miktarı 17 mg/ml olarak belirlenirken, aktivite değeri 3.22  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{dk}$  olarak hesaplanmıştır. Homojenattaki toplam aktivite 74.15  $\mu\text{mol/dk}$ , toplam protein miktarı ise 386.5 mg protein olarak belirlenmiştir. Belirtilen bu değerlere sahip olan homojenattaki spesifik aktivitenin 0.192 U/mg.protein spesifik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu evredeki homojenatın verimi % 100, saflaştırma katsayısı ise 1 olarak alınmıştır.

#### 3.2 *O. tournefortii* Tohum Esterazının Saflaştırılması

*O. tournefortii* tohum esterazının saflaştırılması esnasında iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere iki farklı kromatografi kullanılmıştır. Bu işlemlerin bulguları detaylı bir şekilde aşağıda verilmiştir.

##### 3.2.1 Q-Sefaroz anyon değişim kromatografisi ile saflaştırma

Materyal metod kısmında bahsedildiği şekilde hazır edilen ve kolona boşaltılan dolgu maddesine homojenizasyon ve santrifüjleme işlemi sonrasında hacmi 23 ml ölçülen örnek kolona uygulanmış ve peristaltik pompa vasıtasıyla tüplerde toplanmıştır. Kromatografik işlem sonucunda elde edilen elüsyon tüplerinin protein ve aktivite miktarları Şekil 3'de gösterilmiştir.

Örnek uygulandıktan sonra kolon, pH'sı 7.35 olan 20 mM'luk derişimdeki Tris-HCl tamponuyla yıkanmış ve 9 numaralı tüp dahil olmak üzere kolona bağlanmayan fraksiyonun elüsyonu sağlanmıştır. Bu fraksiyonda 3 ve 5 numaralı tüpler arasında düşük aktivite gösteren bir esterolitik fraksiyon belirlenmiştir. 280 nm protein ölçümlerinden ve şekil 3'ten izlenebileceği üzere buradaki fraksiyon en yüksek protein piki olduğu gözlenmektedir. İlk tüplerde kolona bağlanmayan fraksiyon ilk üç tüpte toplanmıştır. 10 ile 17 nolu tüpler arasında gerçekleştirilen 100 mM derişimde NaCl içeren kolon denge tamponu ile yıkama sonucunda 14 ve 15 numaralı tüplerde yoğun bir aktivite

bandı olduğu belirlenmiştir. 200mM NaCl yıkama işlemi (18-25 numaralı tüpler) ile önemsiz bir aktiviteye sahip fraksiyon olduğu belirlenmiştir. NaCl içeriği 400 mM ve 800 mM derişimdeki elüsyonlarda protein pikleri elde edilmesine rağmen, herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır.

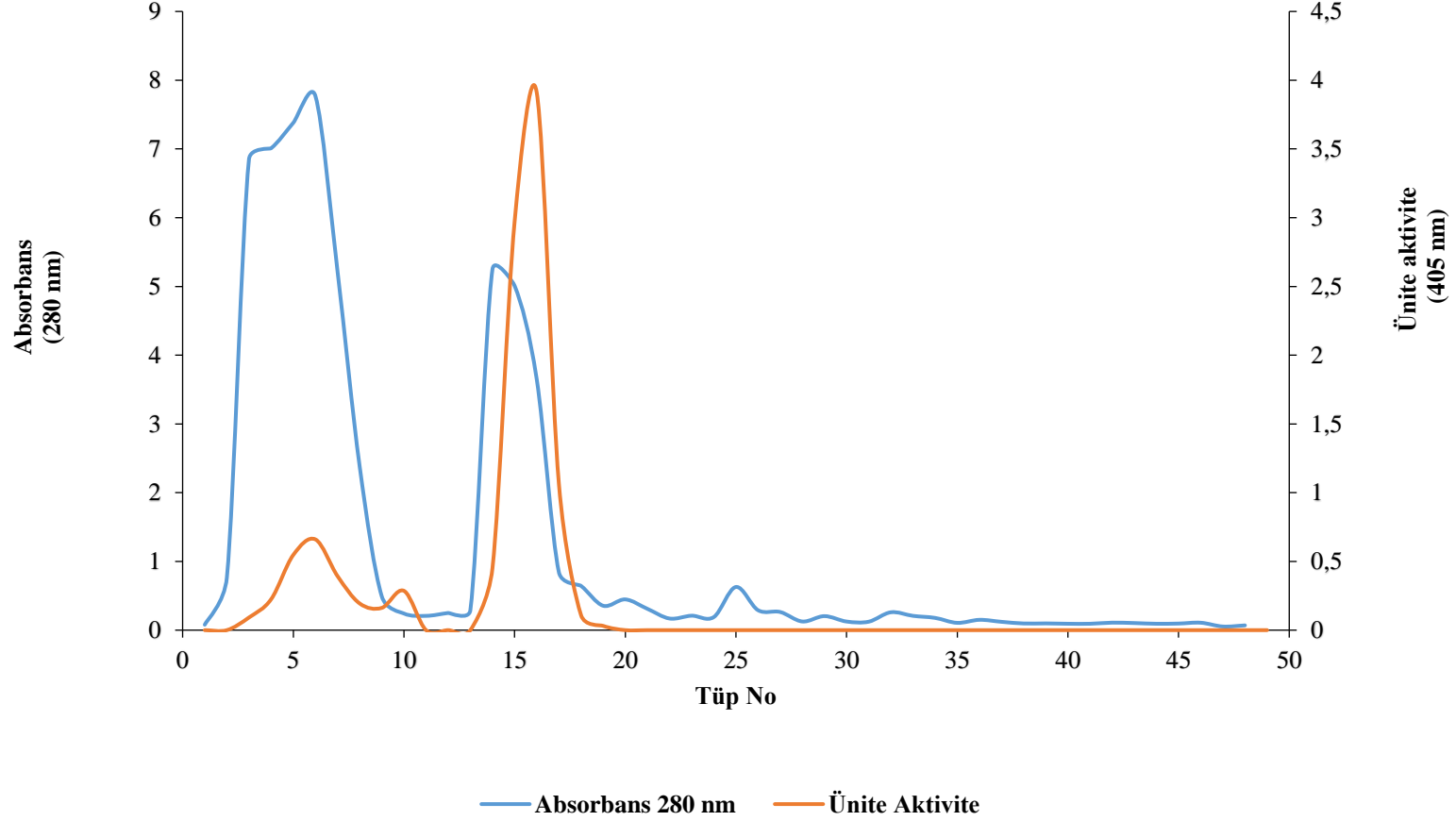
Yapılan Q sefroz iyon değişim kromatografisi sonucunda çizilen kromatogramda 4 büyük protein fraksiyonu ve iki adet esteraz aktivite pikinin olduğu belirlenmiştir. Esteraz aktivitesinin 100 mM NaCl yıkama işlemi sonucunda 14, 15 ve 16 nolu tüpler alınarak bir sonraki saflaştırma adımına uygulanmak için hazırlanmıştır.

### **3.2.2 Sefakril S-200 HR jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma**

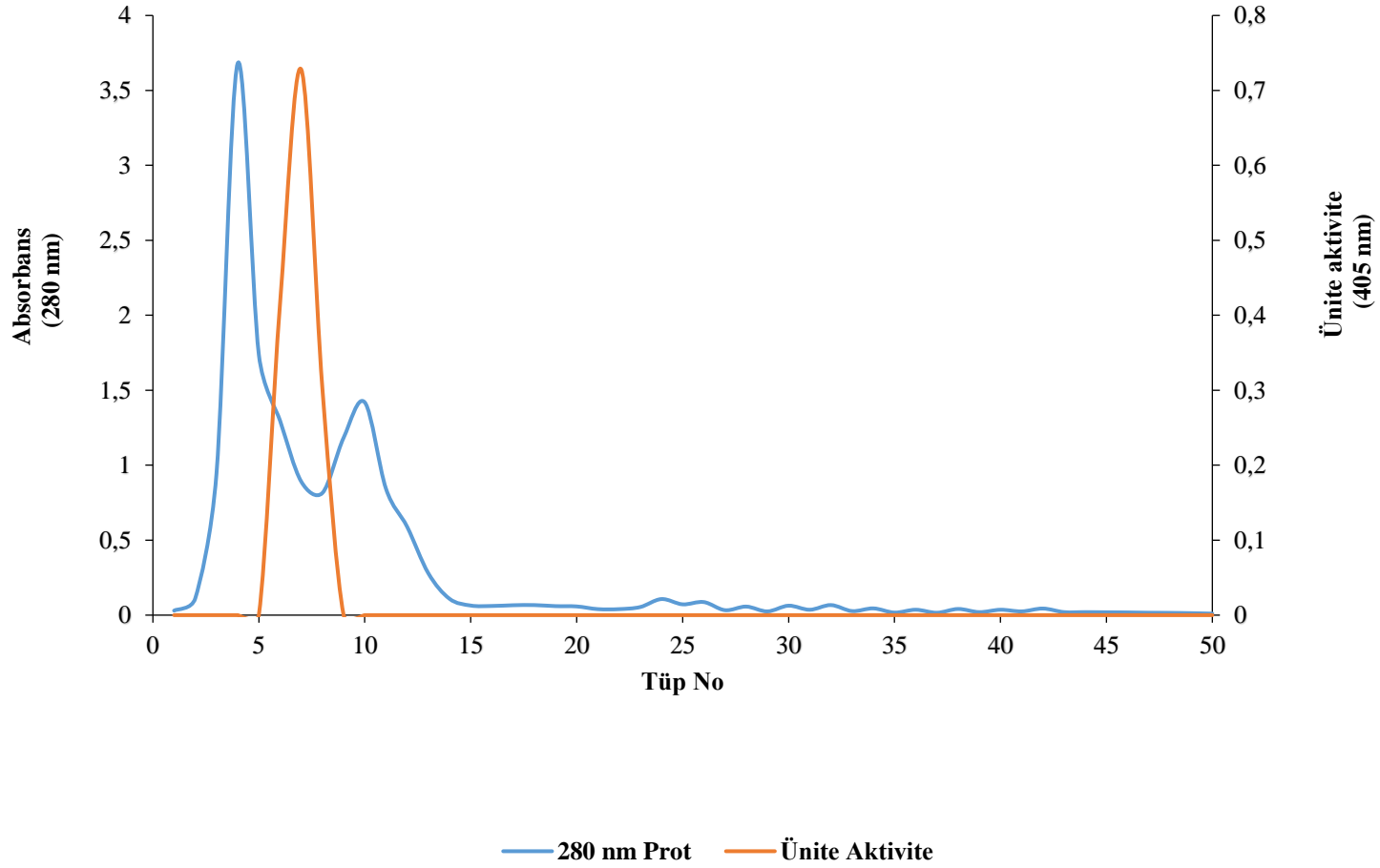
Q sefroz kromatografisi sonrasında spesifik aktivitesi yüksek olan tüpler birleştirilmiş ve Sefakril S-200 HR ile doldurulmuş kolona uygulanmıştır. Çalışmaya ait veriler Şekil 4'ten görülmektedir. Örnek kolona uygulanması sonrasında doğrudan 20 mM ve pH'ı 7.35 olan tamponla yıkanarak elüsyon tüplerinin protein (280 nm) ve esteraz aktivitesi (405 nm) belirlenmiştir. Kromatografi sonucunda örnekler 50 tüpe 2'şer ml olacak şekilde toplanmıştır. Elüsyon işlemi sonucunda 9 numaralı tüpe kadar yüksek protein içeriğine sahip bir pik belirlenmiş ve bu fraksiyondaki 5 ve 7 numaralı tüplerin olduğu kesitte esteraz aktivitesine rastlanmıştır. 10 numaralı tüpten 16 nolu tüpe kadar olan kesitte esteraz aktivitesi göstermeyen başka bir protein pikinin varlığı söz konusudur. Sefakril S-200 HR kromatografisi ile elde edilen ve aktivite gösteren 5, 6 ve 7 nolu tüpler birleştirilmiş ve kinetik karakterizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

### **3.2.3 *O. tournefortii* tohum esterazı saflaştırma sonuçları**

Tohum esterazının saflaştırılmasına dair veriler Tablo 2'de gösterilmiştir. Homojenatının toplam proteini 386.51 mg, toplam aktivitesi 74.15  $\mu\text{mol/dk}$  ve spesifik aktivitesi 0.192  $\mu\text{mol/dk.mg}$  olarak hesaplanmıştır. Enzim örneğinin Q Sefroz anyon çalışması sonrasında toplam protein, toplam aktivite ve spesifik aktivite sırasıyla 7.84 mg, 3.48  $\mu\text{mol/dk}$  ve 0.444  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein olarak bulunmuştur. İkinci saflaştırma basamağında kullanılan Sefakril S-200 HR kromatografisinde ise toplam protein, toplam aktivite ve spesifik aktivite sırasıyla 0.44 mg, 0.60  $\mu\text{mol/dk}$  ve 1.361  $\mu\text{mol/dk.mg}$  protein olarak bulunmuştur. Burada verim % 0.815 olup 7.080 katlık bir saflaştırma gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3 *O. tournefortii* tohum esterazı Q-sefarez iyon değişim kromatografisi sonuçları.



