



GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PAPATYADAN (*Matricaria chamomilla* L.) LİPAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

BURÇAK SARI

MAYIS 2017

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PAPATYADAN (*Matricaria chamomilla* L.) LİPAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

BURÇAK SARI

MAYIS 2017

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün Onayı.

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

Prof. Dr. Başak TAŞELİ

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak KİMYA Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Birsen Şengül OKSAL

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Doç. Dr. Nurhan GÜMRÜKÇÜOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Tamer AKKAN

ÖZET

PAPATYADAN (*Matricaria chamomilla* L.) LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

SARI, Burçak

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Mayıs 2017, 106 sayfa

Bu çalışmada, ülkemizde Giresun İli ve çevresinde bol miktarda yetişen papatyadan (*Matricaria chamomilla* L.) lipaz enzimi ilk defa saflaştırıldı ve kinetik özellikleri incelendi.

Petrol eteri ile yağı uzaklaştırılmış papatya bitkisi 0.06 M fosfat tamponu (pH=7,0) ile homojenize edildi. Lipaz esteraz aktivitesi gösteren homojenizatın %70'lik (NH₄)₂SO₄ kesiti elde edildi. Dializden sonra bu kesit DEAE-selüloz kolonlara uygulanarak lipaz enzimi 26 kez saflaştırıldı. Saflaştırma işlemlerinde protein miktarı Lowry ve E₂₈₀/E₂₆₀ Warburg yöntemlerine göre, lipaz esteraz aktivitesi ise Erlanson yöntemine göre tayin edildi.

SDS-PAGE elektroforezi sonucunda saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu.

Optimum pH ve sıcaklık değerleri, pH ve sıcaklık stabiliteleri, optimum reaksiyon süresi, optimum reaksiyon süresinin tayini, uygun enzim ve substrat konsantrasyonu belirlendi. Papatyadan saflaştırılan lipazın optimum pH'sının 12, optimum sıcaklığının 50°C olduğu bulundu.

Enzimin çeşitli substratlara karşı ilgisi incelendiğinde, lipazın ilgisinin en çok p-nitrofenil palmitatta olduğu ve bu substrata karşı K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0,2899 mM ve 144,93 Ünite olduğu saptandı.



Anahtar Kelimeler: Papatya (*Matricaria chamomilla* L.), Lipaz, Saflaştırma, Karakterizasyon.

ABSTRACT

LIPASE PURIFICATION FROM THE CHAMOMILE (*Matricaria chamomilla* L.) AND ITS INVESTIGATION OF SOME KINETIC PROPERTIES

BURÇAK, Burçak

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bahar SÖKMEN

May 2017, 106 pages

In this study, lipase was firstly purified from chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) being abundant in Giresun (Turkey) and surroundings and the kinetic properties of the enzyme were investigated.

Chamomile, being fat-free with petroleum ether extraction, were homogenized with 0.06 M sodium phosphate buffer (pH=7.0) 70% of (NH₄)₂SO₄ fraction of lipase esterase activity homogenate was obtained. After dialysis, this fraction was applied respectively to hydroxyapatite and DEAE-cellulose columns, and lipase was purified 26 times. In the purification process, the protein content was determined by using Lowry and E₂₈₀/E₂₆₀ Warburg methods, and lipase esterase activity was assayed with Erlanson's method.

The purified enzyme, which showed SDS-PAGE, had a molecular weight of 30 kDa.

The optimum pH and temperature values, pH and temperature stabilities, optimum reaction time, appropriate concentrations of the enzyme and substrate were investigated. It was also found that the lipase purified from chamomile had an optimum pH value of 12 and an optimum temperature of 50°C.

When the high affinity of the enzyme against different substrates was examined, the highest value was obtained with p-nitrophenyl palmitate, with respectively K_m and V_{max} values being 0.2899 mM and 144.93 Units.



Key Words: Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), Lipase, Purification, Characterization.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini hiç esirgemeyen danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bahar BİLGİN SÖKMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarımda yardımcı olan değerli Hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Tamer AKKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Papatya bitkisinin teşhisini yapan Fen edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç.Dr. Zafer TÜRKMEN'e teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalar sırasında yardımlarından dolayı yüksek lisans arkadaşlarım Ezgi ELMALI, Betül YILMAZOĞLU ve Ahmet AHISKALI' ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmam boyunca hiç sıkılmadan cihaz ve bilgi ihtiyaçlarım konusunda deneyim ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Kimyager Rıdvan İLGÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme ve zor günlerimde hep yanımda olan bu çalışmam süresince de manevi desteklerini esirgemeyen sevgili nişanlıma da en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, **Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Biriminin FEN-BAP-A-140316-65** numaralı projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----------|
| ÖZET | I |
| ABSTRACT | II |
| TEŞEKKÜR..... | III |
| İÇİNDEKİLER..... | IV |
| TABLolar DİZİNİ..... | IX |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | X |
| RESİMLER DİZİNİ | XI |
| SİMGELER DİZİNİ..... | XII |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi..... | 3 |
| 1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması..... | 6 |
| 1.1.2. Enzimlerin Numaralandırılması ve Sınıflandırılması..... | 7 |
| 1.1.2.1. Oksidoredüktazlar..... | 8 |
| 1.1.2.2. Transferazlar..... | 8 |
| 1.1.2.3. Hidrolazlar..... | 8 |
| 1.1.2.4. Liyazlar..... | 8 |
| 1.1.2.5. İzomerazlar..... | 9 |
| 1.1.2.6. Ligazlar..... | 9 |
| 1.1.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Etmenler..... | 9 |
| 1.1.3.1. Enzim Konsantrasyonu..... | 10 |
| 1.1.3.2. Substrat Konsantrasyonu..... | 10 |
| 1.1.3.3. Sıcaklık..... | 11 |
| 1.1.3.4. Ortam pH'ı..... | 11 |
| 1.1.3.5. Reaksiyon Ürünleri..... | 11 |
| 1.1.3.6. Zaman..... | 12 |
| 1.1.3.7. Işık ve Diğer Fiziksel Etkenler..... | 12 |
| 1.1.3.8. Hormonlar ve Diğer Biyokimyasal Maddeler..... | 12 |
| 1.1.3.9. Aktivatör..... | 13 |
| 1.1.3.10. İnhibitör..... | 13 |
| 1.1.3.11. Substrat Yüzeyi..... | 14 |
| 1.2. Enzim Endüstrisi..... | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.1. Başlıca Lipaz Kaynakları..... | 16 |
| 1.2.2. Lipazların Özellikleri..... | 17 |
| 1.2.3. Lipazların Sınıflandırılması..... | 17 |
| 1.2.3.1. Spesifik Olmayan Lipazlar..... | 18 |
| 1.2.3.2. 1,3 – Spesifik Lipazlar..... | 19 |
| 1.2.3.3. Yağ Asidi Spesifik Lipazlar..... | 19 |
| 1.2.4. Lipazların Enzimatik Etkisi..... | 20 |
| 1.2.5. Lipazların Katalizör Olarak Kullanımı..... | 21 |
| 1.2.5.1. Hidroliz..... | 22 |
| 1.2.5.2. Esterifikasyon..... | 22 |
| 1.2.5.3. Transesterifikasyon..... | 23 |
| 1.2.5.4. Doğal Olmayan Substratların Katalizi..... | 23 |
| 1.2.6. Lipaz Enziminin Endüstriyel Uygulamaları..... | 24 |
| 1.2.6.1. Yağ ve Oleokimya Endüstrisinde Lipazların Kullanımı..... | 25 |
| 1.2.6.2. Biyolojik Olarak Bozunabilir Polimerlerin Üretiminde Lipazların Kullanımı..... | 26 |
| 1.2.6.3. Tekstil Endüstrisinde Lipazların Kullanımı..... | 26 |
| 1.2.6.4. Deterjan Endüstrisinde Lipazların Kullanımı..... | 27 |
| 1.2.6.5. Gıda Endüstrisinde Lipazların Kullanımı..... | 28 |
| 1.2.6.6. Rasemik Karışımların Ayırıştırılmasında Lipazların Kullanımı..... | 31 |
| 1.2.6.7. Kozmetikte Lipazların Kullanımı..... | 31 |
| 1.2.6.8. Tanı Aracı Olarak Lipazların Kullanımı..... | 32 |
| 1.2.6.9. Medikal Uygulamalarda Lipazların Kullanımı..... | 32 |
| 1.2.6.10. Biyosensör (Biyolojik) Olarak Lipazların Kullanımı..... | 33 |
| 1.2.6.11. Deri Temizlemede (Yağ Gidermede) Lipazların Kullanımı..... | 33 |
| 1.2.6.12. Çevre Yönetiminde Lipazların Kullanımı..... | 34 |
| 1.2.6.13. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Lipazların Kullanımı..... | 35 |
| 1.2.6.14. Biyodizel Üretiminde Lipazların Kullanımı..... | 36 |
| 1.2.7. Lipazların Çeşitli Kaynaklardan Saflaştırılması..... | 37 |
| 1.3. Papatya Hakkında Genel Bilgiler..... | 42 |
| 1.3.1. Papatyanın Morfolojik Özellikleri..... | 44 |
| 1.3.2. Papatyanın Kökeni ve Yayılışı..... | 45 |
| 1.3.3. Papatyanın Ekolojik Önemi..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.4. Papatyanın Halk Hekimliğinde ve Tıpta Kullanım Alanları..... | 46 |
| 2. MATERYAL VE METOD..... | 47 |
| 2.1. Materyal..... | 47 |
| 2.1.1. Deneyleerde Kullanılan Cihazlar..... | 47 |
| 2.1.2. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 47 |
| 2.2. Metod..... | 48 |
| 2.2.1. Papatya Ham Ekstresinin Hazırlanması..... | 48 |
| 2.2.2. Papatya Ham Ekstresinde Lipazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması..... | 48 |
| 2.2.3. Papatya Ham Ekstresinde Lipazın %70 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi ve Dializ..... | 49 |
| 2.2.4. Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografisi..... | 50 |
| 2.2.4.1. DEAE-Selülozun Hazırlanması..... | 50 |
| 2.2.4.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Uygulaması..... | 50 |
| 2.2.5. Protein Miktar Tayini..... | 50 |
| 2.2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini..... | 51 |
| 2.2.6.1. Deneyin Yapılışı..... | 51 |
| 2.2.6.2. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi..... | 51 |
| 2.2.7. E ₂₈₀ /E ₂₆₀ Yöntemi ile Protein Miktar Tayini..... | 52 |
| 2.2.8. Lipaz Aktivitesinin Tayini..... | 53 |
| 2.2.8.1. Esteraz Aktivitesi Tayini..... | 53 |
| 2.2.8.1.1. Ayıraçlar..... | 53 |
| 2.2.8.2. Deneyin Yapılışı..... | 54 |
| 2.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)..... | 54 |
| 2.2.9.1. Kullanılan Çözeltiler..... | 54 |
| 2.2.9.2. Jellerin Hazırlanması..... | 55 |
| 2.2.9.3. SDS - PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü..... | 55 |
| 2.2.2. Papatyadan Elde Edilen Lipazın Esteraz Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi | 56 |
| 2.2.10.1. Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi..... | 57 |
| 2.2.10.2. pH Stabilitesi..... | 57 |
| 2.2.10.3. Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi..... | 57 |
| 2.2.10.4. Termal Stabilite..... | 58 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.10.5. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması..... | 58 |
| 2.2.10.6. Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi..... | 58 |
| 2.2.10.7. Enzim Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 59 |
| 2.2.10.8. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 59 |
| 3. BULGULAR..... | 60 |
| 3.1. Papatya Lipazının Saflaştırılması..... | 60 |
| 3.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu..... | 60 |
| 3.1.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi..... | 60 |
| 3.1.3. SDS-PAGE Elektrofrezisi..... | 62 |
| 3.1.4. Lipaz Esteraz Aktivitesine pH'nın Etkisi..... | 62 |
| 3.1.5. Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi..... | 63 |
| 3.1.6. Lipaz Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi..... | 64 |
| 3.1.7. Lipaz Esteraz Aktivitesinin Termal Stabilitesi..... | 64 |
| 3.1.8. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması..... | 65 |
| 3.1.9. Lipazın Farklı Substratlara Göre K_m ve V_{max} Değerleri..... | 66 |
| 3.1.10. Enzim Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 69 |
| 3.1.11. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 70 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 71 |
| 5. KAYNAKLAR..... | 74 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 90 |

TABLolar DİZİNİ

TABLO

| | |
|---|----|
| 1.1. Endüstride Kullanılan Bazı Enzimler..... | 15 |
| 1.2. Lipazların Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması..... | 17 |
| 1.3. Lipazların Endüstriyel Kullanımına Örnekler..... | 24 |
| 1.4. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımının Tarihsel Gelişimi..... | 35 |
| 1.5. İnsanlarda Bulunan Lipazlar..... | 37 |
| 1.6. Bakteriyel Lipaz Kaynakları..... | 39 |
| 1.7. Fungal Lipaz Kaynakları..... | 39 |
| 1.8. Endüstriyel Olarak Önemli Lipaz Üreten Firmalar..... | 40 |
| 2.1. E ₂₈₀ /E ₂₆₀ Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayininde Kullanılan Faktör Tablosu..... | 52 |
| 3.1. Papatyadan Lipazın Elde Edilme Evrelerinin Esteraz Aktivitesine Göre İncelenmesi..... | 61 |
| 3.2. Papatya Tohumu Lipazının Farklı Substratları İçin K _m ve V _{max} Değerleri..... | 69 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

| | |
|---|----|
| 1.1. Enzim Substrat İlişkisi..... | 5 |
| 1.2. Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi..... | 10 |
| 1.3. Substrat Miktarının Reaksiyon Hızına Etkisi | 10 |
| 1.4. Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi | 11 |
| 1.5. Aktivatörün Reaksiyon Hızına Etkisi..... | 13 |
| 1.6. İnhibitörün Reaksiyon Hızına Etkisi | 13 |
| 1.7. Substrat Yüzeyinin Reaksiyon Hızına Etkisi | 14 |
| 3.1. Papatya Ham Ekstresinin % 70 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği..... | 61 |
| 3.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi..... | 62 |
| 3.3. Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi..... | 63 |
| 3.4. Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi..... | 63 |
| 3.5. Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi..... | 64 |
| 3.6. p – Nitrofenil Asetatın Sıcaklık Stabilitesi..... | 65 |
| 3.7. Zamanın Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 65 |
| 3.8. p–Nitrofenil Asetat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 66 |
| 3.9. p–Nitrofenil Bütirat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 66 |
| 3.10. p – Nitrofenil Kaprat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi...67 | |
| 3.11. p–Nitrofenil Laurat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi.....67 | |
| 3.12. p–Nitrofenil Miristat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi...68 | |
| 3.13. p–Nitrofenil Palmitat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi...68 | |
| 3.14. Enzim Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 69 |
| 3.15. Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi..... | 70 |

RESİMLER DİZİNİ

RESİM

1.1. Papatya Bitkisine Ait Görsel.....45



SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-------|-----------------------|
| °C | Santigrat Derece |
| % | Yüzde |
| µmol | Mikromol |
| mM | Milimolar |
| µg/mL | Mikrogram / Mililitre |
| kDa | Kilo Dalton |
| mg/mL | Miligram/Mililitre |
| µg | Mikrogram |
| M | Molar |
| µL | Mikrolitre |
| mL | Mililitre |
| Nm | Nanometre |

1.GİRİŞ

Enzimler karbon, oksijen, hidrojen, azot ve kükürtten meydana gelen, kimyasal tepkimelerde katalizör olarak rol oynayan protein yapısındaki moleküllerdir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü enzimin kendisi değişikliğe uğramadan düzenlemektedir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadırlar. Enzimler, proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler (1,2).