Şekil 4 *O. tournefortii* tohum esterazı Sefakril S-200 HR jel filtrasyon kromatografisi sonuçlar

**Tablo 2** *O.tournefortii* tohum esterazı saflaştırma adımları

<b>Basamak</b>	<b>Aktivite (<math>\mu\text{mol/mL.dk}</math>)</b>	<b>Protein (mg/mL)</b>	<b><math>\Sigma</math>Hacim (mL)</b>	<b><math>\Sigma</math>Aktivite (<math>\mu\text{mol/dk}</math>)</b>	<b><math>\Sigma</math>Protein (mg)</b>	<b>Spesifik aktivite <math>\mu\text{mol/dk.mg}</math></b>	<b>Verim(%)</b>	<b>Saflaştırma (Kat)</b>
	<b>Ort<math>\pm</math>S.H</b>	<b>Ort<math>\pm</math>S.H</b>		<b>Ort<math>\pm</math>S.H</b>	<b>Ort<math>\pm</math>S.H</b>			
Homojenat	3.224 $\pm$ 0.09	17 $\pm$ 1.167	23	74.15 $\pm$ 2.14	386.51 $\pm$ 37.96	0.192	100	1
Q Sefaroz	0.435 $\pm$ 0.02	0.980 $\pm$ 0.11	8	3.48 $\pm$ 0.12	7.84 $\pm$ 0,89	0.444	4.693	2.312
Sefakril S-200	0.302 $\pm$ 0.01	0.222 $\pm$ 0.02	2	0.60 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.04	1.361	0.815	7.083

Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Ort.  $\pm$  S.H. = Ortalama  $\pm$  Standart Hata

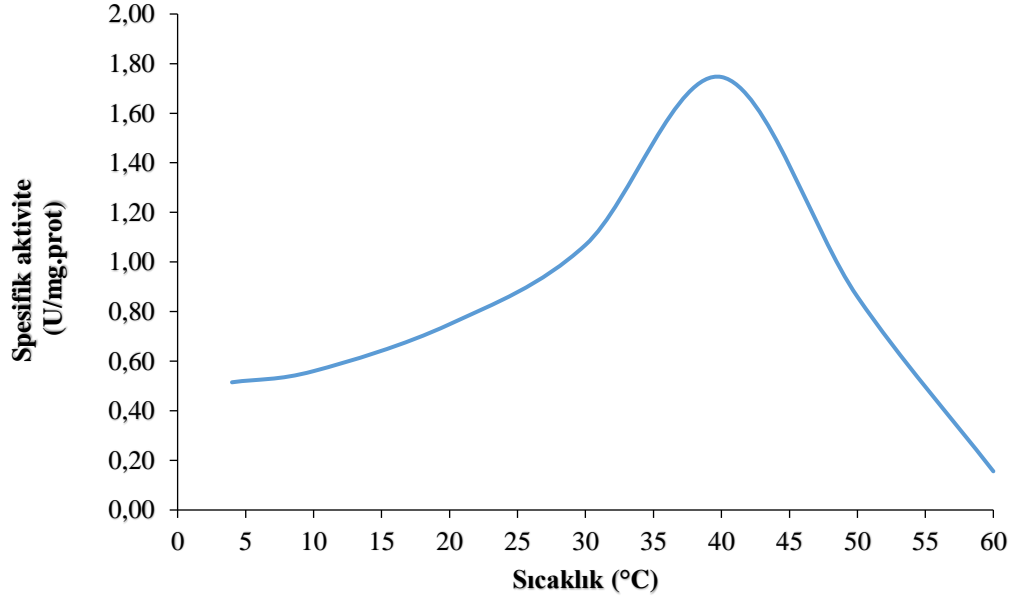
### 3.3 *O. tournefortii* Tohum Esterazına Sıcaklığın Etkisi

Tohum esteraz aktivitesine sıcaklığın etkisinin değerlendirilebilmesi için 4 °C ile 60 °C arasında değişen sıcaklıklar kullanılmıştır. Verilere göre 4 °C ile 10 °C sıcaklıklarda elde edilen aktivite değerleri önem arz edecek şekilde farklılık göstermemiştir. Sıcaklığın 20 °C’de yapılan ölçümlerde önemli bir aktivite artışı görülmüştür. Sıcaklığın 30 °C olduğu ölçümlerde de aktivitede artış gözlenmekle birlikte, 40 °C’de belirlenen aktivitenin en yüksek aktivite (1.746 U/mg.prot) değerine sahip olduğu belirlenmiştir. 50 °C’da yapılan ölçüm neredeyse optimum sıcaklığın % 50 aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın 60 °C’ ye çıkarılması ile aktivitede önemli bir düşüş yaşanmış ve optimum aktivitenin sadece % 9’luk bir kısmını koruyabildiği tespit edilmiştir. Tüm veriler Tablo 3, Şekil 5 ve Şekil 6’da gösterilmiştir.

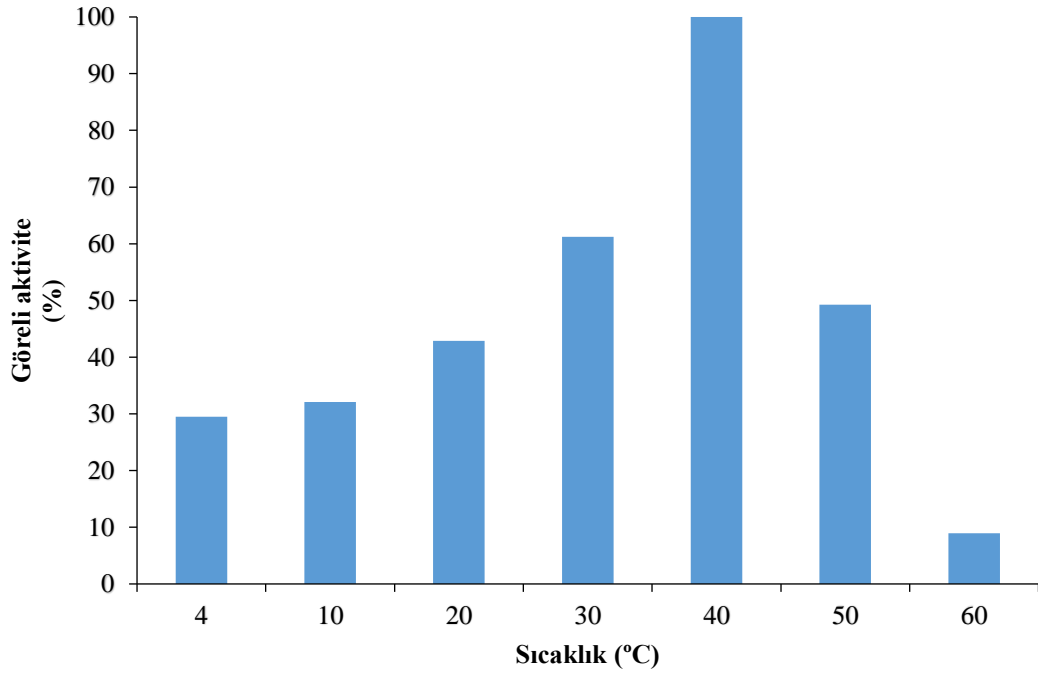
**Tablo 3** *O. tournefortii* tohum esterazına farklı sıcaklık değerlerinin etkisi

Sıcaklık (°C)	Ünite aktivite ( $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ )	Spesifik aktivite ( $\text{U.mg}^{-1}$ )	Görelî (%) spesifik aktivite
	Ort. $\pm$ S.H.	Ort. $\pm$ S.H.	
4	0,1143 $\pm$ 0,01a	0,515 $\pm$ 0,04a	29,5
10	0,1244 $\pm$ 0,04a	0,560 $\pm$ 0,02a	32,07
20	0,1664 $\pm$ 0,03ab	0,749 $\pm$ 0,11b	42,9
30	0,2373 $\pm$ 0,06b	1,069 $\pm$ 0,03c	61,23
40	0,3877 $\pm$ 0,02c	1,746 $\pm$ 0,07d	100
50	0,1910 $\pm$ 0,08a	0,860 $\pm$ 0,03e	49,26
60	0,0347 $\pm$ 0,04d	0,156 $\pm$ 0,02f	8,935

\*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Deneylerin yapıldığı tüpe ait protein miktarı 0,222 mg.ml<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Ort.  $\pm$  S.H. = Ortalama  $\pm$  Standart Hata



Şekil 5 Sıcaklığın *O. tournefortii* tohum esteraz aktivitesine etkisi.



Şekil 6 Sıcaklığın *O. tournefortii* tohum esteraz aktivitesine görelî etkisi.



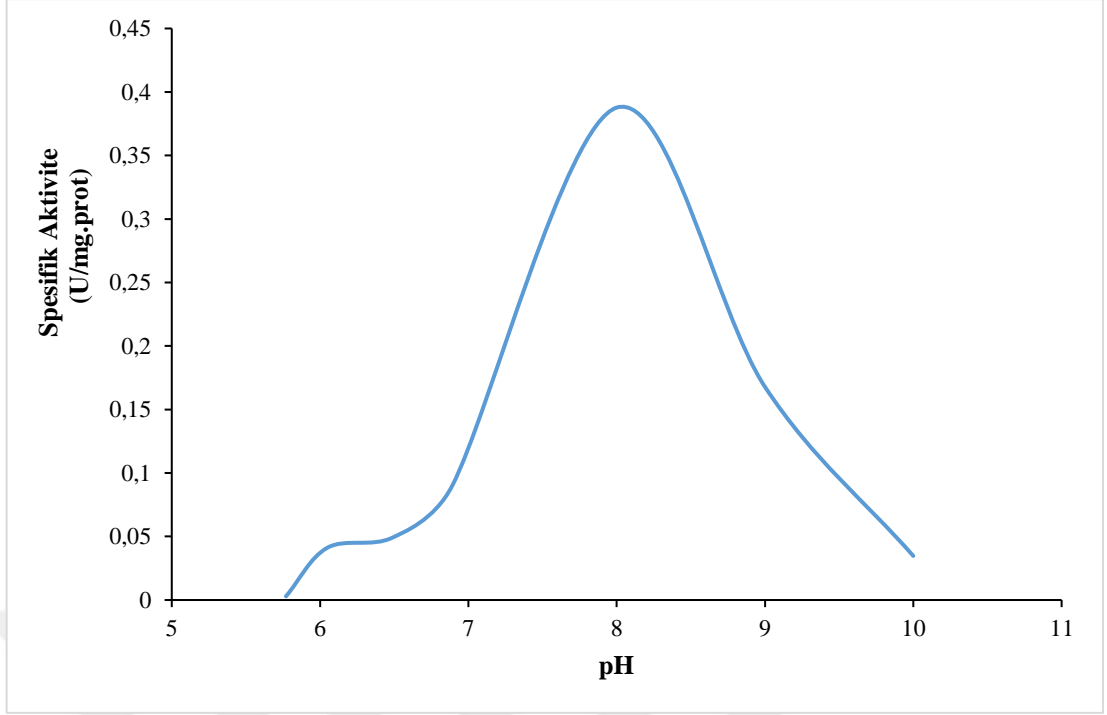
### 3.4 *O. tournefortii* Tohum Esterazına pH'ın Etkisi

*O. tournefortii* tohum esteraz aktivitesine pH'ın etkisi değerlendirilmiş ve deneysel çalışma bulguları ile alakalı tüm veriler Tablo 4 ve Şekil 7 ve 8'de verilmiştir. Buna göre pH'ın 5,7 olduğu noktada neredeyse yok denecek kadar az olan bir aktivite, pH değerinin 6 olmasıyla % 10 luk bir aktivite göstermiştir. pH'ın 6.9 olduğu noktadaki ölçümlerde 0.40 U/mg.prot'luk bir spesifik aktivite ve % 23'lük bir görelî aktivite olduğu belirlenmiştir. En yüksek aktivite pH'ın 8 olduğu noktada bulunmuş ve bu noktada spesifik aktivitesinin 1.74 U/mg.prot olduğu tespit edilmiştir. pH'ın 9 olduğu noktada aktivitesinin yaklaşık % 43'lük bir oranını koruyan enzimin pH'ın 10 olmasıyla birlikte ciddi bir aktivite kaybına uğradığı bulgusuna ulaşılmış ve bu noktada spesifik aktivite 0.15 U/mg.prot'lik bir değerle temsil edilmiştir.

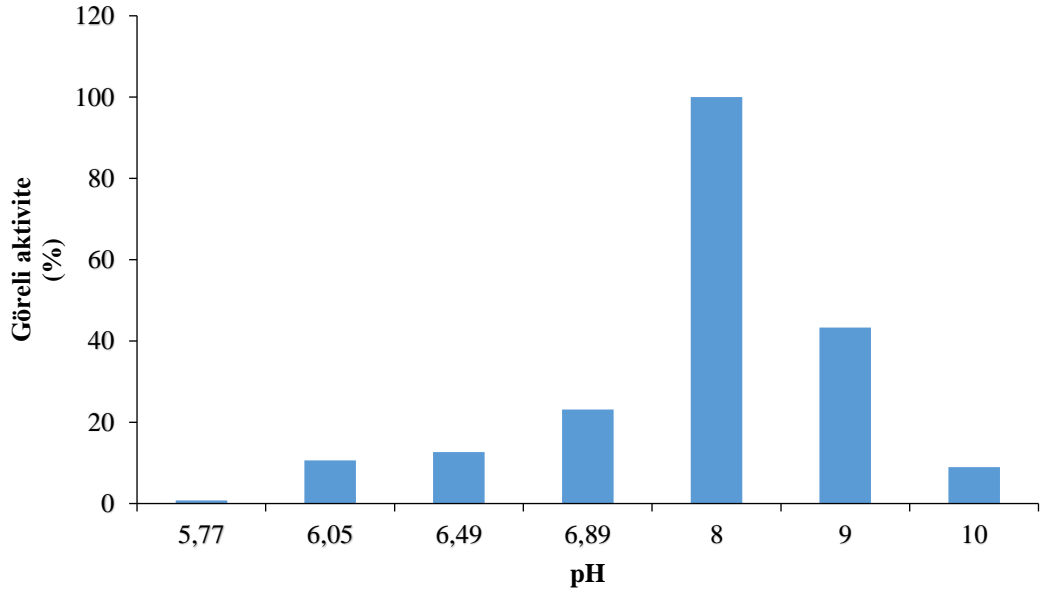
**Tablo 4** *O. tournefortii* tohum esterazına farklı pH değerlerinin etkisi

Tampon	pH	Aktivite	Spesifik Aktivite	Görelî (%)
		( $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ )	( $\text{U.mg}^{-1}$ )	Spesifik aktivite
		Ort. $\pm$ S.H.	Ort. $\pm$ S.H.	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,70	0,0029 $\pm$ 0,01a	0,0131 $\pm$ 0,04a	0,7480
	6,00	0,0412 $\pm$ 0,08b	0,1856 $\pm$ 0,05b	10,6268
	6,50	0,0492 $\pm$ 0,10b	0,2216 $\pm$ 0,04b	12,6902
	6,90	0,0897 $\pm$ 0,07c	0,4041 $\pm$ 0,03c	23,1364
Tris-HCl	8,00	0,3877 $\pm$ 0,03d	1,7464 $\pm$ 0,01d	100
	9,00	0,1678 $\pm$ 0,07e	0,7559 $\pm$ 0,03e	43,2809
	10,00	0,0347 $\pm$ 0,02b	0,1563 $\pm$ 0,09b	8,9502

\*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Deneilerin yapıldığı tüpe ait protein miktarı 0,222 mg.ml<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Ort.  $\pm$  S.H. = Ortalama  $\pm$  Standart Hata



Şekil 7 pH'ın *O. tournefortii* tohum esteraz aktivitesine etkisi.



Şekil 8 pH'ın *O. tournefortii* tohum esteraz aktivitesine göreli etkisi.

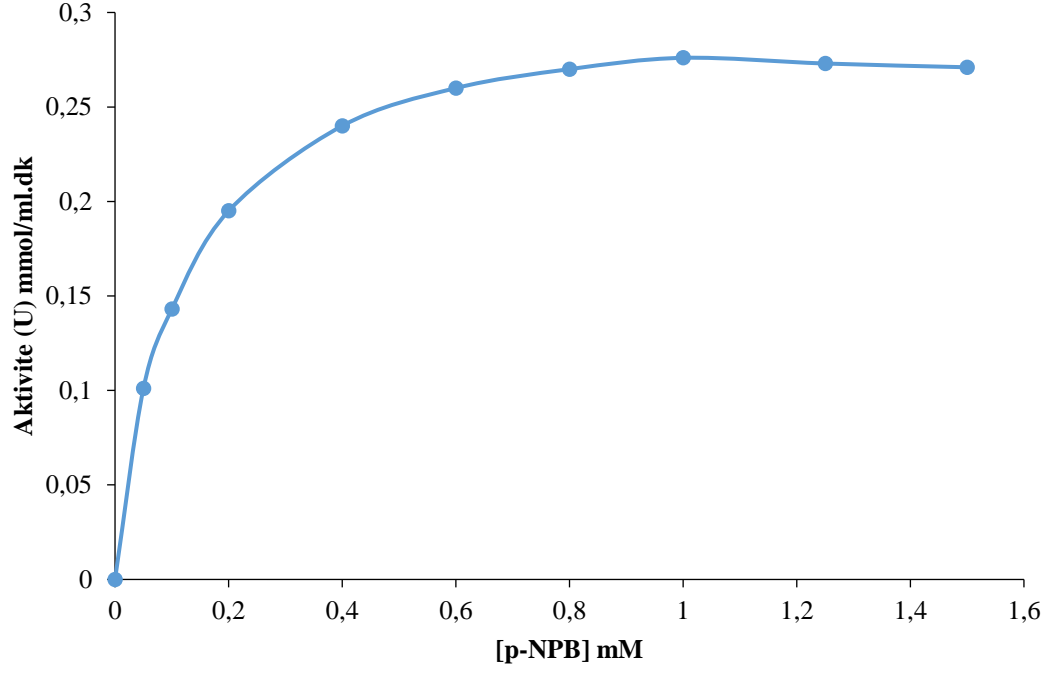
### 3.5 *O. tournefortii* Tohum Esterazına Substrat (p-NPB) Konsantrasyonunun Etkisi

*O. tournefortii* tohum esterazına substrat konsantrasyonunun etkisi substrat olarak p-NPB kullanıldığı 0,05 mM ile 1,5 mM aralığındaki konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir (Tablo 5). Buna göre, p-NPB miktarının 0,05 mM'dan 0,1 mM derişime çıkartılmasıyla 0,101  $\mu\text{mol.ml}^{-1}\text{dk}^{-1}$  olarak ölçülen aktivite değeri 0,143  $\mu\text{mol.ml}^{-1}\text{dk}^{-1}$ 'ya yükselmiştir. Substrat miktarının 0,2 mM ve 0,4 mM derişime çıkarılmasıyla da aktivitede artışlar saptanmıştır. Yine 0,8 mM, 1 mM ve 1,25 mM derişime yükseltelen substrat derişimlerinde de aktivitede artış saptanmıştır. Fakat substrat miktarı 0,6 mM ve 1,5 mM derişime yükseltince aktivitede azalma gözlenmiştir. İstatiksel olarak değerlendirildiğinde 1 mM ve 1,25 mM substrat derişimlerdeki artışın önemsiz olduğu gözlenmiştir. Tablo 5'teki veriler kullanılarak Lineweaver-Burk eğrisi ele edilmiştir. Bu eğriden  $V_{\text{max}}=0,2635 \mu\text{mol.ml}^{-1}\text{dk}^{-1}$  ve  $K_m=0,0808 \text{ mM}$  olarak saptanmıştır. Bu deneysel çalışmaya ait veriler Tablo 5, Şekil 9 ve Şekil 10'da sunulmuştur.

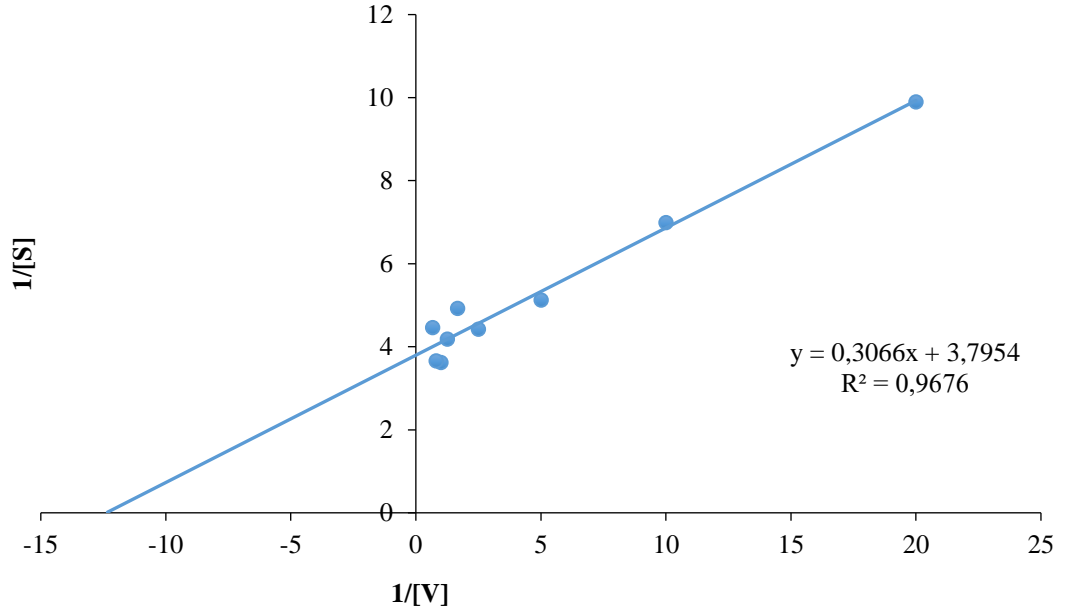
**Tablo 5** *O. tournefortii* tohum esterazına substrat (pNPB) konsantrasyonunun etkisi

[S] (mM)	V ( $\mu\text{mol.ml}^{-1}\text{dk}^{-1}$ )	1/V	1/[S]
	<b>Ort.±S.H.</b>		
0,05	0,101±0,07a	9,90	20
0,1	0,143±0,09a	6,99	10
0,2	0,195±0,04ab	5,13	5
0,4	0,226±0,04b	4,42	2,5
0,6	0,203±0,02b	4,93	1,7
0,8	0,239±0,01b	4,18	1,25
1	0,276±0,03b	3,62	1
1,25	0,273±0,03b	3,66	0,8
1,5	0,224±0,01b	4,46	0,67

\*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Ort.±S.H. = Ortalama ± Standart Hata



Şekil 9 Michaelis-Menten Grafiği.



Şekil 10 *O. tournefortii* tohum esterazının Lineweaver-Burk eğrisi.

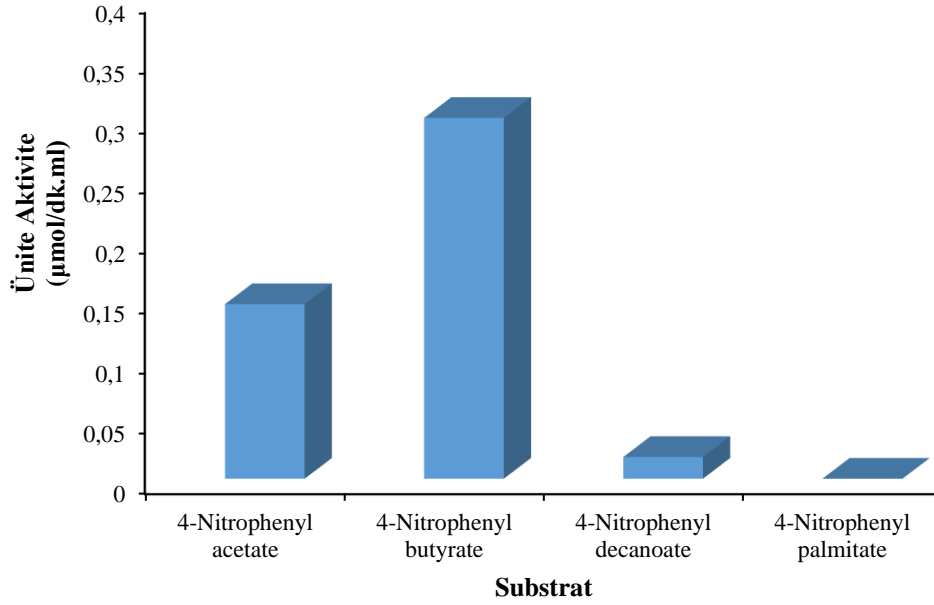
### 3.6 *O. tournefortii* Tohum Esterazına Substrat Zincir Uzunluğunun Etkisi

Tohum esterazına substrat zincir uzunluğunun etkisinin belirlenebilmesi için 4-Nitrophenyl acetate (p-NPA, C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>), 4-Nitrophenyl butyrate (p-NPB, C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>), 4-Nitrophenyl decanoate (p-NPD, C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>), 4-Nitrophenyl palmitate (p-NPP, C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>) olmak üzere dört farklı substrat kullanılmıştır. Kullanılan bu substratların esteraz enzim aktivitesi ölçümü sonucunda en yüksek aktivite p-NPB substratı ile 0,300 µmol/dk.ml olarak bulunmuştur. p-NPP ile yapılan ölçümde aktiviteye rastlanmazken, p-NPA ve p-NPD’de aktiviteler sırasıyla 0,145 µmol/dk.ml ve 0,018 µmol/dk.ml olarak ölçülmüştür. Bu çalışmaya ait veriler Tablo 6 ve Şekil 11’de verilmiştir.