Metabolik reaksiyonların büyük bir kısmı enzimler tarafından kontrol edilip hızlandırılırlar. Reaksiyonun başlangıç aşamasında enzimin etki ettiği madde substrat olarak adlandırılırken, reaksiyon sonucu miktarında artış görülen ve açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılırlar. Enzim substratın dış yüzeyinden itibaren etki etmeye başlar, şeklini bozar ve ürünü açığa çıkarır. Ürün açığa çıktıktan sonra enzim başka bir substrat molekülüne aynı işlemi yapmak için hazırlanır (3).

Enzimler doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilir ve bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden faydalanılmaktadır. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi ve enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi büyük önem arz etmektedir. Enzimler; gıda, deterjan, ecza(sağlık), tekstil, kâğıt, deri ve kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Çeşitli uygulamalarda giderek daha büyük önem kazanan enzimler ticari olarak üretilmektedir. 2000 yılında, enzimlerin endüstriyel pazardaki değerinin yaklaşık 1,5 milyar dolar olduğu bilinmektedir. Endüstriyel enzim pazarında en önemli yeri, proteaz, lipaz, amilaz ve esteraz gibi hidrolitik enzimler tutmaktadır. Enzim kullanılan süreçlere olan ilginin artmasının nedenleri arasında, enzimatik reaksiyonların yüksek özgüllüğü ve kullanılan ılımlı reaksiyon koşulları sayılmaktadır (1,2).

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar, E.C. 3.1.1.3), yağ-su ara yüzeyinde triacilgliserollerin hidrolizini katalizleyerek di- ve monoacilgliserollere ve gliserole dönüştürme (4,5), susuz ortamda ise ester bağlarını sentezleme özelliğine sahiptirler (6).

Lipazlar (E.C.3.1.1.3; trigliserol açilhidrolazlar), triacilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Endüstride ve bilimsel çalışmalarda; hidroliz, esterleşme, transesterleşme, peptid sentezi gibi reaksiyonları ve bölge seçimli, stereoseçimli mekanizmaları katalizlemekte kullanılırlar (7,8).

Hidroliz, çeşitli esterleşme reaksiyonları, lipid sentezleri (9), biyotransformasyon, organik sentezler gibi çeşitli reaksiyonları katalizleyen ve yağ kimyası, deterjanlar, mandıracılık gibi endüstri alanlarında çok fazla kullanılan lipaz enzimi; insan ve diğer memelilerin pankreas ve bağırsaklarından, mantarlardan (10-12), mikroorganizmalardan (mantar ve bakteriyel), hayvansal ve bitkisel kaynaklardan farklı metodlarla elde edilmiş ve saflaştırmışlardır (4,13-15). Lipazların biyoteknoloji alanında yaygın uygulama alanları bulunmaktadır (16). Günlük endüstriyel üretimlerde, yağ işleminde, yüzey aktif maddelerin üretiminde, ilaç endüstrisinde, deterjan katkı maddelerinde, çeşitli tekstil sentezlerinde ve organik kimyada sentetik reaksiyonların biyokatalizörleri olarak lipazlar kullanılmaktadır (17).

Deneysel şartlar altında, reaksiyon karışımındaki suyun miktarı yönünü belirleyecektir. Su yokluğunda veya eser miktarda su varlığında transesterifikasyon tercih edilir; aşırı miktarda su varlığında ise hidroliz gerçekleşmektedir. Kısa bir zaman önce lipazların üç boyutlu yapılarının aydınlatılmasıyla eşsiz yapı-fonksiyon ilişkileri belirlenmiştir. Böylelikle bitki, hayvan ve mikrobiyal lipaz üretimi önem kazanmıştır (18).

Lipazlar, birçok tepkimeyi katalizleyebilme becerileri ile endüstride deterjan, gıda, deri, kağıt, kozmetik ve farmasötik alanlarda yaygın kullanıma sahiptirler. Hidrolitik lipazların başlıca ticari kullanım alanı deterjanlardır. Toplam lipaz

kullanımının %32'si deterjan endüstrisinde gerçekleşmektedir (7,8). Lipaz kullanım alanlarına süt ürünleri, unlu mamüller, içecekler, yiyecek sosları, et ve balık ürünleri, yağlar, kimyasallar ve temizlik ürünlerinde ilave edilmelidir (19). Lipazlar, hidrolitik enzimler arasında en geniş kullanım alanına sahip enzimlerdir (20). Lipazlar kullandıkları substratların çeşitliliği ve ekstrem koşullarda (sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi ortamlarda) kararlı yapılarını koruyabilme sebeplerinden dolayı önemli biyokatalizörler arasında bulunurlar (21,22).

Bitkisel yağlı tohumlardan lipaz izolasyonu ve saflaştırılması üzerine yapılan araştırmalar incelenerek çalışmalar yapılmıştır (23,24). Papatya bitkisi içeriğinde, proteinler ve yağlar gibi önemli besin bileşenleri bulunmaktadır. Bitkisel yağlı bir tohum olan papatya bitkisi protein kapsamında lipazların bulunabileceği düşünülmektedir.

Lipazlar birçok bitkisel, hayvansal ve özellikle mikroorganizmalardan saflaştırılmasına rağmen, bugüne kadar papatya bitkisinden saflaştırılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, Giresun'da yetişen papatya bitkisinden (*Matricaria chamomilla* L.) lipaz enzimi ilk defa saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla papatyadan lipaz enzimi izole edildikten sonra çeşitli yöntemlerle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin substrat spesifitesi, optimum reaksiyon süresi, optimum sıcaklık, optimum pH'ı, termal kararlılığı, enzim konsantrasyonunun esteraz aktivitesine etkisi, substrat konsantrasyonunun esteraz aktivitesine etkisi ile K_m ve V_{max} değerleri tayin edilmiştir.

1.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzimler, canlı organizmada kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün oluşturmayan, %100'lük bir verim sağlayan biyolojik katalizörler olup; proteinlerin en büyük özelleşmiş grubunu oluşturmaktadırlar (25). Hücre içerisinde üretilmesine rağmen birçoğu hücre dışında da aktivitelerine devam edebilirler (26,27).

Enzimler protein yapısında oldukları için proteinlerin tüm özelliklerini gösterirler. Enzimler büyük moleküllü olup yarı geçirici zarlardan geçemezler, ısı ile kolaylıkla denatüre olurlar ve ortamın asit veya alkali oluşuna karşı duyarlıdırlar. 0°C ile yaklaşık 40°C arasında sıcaklık yükselmesi, enzimin etki hızını artırırken bu sıcaklıkların üzerinde denatürasyon görülmektedir (25,28).

Enzimlerin etki ederek ürüne dönüştürdükleri maddelere “substrat” adı verilir ve enzimin adlandırılmaları etki ettiği maddenin isminin sonuna -az (-ase) eki getirilerek yapılır. Enzimlerin şifresi genler üzerinde kodlanmaktadır. Dolayısıyla amino asit dizilimi spesifiktir (26).

Enzimlerin üç boyutlu yapıları incelendiğinde katalitik aktiviteden sorumlu “aktif merkez” denilen bir bölgeye sahip olduğu görülür. Bu bölge enzimin sadece %10-20’lik bir kısmını oluşturur (29). Aktif bölge substrata komplementer olan, üç boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir ve substratı bağlayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir. ES, sonradan enzim ve ürüne parçalanmış enzim-ürün (EP) kompleksine dönüşür (30).

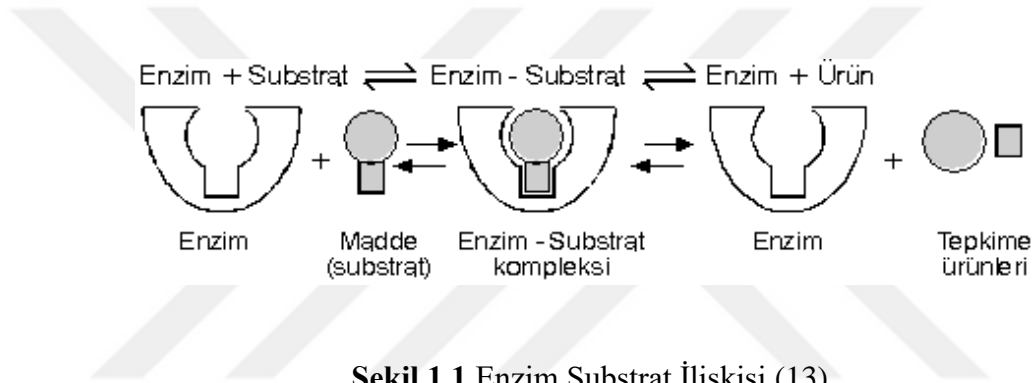
Enzimler, etkileşim içinde oldukları substratlarına karşı çeşitli düzeylerde özgünlük gösterir. Bir enzim, sadece tek bir substrat üzerinde etki ettiğinden ve sadece tek bir reaksiyonu katalizlediğinden “*mutlak spesifiklik*” gösterir. Yani aktif bölgesine yerleşebilecek tek bir türden substrat moleküllerine bağlanabilir. Örneğin; glukokinaz, sadece glukozun fosforillenmesinden sorumludur.

Bazı enzimler genel bir fonksiyonel gruba sahip olan bir sınıf substrat üzerine etki edebilirler. Bu durum, “*grup spesifikliğı*” olarak tanımlanır. Örneğin; fosfatazlar, bir fosfat fonksiyonel grubu buldurmalarına rağmen farklı substratların reaksiyonlarını katalizlemektedirler.

Belirli türden kimyasal bağlara karşı özgün olan enzimlere ise “*bağ spesifikliğı*” olarak tanımlanır. Esterazlar bu gruba örnek verilebilir. Bu grup enzimler ester bağlarına sahip moleküllerin hidrolizini katalizlemekten

sorumludurlar. Bazı enzimler ise “izomer spesifikliği” gösterir. (D-) ve (L-) izomer yapılarından sadece birinin reaksiyonunu katalizlerler (27).

Doğadaki bütün metabolik reaksiyonların temelinde enzimlerin etkisi söz konusudur. Enzim reaksiyona girer ve değişikliğe uğramadan reaksiyondan çıkar. Tekrar başka bir substrat ile aynı reaksiyonu başlatır. Buna benzer kimyasal katalizörler maddelerin büyük çoğunluğu ile reaksiyona girip birçok reaksiyonu katalizleyebilirler. Fakat bunlar genellikle hem özgül hem de seçici değildirler. Buna rağmen enzimler oldukça spesifik reaksiyonlara katalizör etkisi yaparlar. Bu özellik, enzim molekülünün şeklinden kaynaklanır. Enzim substrat ilişkisi basitçe anahtar-kilit uyumu ile açıklanmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Enzim Substrat İlişkisi (13)

Enzimlerin kimyasal yapısı protein temelli olan moleküllerdir. Fakat bazı enzimlerde, protein yapısına protein olmayan organik veya anorganik moleküllerin bağlanması söz konusudur. Enzimlerin sadece proteinden oluşmuş ve kofaktör içermeyen inaktif kısmına *apoenzim*, kofaktör ve koenzim içeren katalitik aktif kısmına ise *haloenzim* denir. Enzimlerin aktivite göstermesini sağlayan, protein yapıda olmayan, genellikle metal iyonlarından (Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} gibi) oluşan yan gruplarına *kofaktör* denir. Enzimlerin aktivite gösterebilmek için gereksinim duydukları kompleks organik moleküller ise *koenzim* olarak adlandırılırlar (26).

Proteinlerin önemli bir sınıfını oluşturan enzimler peptid zincirleri halinde temel yapı taşı olarak amino asitlerden oluşan 3-boyutlu bir yapıyı oluşturur. Enzimler bu 3-boyutlu tersiyer yapıları sayesinde, bağlanacakları ve değişime uğratacakları substrat moleküllerini seçme özelliğini kazanmışlardır. Kuaterner yapılara sahip birden fazla alt birimli enzimler mevcuttur. Enzimlerin kendilerine

özgü bu 3-boyutlu yapıları substrat molekülünün uygun şekilde bağlanabilmesini sağlar.

Enzimlerin enzimlerle veya substratlarla gerçekleşen etkileşimleri proteinlerin 3-boyutlu yapılarının kazanılmasında da görev alır. Bu etkileşimler genel olarak iyonik bağ, Van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağı gibi etkileşimlerdir .

Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları katalizlenmemiş reaksiyonlara göre genellikle 10^6 - 10^{12} kat daha büyüktürler (18,27). Enzimler çoğunlukla fizyolojik pH değerlerinde, 100 °C'nin altındaki sıcaklıklarda ve atmosferik basınçlarda biyokimyasal reaksiyonları katalizler (27).

Her enzimin aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Buna "optimum sıcaklık" denir. Bu değerden yüksek sıcaklıklarda enzimin yapısında bağların kopması sonucu enzimler bozulmaya başlar. Aynı zamanda her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı "optimum pH" bulunmaktadır. Bazı maddeler ise enzimlerin aktif bölgelerine tutunarak enzimin deformasyonunu sağlayarak, aktiviteyi azaltabilirler. Hatta tamamen durdurabilirler. Bu tür maddelere "inhibitör" adı verilir (31).