**Tablo 6** *O. tournefortii* tohum esterazına substrat zincir uzunluğunun etkisi

Substrat	Ünite aktivite (µmol.ml <sup>-1</sup> .dk <sup>-1</sup> )	Spesifik aktivite (U/mg.prot)	Görelî aktivite (%)
	Ort.±S.H.		
4-nitrofenil asetat	0,145±0,01a	0,652a	48,3
4-nitrofenil bütirat	0,300±0,02b	1,351b	100
4- nitrofenil dekanolat	0,018±0,01c	0,081c	6
4-nitrofenil palmitat	0±0d	0d	0

\*Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Her satırda aynı harflerle belirlenen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Ort.±S.H. = Ortalama ± Standart Hata

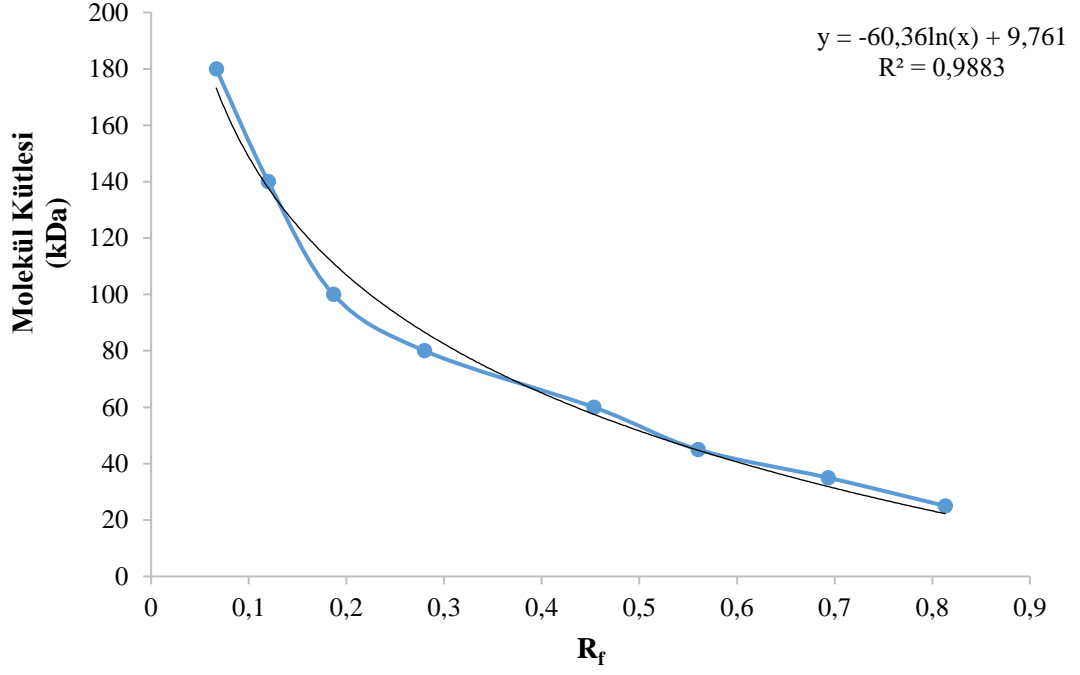


**Şekil 11** *O. tournefortii* tohum esterazına substrat zincir uzunluğunun etkisi.

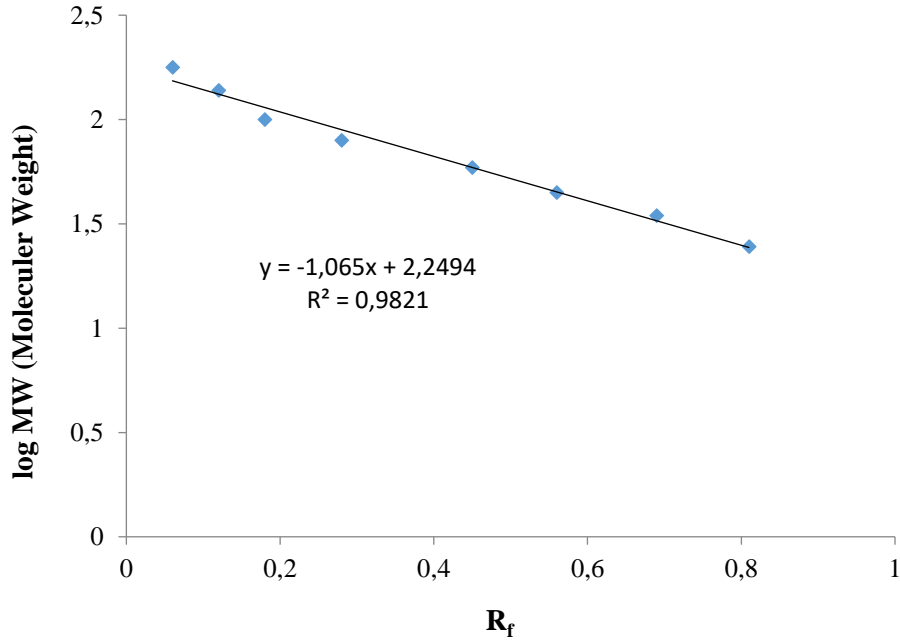
### 3.7 *O. tournefortii* Tohum Esterazı Elektroforetik Bulguları

*O. tournefortii* tohum esterazı enziminin Q sefaroze ve Sefakril S-200 HR ile saflaştırılmasını içeren temel basamaklarda, saflaştırmanın durumu ve aktivite bantlarının akıbeti Native-PAGE tekniği kullanılarak izlenmiştir. Ayrıca bu fraksiyonlar SDS-PAGE tekniğini takiben Coomassie ve gümüş boyama yapılarak var olan olası tüm protein bantları belirlenmeye çalışılmıştır.

Marker (M) ayracına ait jeldeki her bir protein bandının  $R_f$  değerleri ve molekül kütleleri Tablo 7'de verilmiştir. Tüm jelin boyu 7.5 cm olarak ölçülmüştür. Buna göre marker ve örneklerin jel üzerinde verdiği bantların aldığı yol da ölçülüp tüm jelin boyu ile hesaba katılarak  $R_f$  değerleri bulunmuştur. Markerda 1, 2, 3, 4 (kırmızı), 5, 6, 7, 8 (yeşil) olmak üzere 8 bant izlenebilmektedir. Bu bantlara ait  $R_f$  değerleri sırasıyla 0.066, 0.12, 0.186, 0.28, 0.453, 0.56, 0.693, 0.813 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 12 Markırın molekül kütlesi ve  $R_f$  değeri çalışmasına ait grafik.



Şekil 13 Molekül kütlesi ve  $R_f$  değerinin lineer gösterimi

Moleküler ayracının (marker) içerdiği protein bantlarına ait molekül kütleleri ve  $R_f$  değerleri ile çizilen grafik Şekil 12’de verilmiştir. Elde edilen logaritmik eğri denklemi  $y = -60,36 \ln(x) + 9,761$  ve  $R^2$  değeri ise 0.9883 olarak bulunmuştur. Nativ-PAGE yöntemiyle *O. tournefortii* tohum homojenat örneğinde üç esteraz aktivite bandı belirlenmiş ve bunlar için  $R_f$  değerleri 0.24, 0.44 ve 0.58 olarak kaydedilmiştir. Buna göre bu üç bandın molekül kütleleri sırasıyla 95, 59, ve 42 kDa olarak hesaplanmıştır. Q-sefaroze ve Sefakril S-200 HR kolon kromatografilerinin sonucunda  $R_f$  değerleri 0.44 ve 0.58 olan iki banda ait bir esterolitik aktivite gösteren fraksiyon elde edilmiş ve molekül kütlelerinin 59 ve 42 kDa olan bantlar olduğu tespit edilmiştir.

SDS-PAGE tekniğiyle elde edilen jel gerek Coomassie gerekse gümüş boyamayla boyandığında homojenatta oldukça yoğun bir protein kütlelerinin var olduğu izlenmiştir. Q-sefaroze kromatografisi ve Sefakril S-200 HR kromatografisi sonucunda protein bant içeriğinde azalma görülmesine rağmen, esteraz aktivitesi gösteren bantların her iki kromatografiden elde edilen örneklerde temsil edildiği bulunmuştur. Kromatografik saflaştırma işlemleri sonrasında elde edilen enzim preparatında 42 kDa ve 59 kDa molekül kütlelerine sahip bir esterolitik fraksiyon saflaştırılmış ve kinetik analizi gerçekleştirilmiştir.

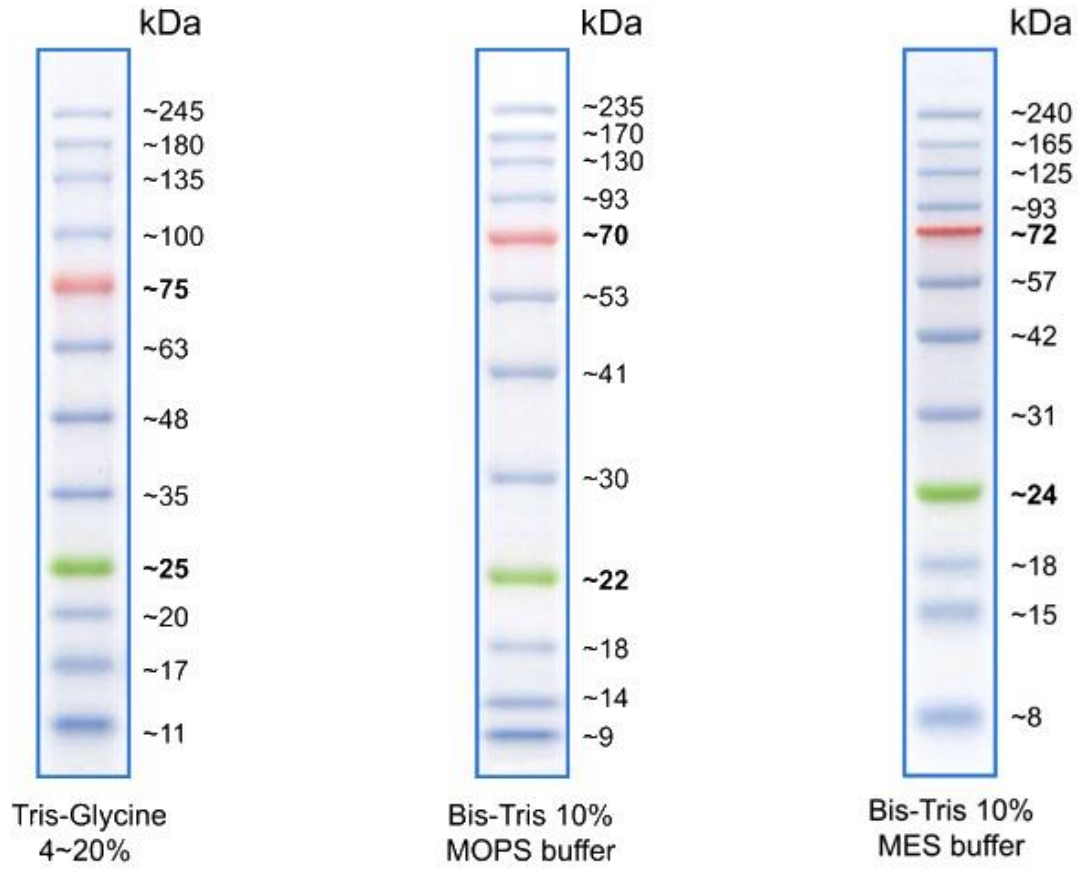


**Tablo 7** Markıra ait R<sub>f</sub> değerleri

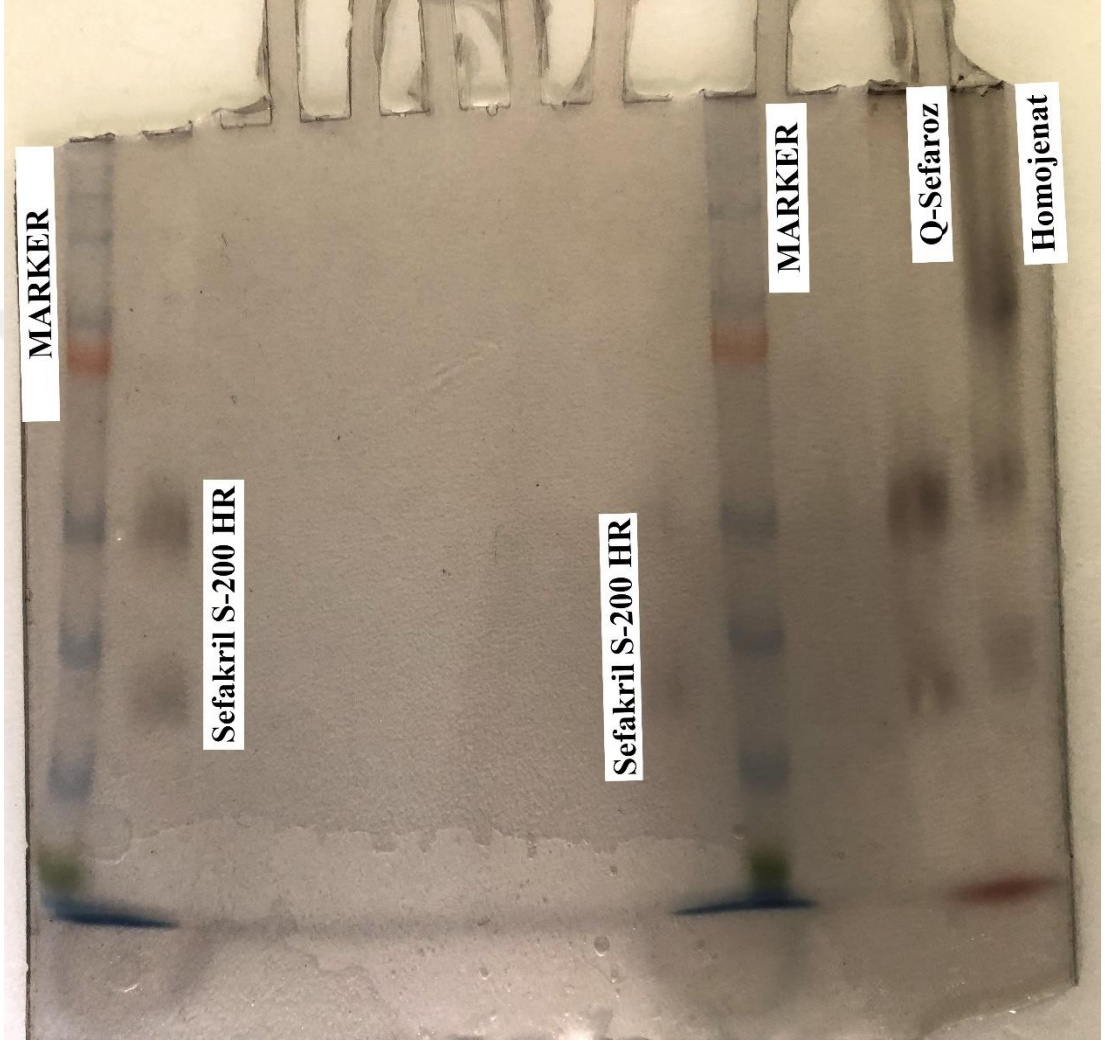
<b>Marker (Opti-Protein XL)</b>	<b>R<sub>f</sub></b>
1	0,066
2	0,12
3	0,186
Kırmızı	0,28
5	0,453
6	0,56
7	0,693
Yeşil	0,813

**Tablo 8** Homojenat, Q-sefarez ve Sefakril S-200 HR'ye ait R<sub>f</sub> değerleri

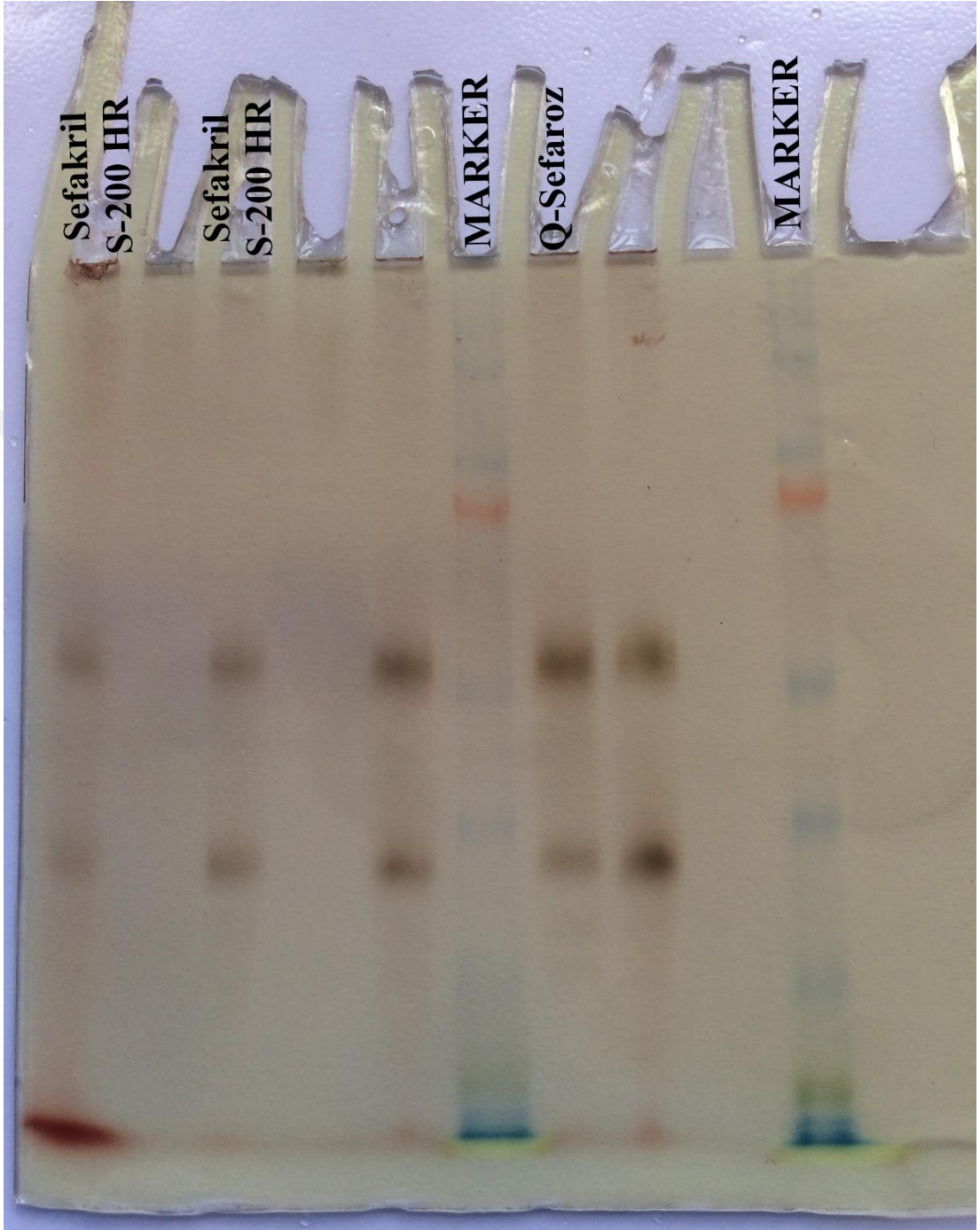
<b>Materyal</b>	<b>R<sub>f</sub></b>
Homojenat	0,24-0,44-0,58
Esteraz Bant1 (E1)	0,44
Esteraz Bant2 (E2)	0,58



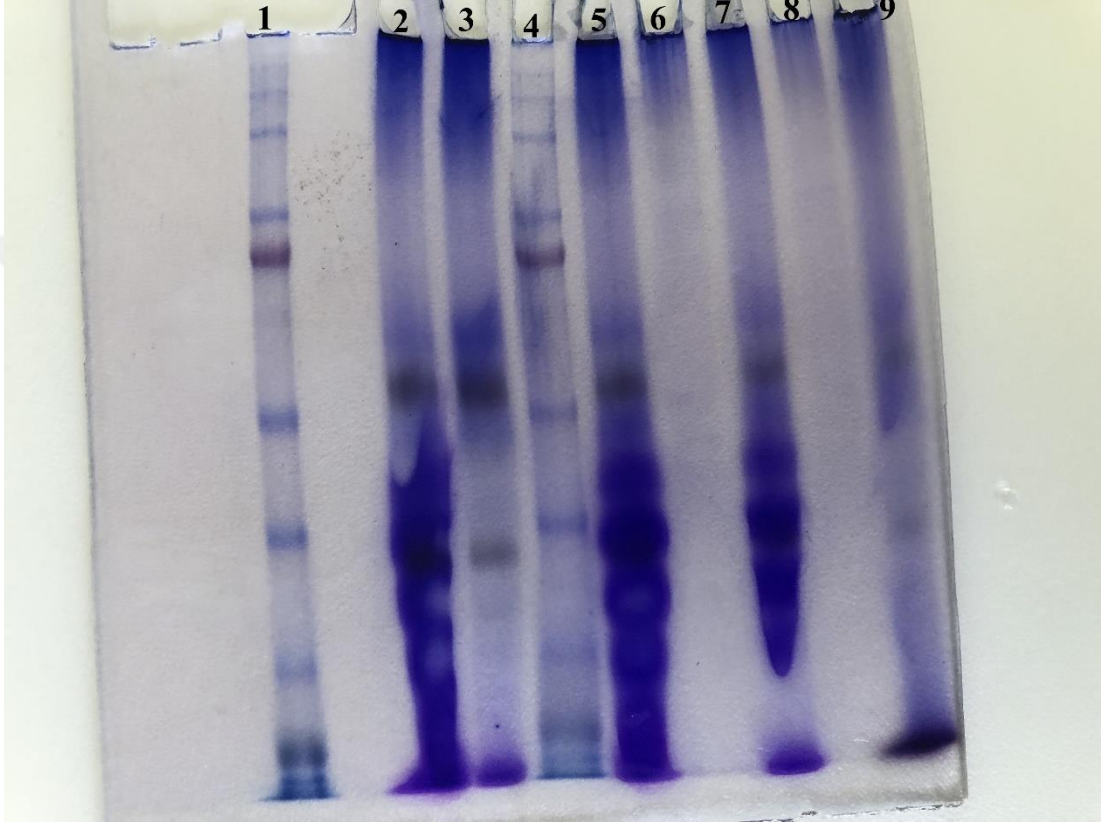
Şekil 14 Opti-Protein XL Marker, bantlara karşılık gelen molekül kütleleri .



**Şekil 15** Homojenat, Q-Sefaroz anyon değişim ve Sefakril S-200 HR kromatografilerine ait Native-PAGE jel görüntüsü



**Şekil 16** Jel görüntüsü



**Şekil 17** SDS-PAGE jel görüntüsü (1 ve 4 Marker, 2,5 ve 7 Homojenat, 3 ve 9 Q-Sepharoz anyon değişim, 6 ve 8 Sefakril S-200 HR)

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüz enzim endüstrisi modern biyoteknolojik yaklaşımların bir sonucu olup, enzimlerin dünya marketindeki katkı payının giderek arttığı bildirilmektedir. Enzim endüstrisinin büyük bir kısmını ise birçok süreçte çok yönlü kullanımları mümkün olan lipolitik enzimler (özellikle lipazlar) oluşturmaktadır. Bu alanda özellikle mikrobiyal enzimlerin oldukça kullanışlı olmasına rağmen, endüstriyel ölçekli büyük fermenterlerin kullanımı veya ürün formülasyon ekleri gibi bileşenlerin süreçlere dahil edilmesi fiyat artımına neden olduğu için araştırmacıların farklı biyolojik kaynaklara yönelmelerine neden olmuştur. Bu bağlamda, bitkisel kaynaklı lipolitik enzimlerin literatüre katkısının çok az olduğu bildirilmektedir. Birçok bitki kısmının yüksek lipit ve fenolik içeriğe sahip olması gibi özelliklere bağlı olarak, lipolitik enzimlerin ekstraksiyon sürecinde kararsız olduğu ve hatta denature olabileceği ve böylelikle saflaştırma adımlarının zorlaştığı öne sürülmektedir (Seth ve ark., 2014). Yapmış olduğumuz bu yüksek lisans tez çalışmasında *O. tournefortii*'nin germine olmamış, başka bir ifadeyle dormant tohum örneklerinden esteraz aktivitesi gösteren bir fraksiyonun iyon değişim kromatografisi (Q sefaroze) ve jel filtrasyon kromatografisi (sefakril S 200 HR) tekniklerinin kombinasyonu kullanılarak kısmi olarak saflaştırılması ve elde edilen esteraz fraksiyonunun karakterizasyonu yerine getirilmiştir.