1.1.1.Enzimlerin Sınıflandırılması

.....1950'lerin sonuna kadar bilinen enzimlerin sayısındaki artış çok hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Bu gelişmeye paralel olarak aynı enzime farklı isimler verilmesi söz konusu olmuştur. Bu durum adlandırmada karmaşıklığa neden olmuştur. Adlandırılan enzimlerin katalizlediği reaksiyonun tabiatı hakkında herhangi bir bilginin mevcut olmaması da karmaşayı arttırmıştır. Bu karışıklığı gidermek için 1956 yılında Uluslararası Enzim Komisyonu (International Commission on Enzyme) kurulmuştur. Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi için kabul edilen sistem 3 genel prensibi içermektedir.

Birincisi, -az (-ase) eki alarak sonlanan enzim isimleri, tek enzimler için kullanılır. Bu durum birden fazla sistem içeren enzimler için kullanılmaz.

İkincisi, enzimler katalizledikleri reaksiyonlar göz önüne alınarak sınıflandırılır ve adlandırılırlar.

Üçüncüsü katalizlenen reaksiyonların tipine göre adlandırılır ve sınıflandırılır. Bu sistemde enzim komisyonu (E.C.) tarafından belirlenen kod numaraları kullanılarak enzimlerin tanımlanması sağlanır.

Enzimin genellikle iki ismi mevcuttur. Biri sistematik (tavsiye edilen), diğeri ise (yaygın olarak kullanılan), daha kısa ve kolayca uygulanan genel ismidir. Bir enzim, sistematik ismi ve E.C. kod numarası ile tanımlandıktan sonra önerilen isim herhangi bir karışıklığa sebep olmaksızın sorunsuzca kullanılabilir. Bu tür yaklaşımlar literatürlerde yaygın olarak uygulanmaktadır (31).

1.1.2. Enzimlerin Numaralandırılması ve Sınıflandırılması

.....Enzim komisyonu raporuna göre enzimler katalizledikleri reaksiyona göre 6 ana sınıfa ayrılır ve kod numaraları ile tanımlanırlar. E.C. ön eki ile başlayan numaralar noktalarla birbirinden ayrılmış 4 temel ögeyi ifade ederler.

- İlk rakam, enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu belirtir.
- İkincisi, enzimin alt sınıfını (Subclass) ifade eder.
- Üçüncü rakam, ikinci alt grubu (Sub-Subclass),
- Dördüncü rakam ise enzimin sub-subclass içindeki seri numarasını ifade eder.

Örneğin E.C. 3.2.1.1 fungal alfa-amilaz enziminin kod numarası ile ifade edilmesidir.

Bu sisteme göre ilk rakamın ifade ettiği sınıflar kısaca aşağıdaki gibidir:

- Oksidoredüktazlar,
- Transferazlar,
- Hidrolazlar,
- Liyazlar,
- İzomerazlar,
- Ligazlar (25,32,33)

1.1.2.1.Oksidoredüktazlar

İndirgenme ve yükseltgenme olayını katalizleyen enzimler sınıfında yer alırlar. Oksidoredüktazlar ayrıca dehidrojenazlar ve sitokromlar, oksidazlar, oksijenazlar olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar. Solunum ve fermentasyon olaylarıyla ilgili enzimler oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir. Örneğin; katalaz, laktat dehidrojenaz.

1.1.2.2.Transferazlar

Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimler sınıfında yer alırlar. Tek karbonlu grupları, aldehit ve keton gruplarını, açıl gruplarını, glikozil gruplarını, fosfat gruplarını, kükürt içeren grupları aktaranlar olmak üzere farklı alt sınıflara ayrılırlar. Örneğin; kreatin kinaz, aspartat transaminaz.

1.1.2.3.Hidrolazlar

Hidroliz reaksiyonlarını, suyun $[H]^+$ ve $[OH]^-$ iyonları yardımıyla moleküllerin yıkılmasını katalizleyen enzimler sınıfında yer alırlar. Hidrolazlar, ester bağlarına, glikozil bileşiklerine, eter bağlarına, peptid bağlarına, diğer C-N bağlarına, asetanhidrit bağlarına, C-C, C-P, C-halojen, C-S, P-N, S-S bağlarına etki edenler olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar. Örneğin; lipaz, üreaz.

1.1.2.4.Liyazlar

Bir organik moleküldeki grupların hidrolitik veya oksidatif olmayarak ayrılmasını katalizleyen enzimler sınıfında yer alırlar. C-C, C-O, C-N gibi gruplar arasında çift bağ oluşturarak substrattan bazı grupların ayrılmasını katalizleyen enzimlerdir veya tam tersi bir yolla etkinlik gösterirler. Örneğin; piruvat dekarboksilaz.

1.1.2.5.İzomerazlar

Substratın molekül içi değişikliklerini katalizleme özelliğine sahip enzimler sınıfında yer alırlar. Rasemazlar ve epimerazlar, cis-trans izomerazlar, intramoleküler oksidoredüktazlar, intermoleküler transferazlar, intramoleküler liyazlar ve diğer liyazlar olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar. Örneğin; glukoz-6-fosfat izomeraz.

1.1.2.6.Ligazlar (Sentetazlar)

Ligazlar iki molekülün birleşmesini katalizleyen enzimler sınıfında yer alırlar. Bu birleşme için gerekli enerji ATP (Adenozin trifosfat), ADP (Adenozin difosfat) gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanır. Örneğin; piruvat karboksilaz, asetil CoA karboksilaz (33).

1.1.3.Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Etmenler

Enzimler biyolojik sistemlerde çok düşük miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle enzim proteinin miktarından ziyade biyolojik sistemde göstermiş olduğu aktiviteden yola çıkarak enzimin miktarı ölçülür (27).

Bir enzim aktivitesi birimi: 25°C'de 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak kabul edilmektedir.

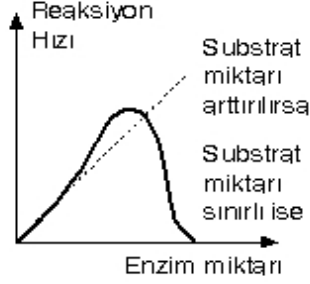
Özgül (spesifik) aktivite: Miligram protein başına düşen enzim aktivitesidir. Bu tanım daha çok izole edilen enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla kullanılır.

Dönüşüm sayısı (k_{kat}): Her bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısıdır (32).

Enzim reaksiyon hızı üzerine enzim ve substrat konsantrasyonlarının, sıcaklığın, ortam pH'ının, zamanın, reaksiyon ürünlerinin, hormonların, ışık vb. gibi fiziksel faktörlerin etkisi mevcuttur (27).

1.1.3.1. Enzim Konsantrasyonu

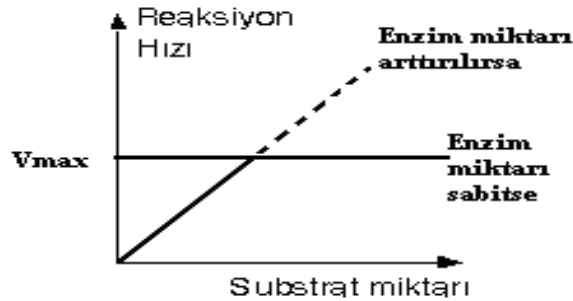
Substratın yüksek miktarda bulunduğu bir ortamda optimal şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı (V_0), enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Belirli bir süre sonra ortamda enzimin reaksiyona girebileceği substrat sınırlı olduğundan hız giderek azalmaya başlar (27).



Şekil 1.2 Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi (27)

1.1.3.2. Substrat Konsantrasyonu

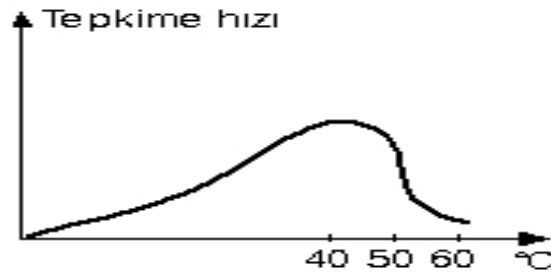
Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterirken, substrat ilave edildikçe ortamda reaksiyona girebilecek enzim bulunmadığından hız giderek daha az artar ve belirli bir maksimum hız (V_{max}) düzeyinde dengeye gelir ve sabitleşir (27).



Şekil 1.3 Substrat Miktarının Reaksiyon Hızına Etkisi (27)

1.1.3.3. Sıcaklık

Enzimatik reaksiyonların hızı sıcaklık artışıyla belirli bir noktaya kadar artarken, belirli bir sıcaklığın üzerine çıkarıldığında enzimlerin yapısı denatüre olduğundan etkilerini kaybederler (27,34). Her enzimin substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir maksimum sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa “*optimum sıcaklık*” denir. *In vitro* enzim reaksiyonları genel olarak 37-40°C’de yapılır (27).



Şekil 1.4 Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi (27)

1.1.3.4. Ortam pH'ı

Her enzimin aktivitesinin maksimum olduğu belirli bir pH aralığı vardır. Bu pH'ya enzimin “*optimum pH*’i” denir. Örneğin; üreaz pH 6-7 aralığında en yüksek aktiviteyi gösterir. Enzimin optimum pH’sının altında ve üstünde reaksiyon hızı azdır. Enzim belirli bir pH’da tamamen yapısı bozulur ve etkisiz kalır (27).

Enzimatik çalışmaları istenilen pH’da sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli duruma getirmek için tampon çözeltiler kullanılır. Optimum pH’a genellikle kullanılan tampon çözeltinin cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır (34).

1.1.3.5. Reaksiyon Ürünleri

Enzim reaksiyonu devam ettikçe, reaksiyon ürünleri belli bir zamandan sonra enzimin aktivitesinde azalmaya neden olur ve enzim reaksiyonunun hızı düşer. Bu

inhibisyonun temel nedeni, reaksiyon ürünlerinin molekül yapısı bakımından substrata benzemeleri ve enzime substrattan daha fazla bağlanma arzusudur (35).

1.1.3.6. Zaman

Enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızı, zamanla azalır. Bunun nedeni olarak, reaksiyon ürünlerinin kendi aralarında birleşerek tersi yönde bir reaksiyon meydana getirmeleri, zamanla enzimde aktive kaybının olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşması ve substratın bitmesidir (27).

Bu faktörlerin etkilerini ortadan kaldırmak için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unun kullanıldığı reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir (34).

1.1.3.7. Işık ve Diğer Fiziksel Etkenler

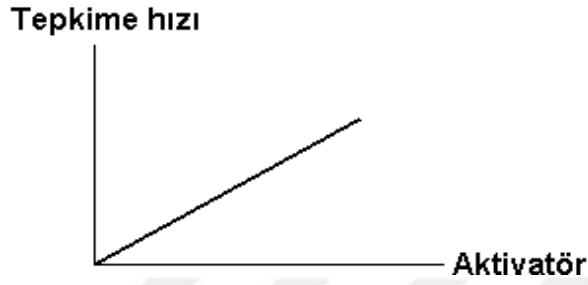
Enzimlerin etkisi ışığa bağlı olarak artabilir veya azalabilir. Enzim çözeltilerinin kuvvetlice çalkalanması neticesinde enzimin yapısında bozulmaya sebep olur (34).

1.1.3.8. Hormonlar ve Diğer Biyokimyasal Maddeler

Hormonlar, aminoasitler ve diğer biyokimyasal maddelerde enzim aktivitesinde birtakım değişiklikler meydana getirirler. Örneğin, östrojenik, androjenik ve bazı steroid gebelik hormonları, glutamat dehidrojenaz enziminin dört alt ünitesini ayrıştırarak enzimin yapısında değişikliğe neden olarak aktivitesini kaybetmesine sebep olurlar; Böylelikle, lösin, metiyonin, izolösin, ADP (Adenozin difosfat) tarafından geri döndürülebilir (32).

1.1.3.9. Aktivatör

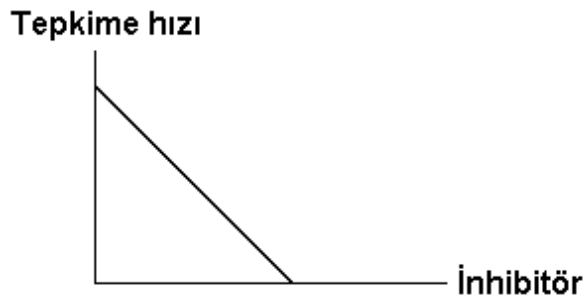
Enzim çalışmasını hızlandıran maddelere aktivatör adı verilir. Bileşik enzimlerde vitamin ve mineraller aktivatör olarak görev yapar. Enzimin çalışma hızının yükselmesine ortamdaki aktivatör miktarının artması sebep olur (36).



Şekil 1.5 Aktivatörün Reaksiyon Hızına Etkisi (36)

1.1.3.10. İnhibitör

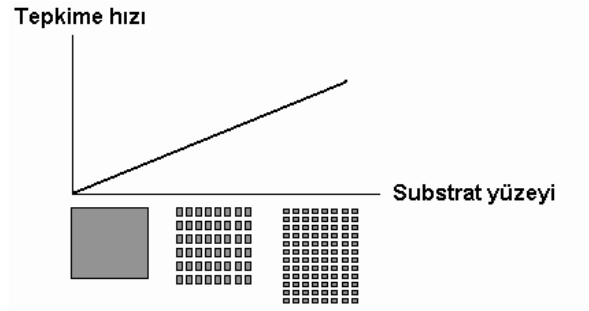
Enzimin çalışmasını yavaşlatan veya durduran maddelere inhibitör adı verilir. İnhibitörler enzimin substrata bağlandığı aktif bölgeye bağlanarak, enzimin çalışmasını engeller. Siyanür, arsenik, kurşun ve civa gibi maddeler enzimler için inhibitör etki yapar. Ortamdaki inhibitör miktarı artarsa, reaksiyon durur (36).



Şekil 1.6 İnhibitörün Reaksiyon Hızına Etkisi (36)

1.1.3.11. Substrat Yüzeyi

Besinlerin mekanik olarak sindirilmesi substrat yüzeyini artırır. Substrat yüzeyinin artması reaksiyonu hızlandırır (36).



Şekil 1.7 Substrat Yüzeyinin Reaksiyon Hızına Etkisi (36)

1.2.Enzim Endüstrisi

Enzimler, kimyasal reaksiyonları büyük bir spesifikle ve hızını artırarak katalizlerler. Enzimler tarafından katalizlenen bütün reaksiyonlar, canlı organizmaların metabolizmasının temeli olup kullanışlı ve ekonomik olarak biyokatalitik değişimlerde farklı endüstri dalları için mükemmel fırsatlar ortaya koymaktadır (37).