Huang (1984) ve Ncube ve ark. (1995) germine olmamış (dormant) kuru bitki tohumlarında lipolitik aktivitenin genellikle olmadığını ancak germinasyon sonrasında *de novo* olarak sentezlendiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, dormansi durumunda olup, tohumda *in vivo* olarak göreceli az bir lipolitik aktiviteye sahip olmasına rağmen, *in vitro* da yüksek aktivite sergileyen bitki tohumları rapor edilmiştir. Bu durum, tohum sağlam durumda kaldıkça enzimin inaktif kaldığı ancak tohum yada depo koşullarında ufak bir değişimin muhtemelen aktiviteyi başlatacağı yönünde açıklanmaktadır (Huang, 1984, Polizelli ve ark., 2008). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, Ülkemize ait endemik bir yabancı bitki türü olan *O. tournefortii*'nin dormant tohumlarından hazırlanan homojenatların aktivite sergilediği gerek spektrofotometrik, gerekse Nativ-PAGE (doğal jel elektroforez) metotları kullanılarak gösterilmiştir.

Bitki dokularındaki lipolitik enzimlerin gerek aktivitelerinin belirlenmesi gerekse saflaştırma çalışmalarının diğer canlı gruplarına kıyasla nadir olduğu literatürde belir-

tilmekte olup, bu çalışmanın giriş kısımlarında da vurgulanmıştır. Farklı bitki dokularından lipolitik enzimlerin tohumlarda yağdan arındırma, amonyum sülfat çöktürme gibi orijinal homojenattan daha fazla aktiviteyi içeren ön saflaştırma metotları yoluyla kısmi saflıkta elde edilen çalışmalar mevcut olduğu gibi, kromatografik fraksiyonlama yoluyla saflaştırma çalışmalarının olduğu görülmektedir. Ayrıca, bitkilerde saflaştırma yapılacak materyalden lipitlerin giderilmesinin daha çok esterifikasyon sonrası analizlerde önemli olduğu rapor edilmiştir. (Mounguengui ve ark., 2013). Yapmış olduğumuz tez çalışmasında tohum örneklerinin kütlece az ulaşılabilir olması nedeniyle tohumlarda çeşitli solventler kullanılarak yağ uzaklaştırılması gibi bir metot uygulanmamıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi denenmesine rağmen, amonyum sülfat ile elde edilen çökeltilerde orijinal homojenattan daha fazla aktiviteye rastlanması nedeniyle vazgeçilmiştir.

Kromatografik teknikler hemen hemen tüm bitki lipolitik enzim saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır. Bununla beraber, en fazla kullanılan kromatografik tekniklerin iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi olduğu rapor edilmiştir. Dietilaminoetil (DEAE) selülozik iyon değiştiriciler *Solanum tuberosum*, *Fagopyrum esculentum* ve *Ricinus communis* gibi bitkilerden lipaz saflaştırılmasında kullanılmıştır (Suzuki ve ark., 2004; Mounguengui ve ark., 2013). Bitkisel doku lipazlarının hidrofobik etkileşim kromatografisi yoluyla saflaştırılması düşünüldüğünde, iyon değişim kromatografisinden daha avantajlı olduğu belirtilmektedir. Şöyle ki; Ncube ve ark. (1993) turp (*Brassica napus*) bitkisinden, Bhardwaj ve ark. (2001) pirinç (*Oryza sativa*) bitkisinden lipazları hidrofobik etkileşim kromatografisi yoluyla saflaştırmış ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yine Ncube ve ark. (1993)'ın turp bitkisinde yapmış oldukları lipaz saflaştırma çalışmasında dört kromatografik adım kullanılmış ve bitki dokularından saflaştırmalarında tek adımlı saflaştırma süreçlerinin yüksek saflık derecesine olanak sağlamadığı, bu nedenden dolayı birkaç kromatografik tekniğin kombinasyonunun uygulanması gerektiği bildirilmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, homojenatta 0.192  $\mu\text{mol/dk.mg prot.}'\text{luk}$  bir spesifik aktivite belirlenmiştir. Q sefaroze anyon değişim kromatografisi sonucunda spesifik aktivitenin 0.444  $\mu\text{mol/dk.mg prot}$  olduğu ve bu kromatografik adımın % 4.69'lük verim ile 2.30 katlık bir saflaştırmaya olanak sağladığı belirlenmiştir. Bu kromatografik adımı takiben uygulanan jel filtrasyon kromatografisi metodu ile (Sefakril S 200



HR) spesifik aktivitenin 1.361  $\mu\text{mol/dk.mg prot}$ , verimin % 0.815 ve elde edilen enzim preparatının 7.08 kat saflıkta olduğu belirlenmiştir.

Çeşitli bitki familyalarına ait türlerden farklı parametrelerdeki saflıklarda elde edilmiş lipolitik enzimlere ait veriler ulaşılabilir. Buna göre, Tuter ve ark (2003) Ranunculaceae familyasından *Nigella sativa* tohum lipazını, yağdan arındırma ve % 35 doygunluktaki amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında, DEAE iyon değişim kromatografisi yoluyla 11 kat ve 156.7 U/mg protein spesifik aktiviteyle kısmi olarak saflaştırmışlar ve transesterifikasyon çalışmalarında kullanımını değerlendirmişlerdir.

Yeşiloğlu ve Başkurt (2008) badem (*Amygdalus communis*) bitkisinin tohumlarında amonyum sülfat çöktürme ve sonrasında diyaliz yöntemiyle kısmi saflıkta bir lipaz elde etmişlerdir. Elde edilen enzim preparatının yaklaşık olarak beş katlık bir saflıkta olduğunu bildirmişlerdir.

LI ve ark. (2009) soya fasulyesi tohumuna ait ham doku homojenatının 0.043 U/mg.prot'lik bir spesifik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar saflaştırma amacıyla amonyum sülfat çöktürmesi ile 0.166 U/mg.prot'lik bir spesifik aktivite, tuz çöktürmesini takiben ultra filtrasyon ve DEAE-32 iyon değişim kromatografilerinin kullanarak sırasıyla 0.205 U/mg ve 3.93 U/mg'lık bir spesifik aktiviteye sahip olan bir enzim preparatı hazırlamışlardır. Bu çalışmada elde edilen verim % 8.18 ve saflaştırma katsayısı 91.58 olarak belirlenmiş ve çalışmamızda elde edilen verilerden daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Gadge ve ark. (2011) *Glycine max* (soya fasulyesi) bitkisinin germine olan tohumlarından aseton çöktürmesi ve takibinde amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemleriyle kısmi saflıkta bir lipaz preparasyonu elde etmişler ve dört farklı germine olan bitki tohumunun aktiviteleri ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada elde edilen saflaştırma katsayısı, verim gibi parametreler ulaşılabilir değildir. Ancak germine olan tohumlarda en yüksek lipolitik aktivitenin  $10.37 \times 10^{-3}$  U/mL/min olarak *G. max*' te olduğunu belirlemişlerdir. Germine olan tohumlarında lipolitik aktiviteleri değerlendirilen diğer bitkilerdeki aktivite değerlerinin  $6.25 \times 10^{-3}$  (*Guizotia abyssinica*),  $4.37 \times 10^{-3}$  (*Arachis hypogaea*),  $4.12 \times 10^{-3}$  (*Pisum sativum*) ve  $7.25 \times 10^{-3}$  (*Recimus communis*) olduğu belirlenmiştir. Bu aktivite değerlerinin çalışmamızda elde edilen aktivite değerlerinden çok düşük olduğu görülmektedir.



Son dönemlerde bitki tohum esterazlarının saflaştırılmasında anyon değişim kromatografisinden ziyade katyonik dolgu maddelerinin kullanıldığı çalışmalarla başarılı saflaştırma çalışmalarının yerine getirildiği görülmektedir. Bu bağlamda, Subramani ve ark. (2012) *Jatropha curcas* bitkisinin tohumlarından amonyum sülfat çöktürmesi, CM-selüloz katyon değişim kromatografisi, sefadeks G 100 jel filtrasyon kromatografisi ve bu bölümün ilerleyen kısımlarında önemli bir saflaştırma stratejisi olarak değineceğimiz preparatif SDS-PAGE yöntemlerini kullanarak 2.01 µmol/min/g toplam aktivite, 0.6 IU/mg spesifik aktivite, 18 kat saflık ve % 17.6'lık bir verime sahip olan bir enzim preparasyonu hazırlayabilmişlerdir. Yine, baklagillerden bir bitki olan *Mucuna pruriens*'in tohumlarında 0.0486 µmol/min/mg.prot'lik bir spesifik aktivite ile temsil edilen bir esterolitik aktiviteden başlamak suretiyle, % 40-80 amonyum sülfat çöktürmesi, CM-selüloz katyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve sonrasında preparatif SDS-PAGE metotları ile 2.48 µmol/min/mg.prot'lik bir spesifik aktivite, 51 kat saflık, % 9.9'luk verime sahip bir esterolitik fraksiyonu saflaştırmışlardır (Chandrashekharaiyah ve ark., 2011).

Yukarıdaki paragrafta değinilen çalışmalara benzer olarak, Bhavit ve ark. (2014)'ün çalışması bitki tohum esterazları üzerine yapılan önemli bir saflaştırma çalışması olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada, *Caesalpinia mimosoides* bitkisinin tohumlarında 90 nmol/min toplam aktivite ve 1.123 IU/mg'lık spesifik aktiviteyle temsil edilen saflaştırma parametrelerinden başlamak suretiyle % 30-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesiyle toplam aktivitesi 172 nmol/min, spesifik aktivitesinin ise 0.32 IU/mg olan 2.6 kat saflıktaki bir enzim preparatı hazırlamışlardır. Bu çalışmada, amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen toplam aktivitenin homojenatdaki toplam aktiviteden yüksek olması ilginçtir. Ayrıca araştırmacılar CM-selüloz kolon dolgu maddesi ile katyon değişim kromatografisini kullanarak, sonuçta 1.14 IU/mg spesifik aktivite, 9.26 kat saflık ve % 9.01 verim ile bir esterazı saflaştırmayı başarmışlardır. Burada çeşitli bitkisel tohumlardan değinilen elde edilen bu veriler çalışmamızda elde edilen saflaştırma parametreleriyle karşılaştırıldıklarında benzerlik ve farklılıkların olduğu açıktır. Ancak, yerine getirilen tüm bu saflaştırma çalışmalarının benzer olarak ortaya koyduğu sonuç, bitkilerde gerek yüksek saflık gerekse yüksek verim ile ifade edilebilecek bir enzim preparasyonunun hazırlanamadığıdır.

Yerine getirilen bu tez çalışmasında *O. tournefortii* tohum esterazının 40 °C ve pH'ın 8 olduğu noktada optimum aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen enzim

preparatının Lineweaver Burk eğrisinden maksimum hızının ( $V_{max}$ )  $0,2635 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$  ve  $K_m$  değerinin ise  $0,0808 \text{ mM}$  olduğu belirlenmiştir. Yine elde edilen enzim preparatının farklı karbon zincir uzunluğuna (2-16 karbon uzunluklu) sahip substratlar değerlendirildiğinde, 4 karbon atomu uzunluğa sahip pNPB'a karşı en yüksek aktiviteyi sergilediği belirlenmiştir. Literatür bildirimleri incelendiğinde genel olarak lipolitik enzimlerin pH'nın 8 ve 9 olduğu aralıkta ve sıcaklığın ise  $30-40 \text{ }^\circ\text{C}$  olduğu aralıklarda en yüksek aktiviteyi sergiledikleri görülebilir.

Substrat olarak 1 naftil asetat ( $\alpha$ -naftil asetat)'ın kullanıldığı ve buğdaydan (wheat flour) elde edilen bir esterolitik enzim preparasyonunun optimum sıcaklığının  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  olduğu ve 120 dakika  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'da aktivitesini koruyabildiği gözlenmiştir. Bu çalışmada enzim için optimum pH'nın ise 6.5 olduğu belirlenmiştir (Hou ve ark., 2012).

Literatürde ilginç sonuçları bildiren çalışmalardan birisi olarak, soya fasulyesi (*Glycine max*) bitkisinde yerine getirilen bir çalışmada, esteraz aktivitesinin bu bitkinin germine olmuş ( $2.90 \text{ U/mg}$ ) ve olmamış ( $1.70 \text{ U/mg}$ ) tohumlarında mevcut olduğunu bildirmiştir. Bu veri germine olmamış tohumlarda da esterolitik aktivitenin bulunabileceğini belirten yeni bir çalışma olması açısından önemlidir. Ayrıca ham doku homojenatlarında yerine getirilen biyokimyasal çalışmalardan elde edildiğine göre, soya fasulyesi tohumundaki esterolitik enzimin kısa zincirli yağ asitlerini daha uygun bir substrat olarak tercih ettiği, optimum pH'nın 8 ve sıcaklığın ise  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  olduğu belirlenmiştir (Barros ve Macedo, 2011). Bu veriler yukarıda çalışmamızda elde edilen verilerle sıcaklık ve substrat zincir uzunluğu çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir.

*G. max*'in germine olan tohumlarında yerine getirilen bir başka çalışmada ise, optimum lipaz aktivitesinin  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  ve pH 8'de olduğu belirlenmiştir. Zeytin yağını substrat olarak kullanan bu biyokimyasal karakterizasyon çalışmasında  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $7.67 \text{ mg}$  ve  $0.0125 \mu\text{m} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  olarak bulunmuştur (Gadge ve ark., 2011).

Polizelli ve ark. (2013) *Pachira aquatica* bitkisinin tohum ekstraktlarından elde ettikleri lipaz aktivitesinin biyokimyasal karakterizasyonunu yerine getirmişler ve optimum sıcaklığın  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , optimum pH'nın ise 8 ile 9 arasında olduğu ancak pH'nın 9 olduğu noktada en yüksek aktivitenin izlendiğini bildirmişlerdir.

Germine olan *Tamarindus indica* tohumlarının esteraz aktiviteleri ham doku homojenatlarında değerlendirilmiştir. Buna göre;  $37$  ve  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklık aralığında yüksek

aktivite sergileyen enzimin optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiş ve karalı olarak aktivitesini 40 °C’de koruyabildiği bildirilmiştir. Ayrıca, 60 °C’de aktivitesinin % 30’unun, 70 °C’de ise aktivitesinin % 90 oranında düştüğü izlenmiştir. Bu çalışma optimum pH’ı ise 7 ile 7.5 aralığında bulmuştur. Km değeri ise 1 naftil asetat substrat olarak kullanıldığında 19.23 µM olduğu bulunmuştur (Kantharaju ve Siddalinga Murthy, 2014).

Yaptığımız bu çalışma ile, *O. tournefortii*’nin germine olmamış tohum esterazlarının 1 naftil asetat substrat olarak kullanılarak yerine getirilen Native-PAGE çalışmaları, molekül kütleleri 95 kDa, 59 kDa ve 42 kDa olan üç esterolitik bandın olduğunu bildirmektedir. Yapılan saflaştırma çalışmaları sonucunda 59 ve 42 kDa molekül kütleli iki esteraz bandının olduğu bir esterolitik fraksiyon elde edilmiştir.

Fahmy ve ark. (2008) *Cucurbita pepo* (kabak) bitkisinde altı esteraz bandı tanımlamışlar, anyon değişim ve jel filtrasyon kromatografilerini kullanarak saflaştırdıkları iki esteraz bandından E1 olarak isimlendirilen bandın 47 kDa ve E2 olarak isimlendirilen bandın ise 66 kDa olduğunu SDS-PAGE yöntemiyle belirlemişlerdir. Yine, bu çalışmada yerine getirilen kinetik çalışmalardan belirlendiği üzere, nitrofenil ester substratların artan karbon zincir uzunluğuna bağlı olarak enzimatik aktivitelerde düşüş belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada E1 ve E2 bantlarının Km değerleri sırasıyla 1.22 ve 1.56 mM, pH optimumları 9 ve 8, optimum sıcaklıkları ise 55 °C ve 50 °C olarak belirlenmiştir.

Bitkilerde yapılan saflaştırma çalışmalarında kullanılan kromatografik teknikler ile saflaştırma örneklerinin çok az olduğu buraya kadar anlatılanlardan çıkarsanabilir. Günümüze değin yapılan başarılı saflaştırma çalışmalarının kromatografik yöntemleri takiben gerçekleştirilen elektroforez bandının kesilip alınması ve aktivitesinin kullanılarak saflaştırma işleminin gerçekleştirildiği preparatif PAGE yönteminin oldukça kullanışlı olduğu görülmektedir. Bu metot yoluyla elde edilen enzimlerin molekül kütlelerine bakıldığında *M. pruriens* tohumundan elde edilen iki farklı esterazın 21 kDa ve 30.2 kDa (Chandrashekharaiyah ve ark., 2011) *J. curcas* tohumunda 31 kDa (Subramani ve ark., 2012), *C. mimosoides* tohumunda 20 kDa (Bhavith ve ark., 2014) olduğu bulunmuştur.

Parasa ve ark. (2018) *Sesbania grandiflora*’nın yaprak ve tohum esterazları üzerine yapmış oldukları çalışmada, tohum ekstraktlarında daha koyu boyanan ve momomer

olarak belirttikleri 28 kDa moleköl kütleli banda ilaveten, 2 adet daha zayıf boyanan ve muhtemelen dimer olduğunu belirttikleri 25 kDa ile 22 kDa moleköl kütleli toplamda üç aktivite bandının olduğunu belirlemişlerdir. Bu bitki türü ve yukarıda son dönemlerde yerine getirilen çalışmalara ait esterolitik bantların çalışmamızda kullanılan *O. tournefortii* tohumundakinden daha düşük moleköl kütleline sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, farklı türlerin farklı esterazlara ev sahipliği yapabileceğinin bir göstergesi olabilir. Buna ilaveten, yukarıda bahsedilen çalışmalar daha çok katyon değişim kromatografisinden elde edilen kesitlerden olması nedeniyle, kullanılan kromatografik tekniklerinde farklı moleköl kütleli esterolitik bantların aydınlatılmasına olanak sağladığı anlaşılmaktadır.

Sonuç ve çıkarsama olarak, anyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografileri ile 2 farklı esteraz bandına sahip bir esterolitik fraksiyon çalışmamız sonucunda elde edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlardan, Ülkemiz için endemik bir tür olan *O. tournefortii* bitkisinin tohumunun moleköl kütleli yüksek üç esterolitik banda ev sahipliği yaptığı ve genel özelliklerinin diğer literatürde belirtilen esterolitik enzim özelliklerine büyük oranda benzediği anlaşılmaktadır.

## 5. KAYNAKÇA

1. **Antosiewicz, J., McCammon, J. A., Gilson, M. K.** (1994). Prediction of pH-dependent properties of proteins. *Journal of molecular biology*, 238(3), 415-436.
2. **Araújo, C. R. M., Santos, V. D. A., Gonsalves, A. A.** (2016). Acetilcolinesterase-AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Revista Virtual de Química*, 8(6), 1818-1834.
3. **Avcı, S., ve Kaya, M. D.** (2013). Seed and germination characteristics of wild *Onobrychis taxa* in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(5), 555-560.
4. **Barros, M., Fleuri, L. F., Macedo, G. A.** (2010). Seed lipases: sources, applications and properties-a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(1), 15-29.
5. **Bhardwaj, K., Raju, A., Rajasekharan, R.** (2001). Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*, 127(4), 1728-1738.
6. **Bhavith, K. P., Swamy, M. N., Swamy, N. R., Chandrashekharaiyah, K. S.** (2014). Purification and characterization of esterase from the seeds of *Caesalpinia mimosoides*. *Journal of Experimental Biology*, 2, 6.
7. **Bollag, D. M., Edelstein, S. J., Rozycki, M. D.** (1996). *Proteins methods* (No. 547.96 BOL).
8. **Bornscheuer, U. T.** (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*, 26(1), 73-81.
9. **Bülöw, L., ve Mosbach, K.** (1987). The expression in *E. coli* of a polymeric gene coding for an esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. *FEBS letters*, 210(2), 147-152.
10. **Caro, Y., Villeneuve, P., Pina, M., Reynes, M., Graille, J.** (2000). Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(4), 349-354.
11. **Carrière, F., Withers-Martinez, C., van Tilbeurgh, H., Roussel, A., Cambilau, C., Verger, R.** (1998). Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1376(3), 417-432.
12. **Carvalho, V. M. D., Marques, R. M., Lapenta, A. S., Machado, M. D. F. P.** (2003). Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg.(Apocynaceae). *Genetics and molecular biology*, 26(2), 195-198.

13. **Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J. P., Comeau, L. C., Sarda, L.** (2002). Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids*, 37(7), 653-662.
14. **Chandrasekaran, G., Kim, G. J., Shin, H. J.** (2011). Purification and characterisation of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom, *Sparassis crispa*. *Food chemistry*, 124(4), 1376-1381.
15. **Chandrashekharaiyah, K. S., Swamy, N. R., Murthy, K. S.** (2011). Carboxylesterases from the seeds of an underutilized legume, *Mucuna pruriens*; isolation, purification and characterization. *Phytochemistry*, 72(18), 2267-2274.
16. **Cherif, S., Fendri, A., Miled, N., Trabelsi, H., Mejdoub, H., Gargouri, Y.** (2007). Crab digestive lipase acting at high temperature: purification and biochemical characterization. *Biochimie*, 89(8), 1012-1018.
17. **Cherif, S., ve Gargouri, Y.** (2010). An organic-solvent-tolerant esterase from turkey pharyngeal tissue. *Bioresource technology*, 101(10), 3732-3736.
18. **Colak, A., Camedan, Y., Faiz, O., Sesli, E., Kolcuoğlu, Y.** (2009). An esterolytic activity from a wild edible mushroom, *Lycoperdon perlatum*. *Journal of food biochemistry*, 33(4), 482-499.
19. **de Araujo, M. C., Assis, C. R. D., Silva, L. C., Machado, D. C., Silva, K. C. C., Lima, A. V. A., de Oliveira, M. B. M.** (2016). Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. *Aquatic toxicology*, 177, 182-189.
20. **de Barros, M., ve Macedo, G. A.** (2011). Biochemical characterization of esterase from soybean (*Glycine max L.*). *Food Science and Biotechnology*, 20(5), 1195.
21. **De Santi, C., Leiros, H. K. S., Di Scala, A., de Pascale, D., Altermark, B., Willassen, N. P.** (2016). Biochemical characterization and structural analysis of a new cold-active and salt-tolerant esterase from the marine bacterium *Thalassospira* sp. *Extremophiles*, 20(3), 323-336.
22. **de Souza, P. R., de Souza, K. S., de Assis, C. R. D., de Araújo, M. C., Silva, K. C. C., da Silva, J. D. F. X., de Souza, B. R.** (2018). Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. *Aquatic Toxicology*, 197, 109-121.
23. **Degrassi, G., Uotila, L., Klima, R., Venturi, V.** (1999). Purification and Properties of an Esterase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Identification of the Encoding Gene. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3470-3472.
24. **Dubey, J. P., Venturini, L., Venturini, M. C., Speer, C. A.** (2000). Isolation of *Sarcocystis speeri* Parasite from the South American Opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. *Journal of Parasitology*, 86(1), 160-163.