Biyolojik sistemlerde olduğu kadar endüstriyel uygulamalar içinde önemli özelliklere sahip olan enzimler, asitler, bazlar ya da metal oksitler gibi inorganik katalistlerin tersine son derece seçici ve verimli olmaları, ılımlı şartlarda çalışmaları ve biyolojik olarak parçalanabilmeleri gibi pek çok avantaja sahiptirler. Bu özellikleri sebebiyle endüstri açısından büyük önem taşımaktadırlar (38).

Günümüzde enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda prosesi, ziraat, tekstil, deri sektörü gibi birçok endüstriyel malzemenin üretimi ve işlenmesi, çeşitli toksik maddelerin muamelesi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (39,40).

Enzimler bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimler diğer enzimlere oranla daha fazla kullanılmaktadır (38). Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi pazar faktörleri tarafından da etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim diğer enzimlere oranla daha kolay elde edilebilir. Fakat, bitkisel kaynakların da endüstriyel hammadde olarak kullanılmaları, canlıların gıda ihtiyaçlarına bağlıdır. Mikrobiyal enzimler ise büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca, mikroorganizmaların üreyip çoğalma süreleri kolaylıkla enzimlerin pazar ihtiyaçlarına göre şekil aldırılabilir (41). Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görünmekte, bu konuda yoğun çalışmalar ve araştırmalar yapılmaktadır (42).

Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin %75'i gıda ve deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadır. Endüstri alanında proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar en yaygın kullanılan enzim gruplarından. Bu alanda her gün yeni potansiyel kaynaklar araştırılmakta ve gündeme gelmektedir (42).

Tablo 1.1 Endüstride Kullanılan Bazı Enzimler (43)

| | |
|--|--|
| Yağların parçalanması ve interesterifikasyon | Lipazlar |
| Peynir üretimi | Rennin, pepsin |
| Sindirime yardımcı | Çeşitli proteazlar |
| Etin gevrekleştirilmesi | Papain |
| Dericilik | Çeşitli proteazlar |
| Nişasta hidrolizi | Amilaz (α ve β), pullulanaz |
| Sakkaroz inversiyonu | İnvertaz |
| Meyve suyu, sirke ve şarap berraklaştırma | Pektinazlar |
| Lezzet kontrolü (tat verici) | Nükleazlar |
| Besin maddesinden istenmeyen ve toksik bileşiklerin uzaklaştırılması | Hidrolitik enzimler |
| Oksidasyonun önlenmesi ve besin maddelerinde renk | Oksidazlar |

| | |
|--|---------------------------------|
| kontrolü | |
| Amino asit üretimi | Pronaz, amino peptidaz |
| Peynir atık suyu ve sütteki laktozun hidrolizi | Laktaz (β -galaktozidaz) |
| Selüloz hidrolizi | Selülaz |
| Dekstroz üretimi | Amiloglikosidaz |
| Penisilin üretimi | Penisilin amidaz |
| Organik sentezler | Değişik enzimler |
| Sterilizasyon ve soğuk pastörizasyon | Katalaz |
| Glukozun fruktoza dönüştürülmesi | Glukoz izomeraz |

1.2.1.Başlıca Lipaz Kaynakları

Lipazlar, mikroorganizmalardan bitkisel kaynaklardan ve hayvansal dokulardan elde edilmektedir. Hayvansal lipazlar doku ve vücut sıvılarının çoğunda; bitkisel lipazlar, bitkilerde katman doku, kabuk ve köklerde bulunmaktadır. Lipazlar, pek çok mikroorganizma türlerinin bünyelerinde doğal olarak bulunur. Bunların arasından, kolay üretilmesi ve pek çok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizlemesinden dolayı en fazla kullanım alanı bulan ise mikrobiyal kaynaklıdır. Hayvansal kaynaklı lipaz eldesi, genel olarak lipaz enzimi bakımından zengin olan pankreastan elde edilir. Yağ içeriği yüksek olan bütün bitkilerde ise (zeytin, ayçiçeği, fındık vb.) lipaz enzimi mevcuttur (44).

Lipaz tarafından katalizlenmiş olan reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzemesinden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla daha çevre dostu olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle lipazın katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötral pH gerektirir, enerji gereksinimi düşüktür. Ayrıca o ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir ve bu aktivite özellikle de substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Bu kavram ara yüzey aktivasyonu olarak tanımlanabilir. Bu sebeple, en yüksek aktivitelere, substrat için yüksek yüzey alanına ulaşıldığı emülsiyon sistemlerinde ulaşılmaktadır (45).

Tablo 1.2 Lipazların Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması (46)

| |
|---|
| Hayvansal Lipazlar |
| Sindirim sistemi lipazları (Pankreas lipazı vb) |
| Doku lipazları (Karaciğer lipazı vb) |
| Süt lipazları |
| Bitkisel Lipazlar |
| Mikroorganizma Lipazları |
| Bakteriyel lipazlar |
| Fungal lipazlar |
| Maya mantarları |

1.2.2. Lipazların Özellikleri

Lipazlar ilk kez Clause Bernard tarafından 1856'da tanımlanmıştır. 1943 yılında bildirilen kan plazmasındaki lipoprotein lipazlar “temizleyici faktör” olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Anfinsen ve arkadaşları temizleyici faktörü lipolit enzimlerin varlığı olarak yorumlamışlardır. Birçok bakterinin lipaz ürettiği ve salgıladığı yaklaşık 100 yıl önce, mikrobiyolog C. Eijkmann tarafından rapor edilmiştir (47). Günümüzde enzimlerin kullanıldığı pek çok alanda lipazların önemi giderek artmaktadır. Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantiyo seçicilik, bölge seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri öneminin artmasında etkili olmuştur.

Lipazlar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmekle birlikte, endüstriyel olarak daha çok mikrobiyal kökenli lipazlar tercih edilmektedir. Büyük miktarda üretimin mümkün olması ve diğer kaynaklara göre daha ucuza maledilmesi mikrobiyal kaynakların tercih edilmesinde önemli etkenlerdir (2,48,49,).

1.2.3. Lipazların Sınıflandırılması

Lipazlar, hidrolazlar sınıfında yer almakla birlikte yağ asidi esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Katalizleme, suda çözünmeyen

substratın oluşturduğu ara yüzeyde gerçekleşir. Su ve yağın oluşturduğu bu ara yüzey enzim aktivitesi için gereklidir.

Lipazın immobilizasyonu sırasında lipaz ile birlikte immobilize edilmiş olan su, bu ara yüzeyin oluşmasını sağlar.

Lipazlar tarafından katalizlenen bir ester hidroliz-ester sentez reaksiyonu geri dönüşümlü olup, reaksiyonun gidişi H_2O ve $R'OH$ derişimlerine bağlıdır. Suyun fazla olması enzimin hidrolitik aktivitesine, alkolün fazla olması ise enzimin sentez aktivitesine neden olmaktadır (50).

Dünyada ticari olarak üretilen enzimlerin % 3'ünü lipazlar oluşturmaktadır (51).

Lipazlar substratlara karşı spesifikliklerine göre üç ayrı grupta incelenir (48,52,53).

- Spesifik Olmayan Lipazlar
- 1,3-Spesifik Lipazlar
- Yağ Asidi Spesifik Lipazlar

1.2.3.1. Spesifik Olmayan Lipazlar

Bu gruba giren lipazlar, triaçilgliserollerin tüm pozisyonlarındaki açil gruplarını koparabilme yeteneğine sahip olup; sonuçta triaçilgliserolleri, gliserol ve serbest yağ asitlerine parçalarlar. Reaksiyonda ana ürün olarak mono- ve diaçilgliseroller meydana gelir. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu sınıfa girerler. Özgüllüğü olmayan lipazlarla yapılan iç esterleşme reaksiyonlarında meydana gelen ürünler kimyasal iç esterleşme reaksiyonlarında oluşan ürünlere bire bir benzerken reaksiyon şartları daha yumuşaktır (23).

1.2.3.2. 1,3-Spesifik Lipazlar

Bu gruba giren lipazlar, nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından özgül olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda triaçilgliserollerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diaçilgliseroller ve 2-monoaçilgliseroller oluşur. 1,2 (2,3)-diaçilgliseroller ve 2-monoaçilgliseroller, kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçilgliserollere ve 2-monoaçilgliserollere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilir ve sonuçta 1,3-bağlarına özgül lipazlar da özgül olmayan lipazlar gibi triaçilgliserolleri gliserol ve serbest yağ asitlerine kadar parçalayabilirler. *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-bağlarına özgüldür. Bu lipazlar, yağ iç esterleşmesinde kullanıldığından elde edilen triaçilgliserollerin karışımı kimyasal iç esterleşme sonucunda elde edilen triaçilgliserollerin karışımından çok farklıdır. Çünkü açil göçü 1 ve 3 pozisyonlarında sınırlandırılmıştır. İç esterleşme reaksiyonları organik fazda gerçekleştiğinden, izomerleşme olamayacağından dolayı triaçilgliserollerin 2- pozisyonundaki açil grubu değişmez ve böylece iç esterleşme olayını kısmen kontrol altında tutma imkânı doğar (23).

1.2.3.3. Yağ Asidi Spesifik Lipazlar

Bu grup lipazlar, triaçilgliserollerdeki bazı yağ asitlerine özgül olup sadece bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar. Yağ asidi özgül lipazlar, iç esterleşme reaksiyonunda kullanılırsa meydana gelecek ürünler çok sınırlı olmakta ve bu sayede amaca uygun triaçilgliseroller sentezlenebilmektedir (54).

Lipazların bazıları, doymamış yağ asitlerinden kısa zincirli olanlara (asetik, butirik, kaprik, kaproik, kaprilik), bazıları ise daha uzun zincirli yağ asitlerine (oleik, linoleik, linolenik vb) ilgi duyar (19). Örneğin, *Geotrichum candidum* tarafından üretilmiş lipazın uzun zincirli bir yağ asidinin özel bir tipinin esterlerinin hidrolizi için birçok özelliğe sahip olduğu bildirilirken (18), grubun üyelerinden *Aspergillus niger* lipazı, maleik asit, süksinik asit, ve aromatik asitlerden benzoik asit, fenil asetik asit gibi asitlerle, gliseridlerin sentezinde başıyla kullanılmıştır.

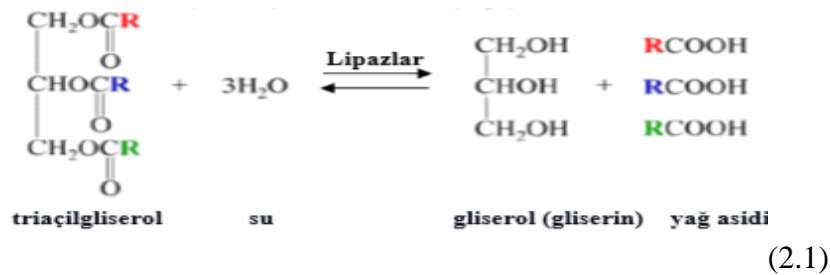
Aspergillus niger ile *Rhizopus delemar* lipazı, değişik yağ asitleri ve bazen dikarboksilik asitlerin oleil alkol esterlerinin sentez reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılmışlardır (53). Ayrıca soya fasulyesinden yağ asidi etil esterlerinin sentez reaksiyonlarında Novozym 435 lipaz enzimi kullanılmıştır (20,55).

1.2.4. Lipazların Enzimatik Etkisi

Lipazlar (trigliserol açılhidrolazlar; E.C. 3.1.1.3), hidrolitik enzimlerden serin hidrolazlar grubunda bulunmaktadır. Hidrolitik enzimler, proteinlerde, lipidlerde ve şeker konjugelerinde bulunan ester ve amit bağlarını hidrolizler ve serin hidrolazlar, sistein hidrolazlar, metalloproteazlar ve aspartil proteazlar olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Serin hidrolazlar grubuna giren enzimler aktif bölgelerinde, serin, histidin ve genellikle aspartik asitten oluşan bir katalitik üçlü taşır. Serin kalıntısı, başlangıç nükleofil görevi görerek ürün oluşumunu katalizler. Serin hidrolazlara örnek olarak kimotripsin, subtilisin ve lipaz verilebilir. Hidrolitik enzimler arasında lipazlar kullanım alanı en geniş enzimlerdir (20).

Lipazlar, sulu ortamda yağların hidrolizini katalizleyerek, diaçilgliserin, monoaçilgliserin, gliserin ve serbest yağ asitlerini oluşturur. Gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar çoğunlukla tersinir özellik gösterir (46,56).

Triaçilgliserollerden gliserin ve serbest yağ asitlerinin oluşumu aşağıda belirtilmektedir.



Lipazların doğal substratları olan uzun zincirli yağ asitlerinin gliserin esterleri suda çözünürlükleri çok azdır. Lipazlar, enzimin çözündüğü sulu faz ve su ile

karişmayan substrat fazı arasındaki ara yüzeyde ester bağlarının hidrolizini katalizler. Lipazların suda çözünen esterlere karşı aktiviteleri oldukça düşüktür (46).

Lipaz katalizli reaksiyonlar iki temel kategoride incelenebilir (57).

1.Hidroliz



2. Sentez

a) Esterifikasyon



b) İnteresterifikasyon



c) Alkoliziz



d) Asidoliziz



Eşitlik (2.4) - (2.6) çoğunlukla transesterifikasyon terimi altında toplanır. Reaksiyon ortamında suyun az olduğu durumlarda interesterifikasyon ana reaksiyondur (46,58). Belirli koşullar altında lipazlar, transesterifikasyon reaksiyonlarının bir numaralı katalizörleridir (59).

Lipazların substrat spesifiklikleri, analitik ve endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Substrat spesifikliği, enzimin moleküler özellikleri ve substratın yapısına bağlı olup, enzimin substrata bağlanmasına etki eden faktörler tarafından kontrol edilir. Lipazlar substrata spesifikliklerine göre üç ayrı grupta incelenir (46,48).