25. **Duncan, D. B.** (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11(1), 1-42.
26. **Ejedegba, B. O., Onyeneke, E. C., Oviasogie, P. O.** (2007). Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocos nucifera linn*) seed under different nutrient treatments. *African Journal of Biotechnology*, 6(6).
27. **El-Kouhen, K., Blangy, S., Ortiz, E., Gardies, A. M., Ferté, N., Arondel, V.** (2005). Identification and characterization of a triacylglycerol lipase in *Arabidopsis* homologous to mammalian acid lipases. *FEBS letters*, 579(27), 6067-6073.
28. **Fahmy, A. S., Abo-Zeid, A. Z., Mohamed, T. M., Ghanem, H. M., Borai, I. H., Mohamed, S. A.** (2008). Characterization of esterases from *Cucurbita pepo* cv. "Eskandrani". *Bioresource technology*, 99(2), 437-443.
29. **Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T., Petersen, S. B.** (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie*, 82(11), 1033-1041.
30. **Fritsch, C., Jansch, A., Ehrmann, M. A., Toelstede, S., Vogel, R. F.** (2017). Characterization of cinnamoyl esterases from different *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Current microbiology*, 74(2), 247-256.
31. **Gadge, P. P., Madhikar, S. D., Yewle, J. N., Jadhav, U. U., Chougale, A. D., Zambare, V. P., Padul, M. V.** (2011). Biochemical studies of lipase from germinating oil seeds (*Glycine max*). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(3), 141-145.
32. **Gao, R., Feng, Y., Ishikawa, K., Ishida, H., Ando, S., Kosugi, Y., Cao, S.** (2003). Cloning, purification and properties of a hyperthermophilic esterase from archaeon *Aeropyrum pernix K1*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 24, 1-8.
33. **Görgün, S., ve Akpınar, M. A.** (2012). Purification and characterization of lipase from the liver of carp, *Cyprinus carpio L.*(1758), living in Lake Tödürge (Sivas, Türkiye). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(2).
34. **Görgün, S., ve Zengin, G.** (2015). Determination of Fatty Acid Profiles and Esterase Activities in the Gills and Gonads of *Vimba vimba (L., 1758)*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(3), 353-360.
35. **Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C., Ollis, D. L.** (1999). Of barn owls and bankers: a lush variety of  $\alpha/\beta$  hydrolases. *Structure*, 7(6), R141-R146.
36. **Holliday, G. L., Almonacid, D. E., Bartlett, G. J., O'boyle, N. M., Torrance, J. W., Murray-Rust, P., Thornton, J. M.** (2006). MACiE (Mechanism, Annotation and Classification in Enzymes): novel tools for searching catalytic mechanisms. *Nucleic acids research*, 35(suppl\_1), D515-D520.

37. **Holmes, R. S., ve Masters, C. J.** (1967). The developmental multiplicity and isoenzyme status of avian esterases. *BBA-Enzymology*, 132(2), 379-399.
38. **Hou, C. J., He, K., Yang, L. M., Huo, D. Q., Yang, M., Huang, S., Shen, C. H.** (2012). Catalytic characteristics of plant-esterase from wheat flour. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 541-548.
39. **Huang, A. H. C.** (1984). In **B. Borgstrom, H. L., Brockman (Eds.)** Lipase: Plant lipases (pp. 419–422). Amsterdam: Elsevier Publishers.
40. **Kantharaju, S., ve Murthy, K. S.** (2014). Characterization of Esterases of *Tamarindus indica* Seeds. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2(04), 54.
41. **Kaur, M., Singh, K., Rup, P. J., Kamboj, S. S., Saxena, A. K., Sharma, M., Singh, J.** (2006). A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and anti-proliferative properties. *BMB Reports*, 39(4), 432-440.
42. **Kim, J. H., ve Baik, S. H.** (2015). Properties of recombinant novel cinnamoyl esterase from *Lactobacillus acidophilus* F46 isolated from human intestinal bacterium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 116, 9-15.
43. **Kolarich, D., Weber, A., Pabst, M., Stadlmann, J., Teschner, W., Ehrlich, H., Altmann, F.** (2008). Glycoproteomic characterization of butyrylcholinesterase from human plasma. *Proteomics*, 8(2), 254-263.
44. **Lapenta, A. S., Ceron, C. R., Cordeiro, J. A.** (1995). Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios*, 84(336), 13-29.
45. **Lee, C. W., Kwon, S., Park, S. H., Kim, B. Y., Yoo, W., Ryu, B. H., Kim, T. D.** (2017). Crystal structure and functional characterization of an esterase (EaEST) from *Exiguobacterium antarcticum*. *PloS one*, 12(1), e0169540.
46. **Li, J. K., Zhou, Y. L., Wen, Y. X., Wang, J. H., Hu, Q. H.** (2009). Studies on the purification and characterization of soybean esterase, and its sensitivity to organophosphate and carbamate pesticides. *Agricultural sciences in China*, 8(4), 455-463.
47. **Lima, A. V. B., Guerra, A. L., de Almeida, E. A., Taddei, F. G., Castiglioni, L.** (2013). Characterization of esterase patterns in hepatopancreas of three species of *Macrobrachium* (*Palaemonidae*). *Biochemical systematics and ecology*, 47, 132-138.
48. **Littlechild, J. A.** (2015). Archaeal enzymes and applications in industrial biocatalysts. *Archaea*, 2015.
49. **Liu, Y., Xu, H., Yan, Q., Yang, S., Duan, X., Jiang, Z.** (2013). Biochemical characterization of a first fungal esterase from *Rhizomucor miehei* showing high efficiency of ester synthesis. *PLoS One*, 8(10), e77856.



- 50. Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., Macedo, G. A.** (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately. *Food Science and Technology*, 31(3), 603-613.
- 51. McDonald, A. G., ve Tipton, K. F.** (2014). Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS journal*, 281(2), 583-592.
- 52. Metin, K., Burcu Bakir Ateslier, Z., Basbulbul, G., Halil Biyik, H.** (2006). Characterization of esterase activity in *Geobacillus* sp. HBB-4. *Journal of basic microbiology*, 46(5), 400-409.
- 53. Mounquengui, R. W. M., Brunshwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P., Blin, J.** (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 39(5), 441-456.
- 54. Nardini, M., ve Dijkstra, B. W.** (1999).  $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*, 9(6), 732-737.
- 55. Ncube, I., Adlercreutz, P., Read, J., Mattiasson, B.** (1993). Purification of rape (*Brassica napus*) seedling lipase and its use in organic media. *Biotechnology and applied biochemistry*.
- 56. Ncube, I., Gitlesen, T., Adlercreutz, P., Read, J. S., Mattiasson, B.** (1995). Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1257(2), 149-156.
- 57. Oakeshott, J. G., Van Papenrecht, E. A., Boyce, T. M., Healy, M. J., Russell, R. J.** (1993). Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, 90(2-3), 239-268.
- 58. Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Sussman, J. L.** (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197-211.
- 59. Pahoja, V. M., ve Sethar, M. A.** (2002). A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. *Pakistan J. Appl. Sci*, 2(4), 474-484.
- 60. Parasa, R., Raman, D. S., Abhishek, M.** (2018). Leaf and seed esterases of Agathi (*Sesbania grandiflora* L.); Purification and characterization. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 308-313.
- 61. Patui, S., Clincon, L., Peresson, C., Zancani, M., Conte, L., Del Terra, L., Braidot, E.** (2014). Lipase activity and antioxidant capacity in coffee (*Coffea arabica* L.) seeds during germination. *Plant Science*, 219, 19-25.
- 62. Pereira, Á. J., Lapenta, A. S., Vidigal-Filho, P. S., Maria de Fátima, P. S.** (2001). Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta* Crantz infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis. *Biochemical genetics*, 39(9-10), 289-296.

- 63. Petersen, M. T. N., Fojan, P., Petersen, S. B.** (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of biotechnology*, 85(2), 115-147.
- 64. Petersen, M. T. N., Fojan, P., Petersen, S. B.** (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of biotechnology*, 85(2), 115-147.
- 65. Polizelli, P. P., Facchini, F. D. A., Bonilla-Rodriguez, G. O.** (2013). Stability of a Lipase extracted from seeds of *Pachira aquatica* in commercial detergents and application tests in poultry wastewater pretreatment and fat particle hydrolysis. *Enzyme research*, 2013.
- 66. Polizelli, P. P., Facchini, F. D. A., Cabral, H., Bonilla-Rodriguez, G. O.** (2008). A new lipase isolated from oleaginous seeds from *Pachira aquatica* (*Bombacaceae*). *Applied biochemistry and biotechnology*, 150(3), 233-242.
- 67. Rejón, J. D., Zienkiewicz, A., Rodríguez-García, M. I., Castro, A. J.** (2012). Profiling and functional classification of esterases in olive (*Olea europaea*) pollen during germination. *Annals of botany*, 110(5), 1035-1045.
- 68. Sasmour, R. H. A.** (2005). Purification and partial characterisation of an acid lipase in germinating lipidbody linseedlings. *Turkish Journal of Botany*, 29(3), 177-184.
- 69. Sana, B., Ghosh, D., Saha, M., Mukherjee, J.** (2007). Purification and characterization of an extremely dimethylsulfoxide tolerant esterase from a salt-tolerant *Bacillus* species isolated from the marine environment of the Sundarbans. *Process Biochemistry*, 42(12), 1571-1578.
- 70. Santos, K. C., Cassimiro, D. M., Avelar, M. H., Hirata, D. B., de Castro, H. F., Fernández-Lafuente, R., Mendes, A. A.** (2013). Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial crops and products*, 49, 462-470.
- 71. Satoh, T.** (2005). Toxicological implications of esterases—from molecular structures to functions. *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2), 11-18.
- 72. Sayali, K., Sadichha, P., Surekha, S.** (2013). Microbial esterases: an overview. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 2, 135-146.
- 73. Seth, S., Chakravorty, D., Dubey, V. K., Patra, S.** (2014). An insight into plant lipase research—challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, 95, 13-21.
- 74. Sharma, T., Sharma, A., Kanwar, S. S.** (2016). Purification and characterization of an extracellular high molecular mass esterase from *Bacillus pumilus*. *Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering*, 4(1), 9-16.
- 75. Solé, M., ve Sanchez-Hernandez, J. C.** (2015). An in vitro screening with emerging contaminants reveals inhibition of carboxylesterase activity in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 169, 215-222.

- 76. Sood, S., Sharma, A., Sharma, N., Kanwar, S. S.** (2016). Carboxylesterases: sources, characterization and broader applications. *Insight Enzyme Res.*, 1, 1-11.
- 77. Subramani, T., Chandrashekharaiyah, K. S., Swamy, N. R., Murthy, K. S.** (2012). Purification and characterization of carboxylesterase from the seeds of *Jatropha curcas*. *The protein journal*, 31(2), 120-128.
- 78. Subramani, T., Manjunath, K. C., Chandrashekharaiyah, K. S., Swamy, N. R., Murthy, K. S.** (2011). Variations in the esterase activity during the germination period of *Jatropha curcas* seeds. *Journal of Phytology*.
- 79. Sumbly, K. M., Matthews, A. H., Grbin, P. R., Jiranek, V.** (2009). Cloning and characterization of an intracellular esterase from the wine-associated lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and environmental microbiology*, 75(21), 6729-6735.
- 80. Suzuki, T., Honda, Y., Mukasa, Y.** (2004). Purification and characterization of lipase in buckwheat seed. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(24), 7407-7411.
- 81. Temizkan, G., ve Arda, N.** (1999). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler: Genel Bakış. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi*, 1, 1-17.
- 82. Tiwari, G. J., Chiang, M. Y., De Silva, J. R., Song, B. K., Lau, Y. L., Rahman, S.** (2016). Lipase genes expressed in rice bran: LOC\_Os11g43510 encodes a novel rice lipase. *Journal of Cereal Science*, 71, 43-52.
- 83. Tuter, M., Secundo, F., Riva, S., Aksoy, H. A., Ustun, G.** (2003). Partial purification of *Nigella sativa L.* seed lipase and its application in transesterification reactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(1), 43-48.
- 84. van Lith, H. A., Bieman, M. D., van Zutphen, B. F.** (1989). Purification and molecular properties of rabbit liver esterase ES-1A. *European journal of biochemistry*, 184(3), 545-551.
- 85. Villeneuve, P.** (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(6), 308-317.
- 86. Whitaker, J. R.** (1972). Principles of Enzymology for the Food Sciences. Marceli Dekker. Inc. USA.
- 87. Xue, Y., Zhang, J., Wu, X., Sun, H., Xu, C.** (2013). Cloning, expression and characterization of a novel esterase from *Bacillus pumilus*. *Annals of Microbiology*, 63(3), 879-885.
- 88. Yeşiloğlu, Y., ve Başkurt, L.** (2008). Partial purification and characterization of almond seed lipase. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 38(4), 397-410

## 6. ÖZGEÇMİŞ



183421

### **Kişisel bilgiler**

Adı Soyadı	Hilal KARAKAŞ
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 27.07.1994
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Kümbet mahallesi 65/22. Sokak Sancak Apartmanı Kat:5 No:13
E-posta Adresi	hilal_-karakas@hotmail.com

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

Lise	Sivas Kongre Lisesi, 2008
Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 2012
Yüksek Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 2016