1.2.5. Lipazların Katalizör Olarak Kullanımı

Lipazların biyolojik fonksiyonu, esterlerin özellikle triaçilgliserollerin serbest yağ asidleri ve diaçilgliserol, monoaçilgliserol ve gliserole dönüşümünü sağlayarak hidrolizini katalizlemektir. Lipazlar, susuz organik çözücülerde, iki fazlı sistemlerde ve kiral spesifiteli misel oluşturan çözeltilerde esterifikasyon, transesterifikasyon

(asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz), aminoliz, oksimoliz ve tiyotransesterifikasyon gibi tersinir reaksiyonları da katalizlemektedir (60). Hidroliz (ileri reaksiyon) ve sentez (tersinir) reaksiyonları arasındaki denge, reaksiyon karışımının su aktivitesi ile kontrol edilir (61). Lipazların sayısız uygulama alanı bulunmaktadır. Lipazların rasemik karışım hazırlanması, deterjan sanayi, ilaç sentezi veya yağların biyodönüşümü gibi pek çok endüstriyel uygulamaları bilinmektedir. Bu endüstriyel alanlarda temel olarak 4 işlem (reaksiyon) göz önünde bulundurulmaktadır.

1.2.5.1. Hidroliz

Triaçilgliserollerdeki ester bağlarının toplam hidrolizi, buharın varlığında yüksek sıcaklık ve basınçta elde edilmektedir. Yağ asitleri, basınçlı ortamda sabunlaşma ya da kimyasal olarak katalize edilmiş hidrolizle üretilmektedir. Reaksiyon ortamında aşırı su bulunması durumunda yağların enzimatik olarak ayrılması için lipazların kullanım reaksiyonu, spesifiklik ve atık azalması nedeniyle normal sıcaklık ve basınç altında ilerlediği için daha ilgi çekicidir (62). Su oranının fazla olduğu sulu ortamlarda meydana gelir ve ester hidrolizi baskın olan reaksiyondur (57). Bu teknoloji çoğunlukla yağ asitleri, digliserid, monogliserid, süt ürünleri tatlandırıcısı, ev ve işyerleri için deterjanların üretiminde kullanılmaktadır (62).

1.2.5.2. Esterifikasyon

Susuz çözücüler gibi susuz ortamlarda veya düşük su oranı mevcut bulunan şartlarda esterifikasyon gerçekleşmektedir. Eğer ortamın su miktarı kontrol altına alındığı takdirde yüksek verimli ürünler elde edilebilmektedir (7).

Polihidrik alkoller ve serbest yağ asitleri arasındaki esterifikasyon reaksiyonları, düşük su aktivitesi veya serbest solvent sistem şartlarında, suyu az organik solventlerde lipazlar tarafından katalize edilmektedirler. Ester sentezi kimyasal olarak asit veya baz katalizörlerle yapılabilmesine rağmen, enzim teknolojisiyle beraber; normal şartların avantajlarını, yan etkilerin azalmasını ve spesifikliği sağlamaktadır. Lipaz katalizli ester senteziyle elde edilen yüksek değerli

kimyasallara örnek olarak primer ve sekonder alifatik ve terpenik alkollerin oleik asit esterlerinin üretimi, bütirik asit ve geranolden ya da laurik asit ve mentolden geranil ve metil esterlerin üretimi verilebilir (62).

1.2.5.3. Transesterifikasyon

Transesterifikasyon; bir ester yapısıyla bir asitin (asidoliz), bir esterle başka bir esterin (interesterifikasyon) ya da bir esterle bir alkolün (alkoliz) açıl radikallerinin değişmesi anlamına gelmektedir (62). Diğer bir ifadeyle transesterifikasyon; bir esterin asit kısmı diğer bir yapıyla yer değiştirmesidir. Açıl veren serbest bir asit yapısı ise asidoliz reaksiyonu adını alır. Açıl veren bir ester yapısı ise interesterifikasyon reaksiyonu; açıl alan grup nükleofil içeren bir alkole alkoliz; açıl alan grup bir amin grubu ise de aminoliz reaksiyonu meydana getirmektedir (63). Transesterifikasyon, endüstriyel alanda yüksek sıcaklıklarda susuz esteri ve başka bir tepkeni içeren karışımın ısıtılmasıyla elde edilmektedir. Diğer yöntem ise, daha düşük sıcaklıklarda alkali metallerle kullanılabilir. Transesterifikasyonla katı ve sıvı yağların modifikasyonu için lipazların kullanılması, esterifikasyonda olduğu gibi normal şartların avantajlarını, yan etkilerin azalmasını ve spesifikliğı sağlamaktadır. Örnek olarak kakao yağının üretimi verilebilir. Bu reaksiyon, palmiye yağı ve stearik asit veya palmiye yağı ve tristearolgliserol içeren lipaz katalizli transesterifikasyon reaksiyonları aracılığıyla elde edilmektedir (62).

1.2.5.4. Doğal Olmayan Substratların Katalizi

Lipazların etkinliğı karboksilik asit esterlerinin hidroliz ve sentez reaksiyonları katalize etmekle sınırlı değildir. Nükleofiller olarak su ve alkollerden başka diğer bileşikleri de kullanabilirler. Bu yüzden lipazların organik solventlerde seçici olarak aminoliz, tiyotransesterifikasyon ve oksimoliz gibi farklı reaksiyonları katalize etme gücü vardır. Susuz ortamdaki esterlerin aminolizinde lipazın seçiciliğı başarılı bir şekilde peptid ve yağ amid sentezleri için kullanılmıştır. Bu sonuçlar, optik olarak aktif peptidlerin, polimerlerin, yüzey aktif maddelerin sentezinde ve yeni deterjanların düşük maliyette üretiminde lipaz teknolojisinin kullanımı için ümit vericidir (62).

1.2.6. Lipaz Enziminin Endüstriyel Uygulamaları

Lipazlar çeşitli uygulamaları olan önemli biyokatalizörlerdir. Lipazlar endüstriyel enzim pazarının sadece % 5 ini oluşturmaktadır. Biyoteknolojide önemi de gün geçtikçe artmaktadır (60). Endüstriyel alanlarda kullanılan lipazların çoğu mikrobiyal kaynaklı olmasına rağmen, bitkisel kaynaklı lipazlarda endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (64).

Endüstriyel lipazların çoğu mikrobiyal kaynaklıdır ve genellikle küf mantarları ve bakterilerden elde edilmektedir. Doğal kaynaklardan ekstraksiyonla elde edilen lipazlar daha az araştırılmış bir alandır (7,65).

Lipazların endüstrideki uygulama alanları, reaksiyonlardaki rolü, ürün ve uygulamaları Tablo 1.3’de belirtilmiştir.

Tablo 1.3 Lipazların Endüstriyel Kullanımına Örnekler (7)

| Endüstri Alanı | Görevi | Ürün yada Uygulama |
|---------------------|---|--|
| Deterjan | Triaçilgliserollerdeki yağ asidi dağılımının analizi Yağ lekeleri, damlaları ve lipidlerin giderilmesi | Çamaşır ve ev eşyaları için deterjan |
| Süt ve Süt Ürünleri | Süt yağının hidrolizi | Peynir ve tereyağın tatlandırıcı özelliğinin geliştirilmesi. |
| | Hızlı Olgunlaştırma | Peynir |
| | Yağların Modifikasyonu | Tereyağ |
| Kozmetik | Esterlerin Sentezi | Kiral ara ürünler, Esterler, Emülsiyonlaştırıcılar. |
| Deri | Hidroliz | Deri ürünleri |
| Kağıt | Hidroliz | Kağıdın niteliğinin geliştirilmesi. |

| | | |
|-----------------|---|--|
| Temizlik | Hidroliz | Yağların istenmeyen bölgelerden uzaklaştırılması |
| İlaç | Transesterifikasyon | Sindirim kolaylaştırıcı |
| | Hidroliz | Özel lipidler |
| İçecek | Aromanın arttırılması | İçecekler |
| Yağ | Transesterifikasyon | Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol |
| | Hidroliz | Mono ve di açıl gliseroller |
| Ekmek | Tat Geliştirme | Raf ve kullanım ömrünü uzatma |
| Yiyecek Sosları | Kalite oluşturma | Mayonez ve sos |
| Et ve Balık | Lezzet geliştirme | Et ve balık ürünleri yağı azaltma |
| Kimyasallar | Enantiyo seçimlilik ve Sentez | Kiral yapılandırma blokları ve kimyasallar |
| Tıp | Kanda Triaçilgliserol tayini Tanı amaçlı kullanımı | Rutin Kitler |

1.2.6.1. Yağ ve Oleokimya Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Mucor miehei (IM 20) ve *Candida antarctica* (SP 382) lipazları, organik çözücülerin bulunmadığı ortamda serbest yağ asitlerinin esterifikasyonu veya izopropilden gliserollü heksanda yağ asiti metil esterlerinin transesterifikasyonu için kullanılmışlardır.

Büyük ölçekli işletmelerdeki palm yağının ve tereyağının toplam yıllık dünya çapındaki üretimi sırasıyla, 5,5 milyon ton ve 6,5 milyon tondur. Kakao yağı 37°C'de erime noktası olan yüksek değerli bir üründür. Palm yağının kakao yağına dönüşümü interesterifikasyon ile elde edilebilir. Bu ticari prosesler sayesinde birbirinin yerine kullanılacak ikame ürünler elde edilebilir (22).

Oleokimyasal işlemlerde lipazların kullanılması, alkololizis, asidolizis, hidroliz ve gliserolizis süreçlerinde harcanan ısıyı azaltarak, enerji tasarrufu sağlamaktadır (7).

Oleokimyasal işlemlerde lipazlar, alkoliz, hidroliz ve gliseroliz esnasında termal dereceyi minimuma indirmek ve enerjiyi korumak için kullanılır (1,22,66).

Katı ve sıvı yağlar dünyada yıllık olarak yaklaşık 60 milyon ton seviyesinde üretilmektedir ve bunun önemli bir kısmı (yıllık 2 milyon tondan fazla) hidroliz, gliseroliz ve alkoliz gibi yüksek enerji tüketen proseslerde kullanılmaktadır.

Bazı yüksek değerli çoklu doymamış yağ asitlerinin üretimi ve sabun imalatı için nispeten küçük ölçekli enzimatik yağ ayırma prosesleri hakkında az sayıda bilgi mevcuttur. Örneğin, Japonya'da Miyoshi Oil&Fat Co, firması sabunların üretiminde, *Candida cylindracea* lipazını ticari olarak kullanmaktadır. Şirketler enzimatik metodların üstün bir ürün verdiğini ve bu metodların geleneksel yöntemlerden daha ucuz olduğunu belirtmektedir (22).

1.2.6.2. Biyolojik Olarak Bozunabilir Polimerlerin Üretiminde Lipazların Kullanımı

Lipaz enzimleri organik sentezlerde kullanılan en önemli enzim gruplarından biridir. Lipazların bu alanda yararı doğada kolay bozunabilen bileşiklerin üretiminde biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Lipazlar ester sentezlerini katalizleyebilir ve organik çözücü sistemlerde transesterifikasyon reaksiyonları ile biyobozunur poliesterlerin enzim katalizli üretim olanağını sağlar. Aromatik poliesterler lipaz biyokatalizi ile sentezlenebilirler.

1.2.6.3. Tekstil Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Lipazlar, tekstil endüstrisinde ve boyama için pürüzsüz yüzey oluşturmak, daha kaliteli emiciliğe sahip kumaş elde etmek için ve yağlı maddelerin giderilmesine yardımcı olmak amacıyla kullanılmaktadır. Lipazlar kot taşlama

(kumlama) sistemlerinde, çizgi ve kat izi oluşumunu azaltmak amacıyla kullanılır. Kot ve diğer pamuklu kumaşların sökümü için karışım halinde alfa amilaz ve lipaz enzimlerini içeren ürünler kullanılmaktadır (22).

1.2.6.4. Deterjan Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Yağları hidroliz edebilme yeteneklerinden dolayı lipazlar, endüstriyel olarak veya evlerde kullanılan deterjanlara eklenmektedir. Düşük substrat özgüllüğü, yıkama koşullarına (pH: 10.0-11.0, 30-60°C) dayanabilme yeteneği ve birçok deterjanın formülasyonunda yer alan çeşitli enzim ve surfaktanlara dayanıklılık; deterjan endüstrisinde kullanılacak lipazlar için aranan özelliklerdir (7). Biyolojik deterjan üretimi hızla büyüyen bir teknolojidir. Lipaz, amilaz, proteaz ve selüloz deterjanlara katılan başlıca enzimlerdir. Lipazlar, deterjan içeriğine yağlı yemek kalıntılarını temizlemek üzere katılırlar. Bu enzimler deterjanlara genellikle proteaz ve selülozla birlikte eklenirler. Peroksidaz, oksidaz ve pektinaz deterjanlara eklenebilen diğer enzimlerdir (67).

Bir fungus türü olan *Thermomyces lanuginosus* kökenli lipaz, *Aspergillus oryzae*'de eksprese edilmiş ve ilk ticari rekombinant lipaz olarak 1994 yılında Novo Nordisk tarafından üretilmiştir. “Genencor International” firması 1995 yılında, *Pseudomonas mendocina*'dan Lumafast ve *Pseudomonas alcaligenes*'den “Lipomax” isimli iki bakteriyel lipaz üretmiştir. 1998 yılında *Pseudomonas alcaligenes* M-1 suşundan elde edilen, modern çamaşır makinelerinde kullanılabilen ve yağ lekelerini oldukça iyi çıkaran, alkali bir lipaz rapor edilmiştir (7). Trigliseritlerin kimyasal kullanım alanlarından birisi sabun üretimidir. Bugün için tercih edilen kimyasal yöntemde sabun üretimi, yağın içeriğinden bağımsız olarak 100 °C'de birkaç dakika içinde yüksek verimde gerçekleşmekte, enerji tüketim döngüsü ile en aza indirgenmektedir. Bu süreç kullanılarak yılda yaklaşık 2 milyon ton sabun üretilmektedir. Japonya'da Miyoshi Yushi fabrikasında sabun üretimi, *Candida rugosa* lipazı kullanılarak katı ve sıvı yağların hidroliz edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (67).

Hidrolitik lipazların ticari olarak endüstriyel çamaşırhane ve evlerdeki bulaşık makinelerinde deterjanlara katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Lipazlar; kızartma yağı, salata yağı, tereyağı, yağ temelli soslar, çorbalar ve belirli kozmetikler gibi kaynaklardan oluşan yağ içeren lekeleri gidermek için deterjan yapılarında kullanılmaktadır (22).

Lipazların deterjan üretiminde kullanılması aşağıda belirtilen özellikler açısından avantaj oluşturur (22, 23, 68).

- Düşük yıkama sıcaklıklarında deterjanların kullanımına imkan vererek enerji tasarrufu sağladığından deterjanların çevresel yükünü azaltmaktadır.
- Genellikle deterjanlarda daha az olması istenilen kimyasalların azaltılmasına imkan sağlamaktadır.
- Biyolojik olarak parçalanabilir ve zararlı kalıntı bırakmaz. Ayrıca kanalizasyon arıtma tesislerinde olumsuz etkisi yoktur ve sucul yaşam üzerinde herhangi bir riski mevcut değildir.
- Yüksek pH (10-11) ve yüksek sıcaklıklara (30-60°C) dirençlidirler.
- Zarar verici yüzey aktif maddelere ve enzimlere dayanabilme yeteneği sahiptirler.

Lipaz kumaş yüzeylerinin ıslanılabilirliğini düzeltmek ve yüzeylerden yağ giderimini kolaylaştırmak için tutuklanır. Çamaşırın yıkanması süresinde kumaştan lekeyi çıkarma dayanıklılığına sahiptir (69).

Deterjanlarda kullanılmak üzere ticari olarak üretilen lipaz kaynaklı bakteriler *Aspergillus oryzae*, *Acinetobacter radioresistens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes* ve maya cinsi olan *Candida* ve *Chromobacterium* lipazlarıdır (22).

1.2.6.5. Gıda Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Katı ve sıvı yağlar gıdaların önemli bileşenleridir. Trigliseritlerin fiziksel özellikleri, besin değeri ve lezzeti; gliserol omurgasındaki yağ asidinin konumundan,

zincir uzunluğundan ve doymunluk derecesinden etkilenir. Lipazlar, gliserol omurgasındaki yağ asidi zincirinin konumunu değiştirerek, lipitlerin özelliklerinin değişimine olanak sağlar. Göreceli olarak ucuz olan bu yöntem, yağın daha değerli bir yağa dönüşümüne olanak tanır (7). Metabolik etkilerinden dolayı doymamış yağ asitleri son zamanlarda, eczacılıkta ve gıda katkılarında giderek artan miktarlarda kullanılmaktadır. Doymamış yağ asitlerinin çoğu, membran lipitlerinin ve prostoglandinlerin normal sentezi için gereklidir. Mikrobiyal lipazlar, menhaden, tuna ve borage yağı gibi hayvansal ve bitkisel yağlardan, doymamış yağ asitlerinin elde edilmesinde kullanılır. Serbest doymamış yağ asitleri ve onların mono ve diğliseritleri; kolesterol düzeyini düşüren, iltihabı ve kanın pıhtılaşmasını engelleyen çeşitli ilaçların üretilmesinde kullanılırlar. Lipazlar ayrıca peynirlerde istenen lezzetlerin elde edilmesinde, geleneksel kimyasal esterifikasyon reaksiyonları ile elde edilemeyen modifiye açilgliserollerin, sıvı ve katı yağlardan interesterifikasyon ile elde edilmesinde kullanılır. Bu enzimlerden ayrıca balık ve et ürünlerinden yağların uzaklaştırılmasında yararlanılır (7).

Yağlar ve yağ asitleri gıdaların önemli bileşenlerindedir. Lipazlar, trigliseridlerdeki yağ asitlerinin yerlerini değiştirerek hem lipidlerin özelliklerinin değiştirilmesi hem de arzu edilen lipidlerin elde edilmesi sağlanmaktadır (20,22,70). Bu işlemlerden sonra uygun hale getirilmiş bitkisel yağlar, gelecekte piyasada büyük bir potansiyele sahip olacaktır (22).

Lipazlar, tat ve güzel koku bileşikleri olarak bilinen kısa zincirli yağ asitleri ve alkollerin esterlerinin sentezi ile lezzeti geliştirmek için gıdalara eklenerek kullanılmaktadır (22).

Lipazlar, daha önceleri balık gibi yalın (yağsız) et üretiminde kullanılmıştır. Balık etinin işlenmesi sırasında lipaz ilave edilerek katı yağ giderilmekte ve bu işlem biyolipoliz olarak adlandırılmaktadır (22,71). Özellikle mikrobiyal kaynaklı lipazların, ringa balığı yağı, tonbalığı yağı ve hodan yağı gibi yağlardan çoklu yağ asitleri elde etmek için kullanılmaktadırlar (72,73).

Çikolata ve benzeri ürünlerde bulunan yağların 37°C'de erimesi aranan bir özelliktir. Lipaz enzimlerinin katalizlediği hidroliz ve sentez reaksiyonları sayesinde bu yağların yerine başka yağlar da kullanılabilir. Örnek olarak palmye yağındaki palmitik asidin stearik asitle yer değiştirmesi, immobilize edilmiş *Rhizomucor miehei* lipazı ile transesterifikasyon reaksiyonu sayesinde gerçekleşmektedir (7,74).

Tereyağın lipaz katalizörlü interesterifikasyon reaksiyonu ile uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin yerine doymamış yağ asitlerinin geçmesi de sağlanmaktadır (7).

Lipazlar, içkilere katkı maddesi, peynir mayalamada lezzet artırıcı ayrıca et ve balık ürünlerinden yağların uzaklaştırılmasında yardımcı olarak kullanılmaktadır (69,71).

Lipazlar, sosis üretiminin fermentatif adımlarında ve olgunlaşma sırasında serbest kalan uzun zincirli yağ asitlerindeki değişikliklerin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Daha önceleri farklı mikrobiyal kökenli lipazlar, rafine edilen pirincin lezzetlendirilmesinde, soya sütünün modifiye edilmesinde ve elma şarabının fermantasyonunun hızlandırılmasında ve aromasının iyileştirilmesinde kullanılmıştır (22).

Lipazlar süt yağının hidrolizi için süt endüstrisinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Günümüzdeki uygulamaları; peynir gibi ürünlerin imalatı, peynirlerin lezzetinin artırılması, peynir olgunlaşmanın hızlandırılması ve tereyağı ve kremanın lipolizini içerisine almaktadır. Lipazlar, krema tadı ve şekerleme ve karamelin tereyağlı dokusunu elde etmek için kahve kremalarında süt tadı elde etmek amacıyla kullanılmıştır.

Ayrıca fırıncılarda; ekmeklerin raf ömrünü arttırmak, enzimatik olmayan esmerleşmenin iyileştirilmesini ve kontrolünü yapmak, ekmek hacmini arttırmak ve ekmek iç yapısını geliştirmek için imkan sağlamaktadır (22,75).

1.2.6.6. Rasemik Karışımların Ayırıştırılmasında Lipazların Kullanımı

Lipazlar, birbirleriyle karışmayan tek fazlı çeşitli rasemik organik asit karışımlarının ayırıştırılmasında kullanılmaktadır (52). Ayrıca tıbbi ilaçlar, zirai ilaçlar ve pestisitlerin kiral yapı bloklarının sentezi için kullanılmaktadır (22).

Farklı orijinlerden türeyen bazı lipazlar, polar olmayan organik çözücülerde oldukça kararlıdır (56). Bu sebeple stereospesifik hidroliz yoluyla rasemik karışımların ayırıştırılması gibi suda çözünmeyen esterlerin hidrolizinde kullanılabilirler.

Tıbbi ve zirai ilaç üretiminde kiral alıcılar ve hassas kimyasallara yüksek miktarda bir talep vardır. Örneğin, ağrı tedavisinde kas gevşetici olarak kullanılan Baklofenin üretiminde *Candida cylindracea* lipazı kullanılmaktadır. Bu ve benzeri durumlardan ötürü lipazlar optik olarak aktif maddelerin hazırlanması için dünyada birçok farmakoloji firması tarafından kullanılmaktadır (22).

1.2.6.7. Kozmetikte Lipazların Kullanımı

Lipazlar, sürfaktanlar ve aroma üretimindeki aktivitelerinden dolayı kozmetik ve parfüm endüstrisinde başlıca yapı bileşeni olarak kullanılmaktadır. Monoaçilgliseroller ve diaçilgliseroller, gliserolün lipazlar tarafından katalize edilen esterifikasyon reaksiyonları sonucu elde edilen ve kozmetikte kullanılan sürfaktanlardır. Karışık asit poliesteri ve açilgliserol ester yağ asitleri, lipaz aracılığıyla üretilen kozmetiklerin ana bileşenleridir (1).

Örneğin; Unichem International (İspanya) cilt ve güneş kremleri, banyo yağları gibi kişisel bakım ürünlerinde yumuşatıcı olarak kullanılmak üzere; izopropil miristat, izopropil palmitat ve 2-etilheksil palmitat üretmektedir. Bu işlemden tutuklanmış *Rhizomucor meihei* lipazı biyokatalizör olarak kullanılmaktadır.

Retinoidler (A Vitamini ve türevleri), cilt bakım ürünleri gibi kozmetik ve suda çözünen retinol türevleri, tutuklanmış lipazın katalitik reaksiyonu ile hazırlanmıştır (22).

1.2.6.8. Tanı Aracı Olarak Lipazların Kullanımı

Lipazlar, sağlık sektöründe ilaç hedefleri veya tanı koymak amacıyla kullanılmaktadırlar ve onların varlığı ya da artan seviyesi bazı enfeksiyon veya hastalıkları göstermektedir (22).

Yetişkin bireylerde kandaki lipaz değeri 10-73 U/L arasındadır. Lipaz testi, kandaki lipaz enziminin seviyesini ölçer. Lipaz testi nadiren de olsa vücut sıvılarında ve idrarda da yapılmaktadır. Vücutta başlıca pankreasta üretilen besinlerle alınan yağların sindiriminde kullanılan bir enzimdir. Enzimin kandaki seviyeleri pankreas bezi ile ilgili sorunlarda tanı koymada veya düşünülen tanıyı ekarte etmede yardımcı olur. Amilaz testi ile beraber de kullanılan test, pankreas hastalıkları için tanı koymada amilaza göre daha üstündür. Bu değer sonucunda pankreas iltihabı, pankreas kisti, safra kesesi taşları, safra kesesi iltihabı, böbrek hastalıkları ve kistik fibrozis gibi hastalık durumları düşünülebilir (74).

1.2.6.9. Medikal Uygulamalarda Lipazların Kullanımı

Lipazlar yağ sindirimine yardımcı olarak kullanılabilirler. Lipazlar, tümör nekroz faktörü (TNF) aktivatörleridir ve bu nedenle kötü huylu tümörlerin tedavisinde faydalanılabilir. Gastrointestinal sistem bozuklukları, dispepsi, sindirim sistemi alerjilerinin derideki belirtileri gibi hastalıkların tedavisinde lipazlar eskiden terapötik (iyileştirici) olarak kullanılmıştır (22).

Candida rugosa lipazı serum kolesterol düzeyini düşüren bir ilaç olan lovastatini sentezlemek için kullanılmıştır. Koroner vazodilatör (damar genişletici) olarak yaygın bir şekilde kullanılan diltiazem hidroklorid sentezinde anahtar aracı ürün olan 3-fenilglisidik asit esterinin asimetrik hidrolizi *Serratia marcescens* lipazı ile gerçekleştirilmiştir (76).

1.2.6.10. Biyosensör (Biyoalgılayıcılar) Olarak Lipazların Kullanımı

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir duyargacı bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analiz edilecek madde miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. Biyosensörler; biyolojik, kimyasal, biyokimyasal ve elektronik bileşenlerden oluşur (77,78).

Biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerin enzim katalizli ayrışmasına dayalı biyosensörler geliştirilmiştir. Lipazlar glukoz oksidaz ile kombinasyonunda pH/oksijen elektrotları üzerine tutuklanabilir ve lipit biyosensörler olarak bu fonksiyon trigiseridlerin ve kan kolesterolünün tayininde kullanılabilir (22).

1.2.6.11. Deri Temizlemede (Yağ Gidermede) Lipazların Kullanımı

Lipazlar, yağ uzaklaştırılmasında çevresel olarak daha güvenilirdir. Deri işlemeciliğinde; deri altındaki yağların uzaklaştırılması ve kılların yok edilmesi gerekir.Yağ alma işlemi özellikle büyükbaş ve küçükbaş hayvanların derileri gibi yağlı ham materyallerin proseslenmesinde önemli bir aşamadır (1,22). Lipaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimleri içeren enzim karışımlarıyla, deri işlemeciliğinde yeni bir yol kabul edilmektedir. Derinin, içinde su bulunan bir küvete alınarak yıkanması ve kıllarından arındırılmasını içeren yeni bir enzimatik yöntemle, deri tabaklamaya hazır hale getirilir. Ortam pH'sının 8.0-13.0 aralığında olduğu küvetlerde, alkali lipaz kullanılmaktadır. Tabaklama işlemi bazik ortamda yapılır. Bu yüzden alkalofilik mikroorganizma kaynaklı enzimler, bu tip uygulamalarda daha kullanışlıdır. Yüksek alkali koşullarda büyüeyebilen ve enzimleri deri işlenmesinde kullanılmak üzere elverişli olan birçok Bacillus türü bulunmuştur. Alkalen lipazlar; alkalen/nötral proteazlar ve sürfaktan içeren bir karışım içinde kullanılabilirler (1). Alışlagelmiş yöntemler, uçucu organik bileşik emisyonları gibi çevre sorunları ortaya çıkmasına neden olabilen organik solventler ve sürfaktanların kullanılmasıdır. Lipaz kullanmanın başlıca avantajları, daha üniform renk ve daha temiz bir görünümdür. Lipazlar ayrıca hidrofobik su geçirmez deri üretimini sağlamada

kullanılırlar. Ayrıca araçlar için döşemelik deri kalitelendirmesi içinde kullanılabilirler (22).

1.2.6.12. Çevre Yönetiminde Lipazların Kullanımı

Atıkların yok edilmesi için yapılan biyoremediasyon (Toksifikasyonu önlemek ve çevresel kirliticileri parçalamak için mikroorganizmaların kullanımı esasına dayanır) çevre kirliliğinin bertarafında ve önlenmesinde etkili bir biyoteknolojik yaklaşım olarak önem kazanmaktadır (1,79). Çeşitli kaynaklardan elde edilen lipazlar kullanılarak, yağlı atıklar ve yağ kalıntıları temizlenebilmektedir (1).

Lipazlar ayrıca atık suların arıtılmasında geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca kesimevleri, gıda işleme endüstrisi, deri endüstrisi, kümes hayvanlarının atıklarını işleme gibi endüstriyel proseslerde de gereklidir. Geliştirilen bir teknoloji ile fabrikalarda atık suların arıtımı sırasında oluşan tortulardan biyogaz elde edilmektedir. Bu teknolojiye, içinde lipazın da yer aldığı enzim karışımları kullanılmaktadır. Hem *Pseudomonas aeruginosa* LP602 hücrelerinin ve hem de lipazın lipidçe zengin atıksuların arıtımında kullanışlı olduğu görülmüştür. Başlıca trigliseridleri içeren atıksu arıtma tesislerindeki yağlar genellikle tutuklanmış lipaz ile hidrolize edilebilir.

Restoran yağ atıklarının basit alkil ester türevleri biyokatalizör olarak tutuklanmış lipaz kullanılarak hazırlanmıştır. Lipazlar yağ fabrikalarının atık sularına karışan zeytinyağı gibi yağların yok edilmesi için de kullanılmaktadır. Bu işlem, atıkların içinde lipaz üreten mikroorganizmaların üretilmesiyle gerçekleştirilmektedir. *Pseudomonas cepacia*'dan elde edilen lipazın, gresin metanoliz ve etanoliz olaylarını katalizlemede en etkili olduğu bulunmuştur. Ağırlıkları ile eşit oranlarda proteaz, lipaz ve selülazın içeren endüstriyel bir karışım, toplam askıda katı maddede %30-50'lik bir azalma ve çamurdaki katıların çökmesini sağlamıştır.

Bitki, bakteri ve hayvan (pankreatik) orijinli lipazlar mezbaha atıksularındaki yağ partiküllerinin boyutunu küçültmek ve/veya hidrolize etmek için de kullanılmaktadır (1,22).

1.2.6.13. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Ağacın hidrofobik içeriği olarak tanımlanan trigliseritler ve mumlar, kağıt hamuru ve kağıt yapımında sorun yaratmaktadır. Lipazlar kağıt yapımı için kullanılan kağıt hamurundan belirtilen maddelerin uzaklaştırılması için kullanılır (7,49).

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrileri, her yıl yüksek miktarda lignoselülozik maddeyi işleyip kullanmaktadır. Kağıt hamuru imalatı için teknoloji oldukça fazladır ve mikrobiyal enzimlerin kullanılmasına imkan vardır (22). Tarihsel olarak enzimlerin kağıt endüstrisinde bazı kullanım alanları mevcuttur. Kağıt endüstrisinde enzim kullanımının tarihsel gelişimi Tablo 1.4'te gösterilmektedir (80).

Tablo 1.4 Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımının Tarihsel Gelişimi (80)

| Yıl | Gelişme | Araştırmacılar |
|------|--|-------------------------------|
| 1959 | Selülaz ile hamur fibrilleşmesi | Bolaski ve arkadaşları, 1956 |
| 1984 | Ksilaz ile enzimatik dövme | Combat ve arkadaşları, 1984 |
| 1984 | Ksilaz ile çözülebilir hamurdan hemiselüloz uzaklaştırma | Paice ve Juraski, 1984 |
| 1986 | Ksilaz ile ön ağartma | Viikari ve arkadaşları, 1986 |
| 1988 | Selülaz ile kağıt eleğinde drenaj artırılması | Fuentes ve Robert, 1988 |
| 1988 | Selülaz ile vessel sekmesinin azaltılması | Unhimoto ve arkadaşları, 1988 |
| 1989 | Lipaz ile kirlilik kontrolü | Irie ve arkadaşları, 1989 |
| 1991 | Selüloz ve Ksilaz ile mürekkep giderme | Kim ve arkadaşları, 1991 |

| | | |
|------|---------------------------|---------------------|
| 1993 | Lakkaz ile lignin giderme | Call ve Mülke, 1993 |
|------|---------------------------|---------------------|

Lipaz kullanılan enzimatik seviye kontrol yöntemi, büyük ölçekli kağıt yapma proseslerinde rutin bir işlem olarak 1990'ların başından beri kullanılmaktadır.

Lipazın atık kağıtlardaki mürekkebi gidermede kullanılması (22,81); hamur elde etme hızının yükselmesini, beyazlık ve yoğunluğunun artmasını, kimyasal kullanımının azalmasını, ekipman ömrünün uzamasını, atık suyun kirlilik seviyesinin azalmasını, enerji ve zamandan tasarrufu sağlamaktadır (22). Ayrıca kağıt endüstrisinde üretilen kağıt hamurundan katranı ayırmakta lipaz kullanılır. Katran, kağıt hamuru ve kağıt üretiminde ciddi sorunlara sebep olan trigliseridler ve balmumu olarak adlandırılan ağacın hidrofobik bileşenlerini tanımlamak için kullanılır (49).

1.2.6.14. Biyodizel Üretiminde Lipazların Kullanımı

Sınırlı (ve hızla azalan) fosil yakıt kaynakları, artan ham petrol fiyatları ve çevresel kaygılar gibi çeşitli nedenlerle alternatif bir enerji kaynağı olan biyodizelin önemi günden güne artmaktadır. Biyodizel yakıtı, bitkisel yağlardan (kanola, soya ve aspir gibi) çeşitli bitkiler kullanılarak kimyasal yollarla üretilmektedir (22,82,83).

Bitkisel yağdan üretilen biyodizel yakıt, kükürt oksit üretmez ve petrol ile karşılaştırıldığında biyodizel kullanımlarında açığa çıkan partikül miktarı %47 daha azdır. Bu çevresel avantajları nedeniyle, biyodizelin geleneksel dizel yakıtları yerine kullanımını artması ümit edilebilir (22,84).

Biyodizel üretiminde kimyasal katalizörlerin kullanımı yüksek reaksiyon hızı ve dönüşüm için endüstride tercih edilir. Ancak; ayırma işlemlerinin maliyeti, oluşan yan ürünlerin giderilmesindeki zorluklar sebebiyle alternatif üretim yöntemleri araştırılmaktadır. Lipazlar yardımıyla gerçekleştirilen enzimatik transesterifikasyonda hem son ürün olarak çıkan gliserolün kolayca ayrılması hem de yüksek saflıkta ürün elde edilmesi biyodizel üretiminde önemli bir yöntemdir (85).

Yapılan bir çalışmada tutuklanmış *Pseudomonas cepacia* lipazı metanol ve etanol ile soya yağının transesterifikasyonunda kullanılmıştır. Başka bir çalışmada yağ asidi etil esterleri katalizör olarak iki ticari lipaz, Novozym 435 ve Lipozyme IM, çözücü olarak n-hekzan kullanılarak hint yağından hazırlanmıştır. Ayrıca Novozym 435, çözücü ortamda biyodizel üretimi için ham soya yağının transesterifikasyonunu katalizlemek için kullanılmıştır (22).

1.2.7. Lipazların Çeşitli Kaynaklardan Saflaştırılması

Lipazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur (41,86-88). Ticari olarak kullanımı yaygın olan hayvansal kaynaklı (genellikle sığır ve domuz) lipazlardır. Bu lipazlar üzerinde en çok araştırma yapılan enzimdir (89,90). Ayrıca hayvansal lipaz elde edilen kaynaklar memeli gastrik, pregastrik, ruminantların mide içinde üretilen lipazları, balık ve omurgalıların sindirim lipazları, lipoprotein lipazları, doku lipazları ve süt lipazlarıdır (91).

Lipazların farklı hayvan dokularında dağılmış olan enzimlerdir (23). Yapılan çalışmalarda lipaz sıçanın kas dokusundan, kalbinden, karaciğerinden (92-94); balık karaciğerinden, morina balığı pankreasından (95,96); at, hindi, sığır, keçi, deve ve tavuk pankreasından (97,98); sığır aortu ve sütünden (94,99,100) farklı yöntemlerle saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiştir.

İnsan dokularında bulunan lipazlar Tablo1.5’de kısaca özelliklerine değinilerek gösterilmiştir.

Tablo 1.5 İnsanlarda Bulunan Lipazlar (101)

| Ad | Gen | Konum | Tarif | Bozukluk |
|-----------------|-------|-----------------|--|---|
| Panreatik Lipaz | PNLIP | Sindirim Sıvısı | En iyi enzim etkinliğini elde etmek için panreatik lipaz, pankreas tarafından salgılanan, kolipaz adlı başka bir proteine gerek duyar. | Eğer panreatik lipaz düzeyi fazla artarsa pankreatit gelişir pankreas iflas eder. |

| | | | | |
|------------------------------------|---------------------|-----------------|--|---|
| Lizozomal lipaz | LIPC | Endotel | Hepatik lipaz, kandaki lipoproteinlerdeki lipitler üzerine etkir, düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) oluşturur. | - |
| Lipoprotein Lipaz | LPL veya LIPD | Endotel | Lipoprotein lipaz, tarafından taşınan trigiseridleri hidroliz ederk hücrelerin yağ asitleri elde etmelerini sağlar. | Lipoprotein lipaz eksikliği lipoprotein lipaz genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. |
| Hormon Duyarlı Lipaz | LIPE | Hücre İçi | - | - |
| Gastrik Lipaz/ Lingal Lipaz | LIPF | Sindirim Sıvısı | Nötr pH'de lipidlerin sindirimine yardım etmek için bebeklerde bulunur. | - |
| Endotel Lipaz | LIPG | Endotel | - | - |
| Panreatik Lipaz İlişkili Protein 2 | PNLIPRP2 veya PLRP2 | Sindirim Sıvısı | - | - |
| Panreatik Lipaz İlişkili | PNLIPRP1 veya PLRP1 | Sindirim Sıvısı | Pankreatik lipaz ilişkili protein 1; Pankreatik lipaz ilişkili protein 2 ve pankreatik lipaza amino asid dizisi olarak çok benzer (3 gen muhtemelen atasal bir pankreatik lipaz geninin, gen ikileşme olayları ile türediler.) | - |

Lipazlar mikrobiyal ve hayvansal kaynakların dışında insan dokularından da saflaştırılarak yukarıdaki tabloda görüldüğü üzere genlerindeki dizilime kadar açıklanmıştır (101). Ayrıca İnsan sütlerinden lipoprotein lipazı, eritrositlerinden membrana bağlı monoasilgliserol lipazı ve karaciğerinden ise lipoprotein lipazı saflaştırılmıştır (102-104).

Lipazın mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmakta olup, bu çalışmalarda kullanılan saflaştırma yöntemleri farklılıklar bulunmaktadır. Ticari lipazlar genelde mikrobiyal kaynaklıdır. Lipaz üreten mikroorganizmalar bakteriler, funguslar ve mayalardır (48).

Tablo 1.6 Bakteriyel Lipaz Kaynakları (7,105,106)

| Kaynak | Cins | Tür |
|---------------|---------------------------------|--|
| Bakteri | Bacillus | <i>Bacillus megaterium</i> |
| | | <i>Bacillus cereus</i> |
| | | <i>Bacillus stearothermophilus</i> |
| | | <i>Bacillus subtilis</i> |
| | | <i>Bacillus thermocatenulatus</i> |
| | | <i>Bacillus brevis</i> |
| | | <i>Bacillus acidocaldarius</i> |
| | | <i>Bacillus coagulans</i> |
| | Staphylococcus | <i>Staphylococcus canosu</i> |
| | | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| | | <i>Staphylococcus hyicus</i> |
| | | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| | | <i>Staphylococcus warneri</i> |
| | Aeromonas | <i>Aeromona hydrophila</i> |
| | | <i>Aeromona sorbia LP004</i> |
| | Acinetobacter | <i>Acinetobacter pseudoalcaligenes</i> |
| | | <i>Acinetobacter radioresistens</i> |
| | Chromobacterium | <i>Chromobacterium viscosum</i> |
| | Pseudomonas | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | | <i>Pseudomonas fragi</i> |
| | | <i>Pseudomonas mendocina</i> |
| | | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| | Burkholderia | <i>Burkholderia glumae</i> |
| | Propionibacterium | <i>Propionibacterium acne</i> |
| | | <i>Propionibacterium granulosum</i> |
| | Micrococcus | <i>Micrococcus freudenreichii</i> |
| | | <i>Micrococcus luteus</i> |
| | Stereptococcu | <i>Stereptococcu lactis</i> |
| Lactobacillus | <i>Lactobacillus delbruckii</i> | |

Tablo 1.7 Fungal Lipaz Kaynakları (7,105,106)

| Kaynak | Cins | Tür |
|-----------|------|-------------------------------|
| Funguslar | | <i>Rhizopus delemar</i> |
| | | <i>Aspergillus niger</i> |
| | | <i>Penicillium roqueforti</i> |
| | | <i>Geotrichum candidum</i> |
| | | <i>Humiloca lanuginose</i> |

| | | |
|-----------------------------|---------------|---------------------------------|
| | | <i>Mucor lipolyticum</i> |
| Mayalar | Saccharomyces | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| | Candida | - |
| | Torulopsis | <i>Torulopsis ernobi</i> |
| | Rhodotorula | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| | | <i>Rhodotorula rubra</i> |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | | |
| | | <i>Rhodotorula pilimanae</i> |

Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, veriminin yüksek olması, genetik oynamalarla yeni ve farklı mikroorganizma üretme imkanı ve maliyet açısından üretiminin ve üretme ortamının kolay olmasıdır (107). Mikrobiyal lipazlar büyük miktarlarda üretilebildiklerinden endüstriyel açıdan hayvansal ve bitkisel lipazlardan daha önemlidirler (108).

Ticari anlamda ilk lipaz üretimi, 1994 yılında Novo Nordisk firması tarafından üretilen *Thermomyces lanuginosus* (fungi) orijinli *Aspergillus oryzae* lipazıdır. 1995’de Genencor International firması tarafından iki bakteriyel lipaz üretilmiştir (7).

Tablo 1.8 Endüstriyel Olarak Önemli Lipaz Üreten Firmalar (109)

| Lipaz Üreticisi | Firma |
|---------------------------------|------------------------------|
| <i>Achromobacter sp.</i> | Meito Sangyo |
| <i>Alcaligenes sp.</i> | Meito |
| <i>Arthrobacter sp.</i> | Sumitomi |
| <i>Aspergillus niger</i> | Amano, Novo, Röhm |
| <i>Candida cylindraceae</i> | Amano, Enzyme Dev. Co. Meito |
| <i>Chromobacterium viscosum</i> | US Biochemicals, Toyo Lozo |
| <i>Humicola lanuginosa</i> | Amano, Novo |
| <i>Mucor miehei</i> | Amano, Gist, Röhm, Novo |
| <i>Phycomyces nitens</i> | Takedo |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | Amano |

| | |
|--------------------------------|---|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Amano |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Amano |
| <i>Rhizopus sp.</i> | Serve, Negase |
| <i>Rhizopus arrhizus</i> | Precibio (France), Boehringer-Mannheim, Rapidase, Gits-Brocades |
| <i>Rhizopus delemar</i> | Cheminal Dynamics, Tanabe |
| <i>Rhizopus japonicus</i> | Amano, Negase, Osaka Saiken Lab |
| <i>Rhizopus niveus</i> | Amano |

Bitkisel yağlı tohumlarda lipaz izolasyonu ve saflaştırılması üzerine yapılan çalışmalar neticesinde lipazlar elde edilmiştir (23,24,91). Bitkilerde lipazlar enerji depolayan dokularda bulunmaktadır (7,110). Oda sıcaklığında aktivitesinin yüksek olması, temininin kolay ve ucuz olması nedeniyle endüstri alanlarında bitkisel kaynaklı lipazlar da kullanılır (111).

Bitkilerin farklı kaynaklarından lipaz izolasyonu çalışmaları da aşağıda toplanmıştır. Bir grup bilim adamı buğdayda lipaz çalışması olarak başlangıç yapmıştır (112). Buğday ve buğday kepeğinde lipolitik aktivite ve lipaz aktivitesi çalışılmıştır (113). Buğdayda aktif grupları belirleme çalışmasında esteraz ile lipaza yer verilmiştir (114). Badem tohumu (115,24), fındık tohumu (116,117), pirinçteki lipolitik aktivitenin çoğunluğu pirinç kepeğinde bulunur. Isıya karşı kararlı bir lipaz pirinçte tanımlanır (43,100). Kayısı tohumu (23), yer fıstığı depo dokusunda (118), ayçiçeği (119,120), hindistan cevizi (121), amerikan fıstığı tohumu (122), yulaf tohumu (123,124), Fransız fıstığı (125), çörek otu (126,127), defne (128), mısır tohumu (129,130), çimlenmiş susam (131), acıbakla (132), arpa tohumu (133), sorgum (134,135), keten tohumu (136), gibi bitkilerden lipaz eldesiyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca ağaçların değişik türlerinden de lipaz elde edilmiştir. Bu yönde Teksas'tan Kuzey Kaliforniya'ya kadar uzanan kıyı şeridinde yetişen *Sapium sebiferum* L.'den (Çin don yağı ağacı) lipaz elde edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır (80).

1.3. Papatya Hakkında Genel Bilgiler

Papatya bilimsel sınıflandırmada çiçekli bitkilerin en fazla türe sahip ailesi olarak bilinen *Asteraceae* ailesine ait bir türdür (137).

Mayıs papatyası *Asteraceae* (*Compositae*) familyasından olup, bu familya bitkilerinin çoğu otsu, az bir kısmı çalı veya ağaçtır. Familya 1000'e yakın cins ve 20.000'e yakın türü ile çiçekli bitkilerin en zengin familyasındandır. Memleketimizde 133 cins ve 1156 türü bulunmaktadır (138). *Asteracea* ailesinin halk hekimliğinde kullanılan birçok türü mevcuttur. Bu çalışmada kullanılan papatya (*Matricaria chamomilla*) ülkemizde Mayıs papatyası olarak bilinir.

Dünya'da Güneydoğu Avrupa, Kuzeybatı Asya, Kuzey ve Doğu Afrika'da, Kuzey Asya ve Hindistan'da yetişen farklı türdeki papatyalar, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde de yetişmektedir. Papatya boyu 25 santimetreye kadar uzayabilen, Nisan-Eylül aylarında çiçek açan, bir yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları ince parçalı ve sapsızdır. Çiçeğinin orta kısmı sarı, kenarları beyaz renklidir. Yaz aylarında toplanıp, kurutulup nemsiz yerde saklanması gerektiği rapor edilmiştir (139).

Adi papatya, Ak baba, Ak babacca, Ak babaç, Ak bubaç, Ak bubeşçe, Babuçça, Babunç, Bebisce, Bobaççe, Boğaz çiçeği, Bubaçça, Bubeççe, Bubeşçe, Kelkız çiçeği, Mayıs papatyası, Tıbbi papatya, Beyaz papatya, Sarı papatya, Kuzugözü papatya, Akbaş otu'nun papatyaya verilen mahalli isimler olduğu bildirilmiştir. E. Sezik ve arkadaşlarının Türkiye'de Halk ilacı olarak kullanılan bitkiler üzerinde yaptıkları çalışmalarda, halk arasında *Matricaria recutita* (*Syn: Matricaria chamomilla*) bitkisinin yanında çeşitli *Anthemis*, *Chrysanthemum* ve *Tripleurospermum* türlerine de "papatya" adı verildiği tespit edilmiştir. Halk arasında *Anthemis cretica*, *Pseudocotula wildemanniana*, *Chrysanthemum coronarium* ve *Tripleurospermum monticulum*'a sadece "papatya" adı verilirken, *Anthemis nobilis*'e "Alman papatyası", *A. Cotula*'ya "patiska çiçeği", *A. austriaca*'ya "Kelemlî", "Akbabatça" "Koyungözü papatya" adları da verilmektedir (140).

Matricaria chamomilla'dan elde edilen Flos Chamomillae droğu çok eskiden beri kullanıldığı için taşıdığı maddeler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Araştırmalar sonucu değişik yapıdaki flavonoidler, uçucu yağ ve dolayısı ile monoterpen ve seskiterpen yapısındaki maddeler, kumarin heterozitleri, değişik yapıdaki asitler, öz ve türevleri, seskiterpen laktonlar, bazı vitaminler, fitosteroller gibi maddelerin bulunduğu gösterilmiştir (140).

Mayıs papatyası çiçeklerinin sahip olduğu uçucu yağın en önemli maddesi kamazulendir ki bu madde yaygın olarak eczacılıkta, yiyecek, parfüm ve tatlandırıcı (eşni) sanayinde kullanılmaktadır (141).

Farmakolojik etkisi uçucu yağından kaynaklanmaktadır. Mayıs papatyası çiçekleri %0,2 ile %1,9 arasında değişen mavi renkli bir uçucu yağa sahiptir. Uçucu yağı eczacılıkta, kozmetikte ve gıda sanayinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fitoterapide iekleri kullanılmaktadır. Uçucu yağ bileşenlerinin içerisinde en aktif olanları (-)- α -bisabolol ve kamazulen, bisabolol oksitler, ve en-yn-dicycloetherlerdir. (-)- α -Bisabolol iltihap giderici, antimikrobiyal, yara iyileştirici ve antiülser etkiye sahiptir. Kamazulen de iltihap giderici etkiye sahiptir. Her ikisi beraber spazmolitik bir etkiye sahiptir. Mayıs papatyası ekstraktlarının en etkili antilayşmanya (layşmanya: şark çıbanı) aktivitesine sahip oldukları tesbit edilmiştir. İlaç olarak, mide-bağırsak kısmında sancı yapan iltihaplarda kullanılmaktadır. Haricen de papatya iltihaplı olan cilt ve mukozalarda, ağız ve diş etlerine, anal ve genital bölgelerdeki rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Boğaz yollarındaki enfeksiyon ve tahriş durumunda papatya buharı solumak faydalı olur. Gz kısmında kullanılmamasına kesinlikle dikkat edilmelidir. Papatya z cilt kremlerine, bebek yağlarına, diş macunlarına katılmaktadır. Tıbbi olmayan amaçlar için (sanayi, kozmetik vb.) bitkinin yeşil aksamı da kullanılabilir. Ayrıca Flores Chamomilla midevi, uyarıcı, antispasmodik ve yara iyi edici olarak ve gargara halinde boğaz ağrılarını gidermekte kullanılır (138,142-146)

Matricaria, artan fitofarmakolojik öneminden dolayı bitki aylarının olduğu kadar birçok galenik preparatın (tentrler, ekstraktlar) içeriğine giren değerli bir bileşendir (147).

1.3.1. Papatyanın Morfolojik Özellikleri

Mayıs papatyasında kapitulumdaki bütün çiçekler veya hiç olmazsa ortada bulunan çiçekler tüp şeklindedir. Bu ikinci halde kapitulumun çevresindeki çiçekler dilsidir. Çoğunlukla süt borusu yoktur. Mayıs papatyası memleketimizde mayıs ayında çiçek açan, yaprakları ince parçalı bir yıllık bitkidir. Dilsî çiçekler beyaz, tüpsü olanlar sarı, reseptakulum koni şeklinde ve içi boştur. Kapitulumlar uçucu yağ taşır. Uçucu yağ yeni elde edildiğinde mavidir. Bu renk taşıdığı kamazulenden ileri gelir. Yağın rengi kısa zamanda yeşile dönmektedir (138).

Yapraklar almaşıklı durumda olup 2, 3 parçalıdır. Tüylü yaprakları karşılıklı olarak dallı gövdesinde bulunmaktadır. Mayıs papatyası ince saçak köklere ve çokça derin gitmeyen lif köklere sahiptirler. Uzunluğu 50-85 cm arasında değişir (142,148,149).

Mayıstan hazirana kadar dallanmış filiz uçlarının başlarında değişik büyüklükteki çiçek düğmeleri görünmekte olup, çelenk yapısındaki beyaz kenar dil çiçeği ve 400-500 sarı huni tipinde boru çiçekleri bulunmaktadır, bunlar uçucu yağların birikim yeri olarak kullanılmaktadır. Mayıs papatyasının “papatya” diye tabir edilen çiçeklerden farkı boş, kubbemsi çiçek tabanı olması ve kendine has karakteristik kokusudur (142).

Çiçek tabanı genç devrede hafif daha sonra kuvvetli kubbemsi olup iç kısmı boştur ve buna benzer Compositae'lardan (*Asteraceae*) önemli bir ayırım farklılığıdır (148). Sap tüysüz, yapraklar oldukça yeşil ve pürüzsüz, ince görünümlüdür. Çiçek uzun bir sapçığa sahiptir (149).

Genellikle dik olarak gelişen çok fazla dallanmış sapsarı vardır ve sapsarının içi doludur. Çanak yapraklar 20,30 kadar tek sıra halinde dizilmiş, uzunumsu derimsi küt uçludur. Papatyada bir çiçek düğmesinin kenarlarında 12–18 adet beyaz, tamamen dişî dil çiçekleri ile çok sayıda 5 köşeli sarı hermafrodit boru çiçekleri ve çiçek tabanı bulunur. Papatyada meyve çok küçüktür ve 0,7 – 1,2 mm uzunlukta 0,3 mm genişliğindedir. Rengi sarımsı gridir.

Bin tane ağırlığı çok değişken olup, 0,026-0,60 g arasında bulunmuştur. Meyve tipik ışııkta çimlenmeye dönüktür. Çimlenme hızı 5, çimlenme gücü 16 günde saptanır (148).

Bilimsel Sınıflandırma

Alem: Plantae

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Alt sınıf: Asteridae

Sıra: Asterales

Aile: Asteraceae

Cins: Matricaria

Tür: *Matricaria chamomilla* L.



1.3.2. Papatyanın Kökeni ve Yayılışı

Günümüzde mayıs papatyası ABD, Alman, Avusturya, Brezilya, Slovakya, Fransa, Hollanda, İngiltere, İtalya, İsveç, İsviçre, Macaristan, Mısır, Romanya, Rus, Türk, Eski Yugoslavya ve Yunan farmakopesine kayıtlıdır. Diğer taraftan bitkinin kapitulumlarından elde edilen uçucu yağ ise Avusturya ve İsviçre farmakopeleri gibi önemli farmakopelerce tıbbi bitkilerin en önemlilerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca mayıs papatyası Avrupa'da da oldukça yaygın bir tıbbi bitkidir.

Tıbbi bitkilerin kullanımı için bilimsel değerlendirmeler yapan ve dökümanlar hazırlayan Avrupa Bilimsel Fitoterapi Kooperatifi'nin (ESCOP) hazırladığı ilk belgelerden biri mayıs papatyası hakkındadır. Fitoterapik olarak çiçekleri (*Chamomillae flos*) 26 ülkenin farmakopesinde yer almaktadır (140,144-146,150)

Mayıs papatyası bugün dünyanın birçok yöresinde yayılmış bulunmakta ve pek çok ülkede de kültürü yapılmaktadır. En fazla papatya kültürü yapan ülkeler Arjantin, Mısır, Almanya, Macaristan, Polonya, İspanya, Bulgaristan, Belarusya, Rusya, Çek Cumhuriyeti, Slovakya, Balkan Yarımadası, Ukrayna, Bolivya ve Brezilya, Belçika, Fransa, ve Yunanistan, Hindistan'dır (144,148,149). *M.recutita* birçok Avrupa ülkesi için önemli bir ticaret konusudur. Örneğin Macaristan'da papatyaya ulusal bir ürün olarak değer verilmekte ve geniş ölçüde kültürü yapılarak başka Avrupa ülkeleri olmak üzere bütün dünyaya satılmaktadır (148).

1.3.3. Papatyanın Ekolojik Önemi

Zararsız bir kırçiçeği olmasından dolayı ve kırçiçeklerinin genellikle tohumları karıştığından tabiatda geniş alanlarda yetişebilmektedirler. Çok yoğun koloniler oluşturabilmekte ve otlaklarda yetişen damarlı bitki türlerinin %50 den fazlasının habitatına el koyabilen türlerinin varlığı tespit edilmiştir (151). Güneşli yerlerden ve hafif killi ve kireçli topraklardan hoşlanır (152).

1.3.4. Papatyanın Halk Hekimliğinde ve Tıpta Kullanım Alanları

Papatya çayı ve yağı yüzyıllardır halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Soğuk algınlığı tedavisinde, ateşi düşürücü, bel ve baş ağrılarını giderici, iştah açıcı, mide de hazmı kolaylaştırıcı, spazm çözücü, mikrop öldürücü, terletici, sinir yatıştırıcı ve kabızlığı geçirici gibi işlevleri saptanmıştır. Ayrıca bağırsak gazlarını giderdiği, vücuda rahatlık verdiği, boğaz, bademcik ve diş etlerinin iltihaplarını giderdiği, saçları sararttığı ve vücuttaki zehirleri dışarı attığı tespit edilmiştir (139).

1. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı: Arçelik

Destile Su Cihazı: Nüve-NS-108

Etüv: Binder

pH Metre: Butech

UV-VIS Spektrofotometre: T80+PG Instruments

Terazi: Shimadzu AUx220

Hassas Terazi: Sartorius

Su Banyosu: Memmert

Otomatik Pipetler: Brand Pipetleri, Dragon Lab.

Blender: King

Manyetik Karıştırıcı: Chiltern Hotplate HS 31

Soğutuculu Santrifuj: Sigma 3K 30

Vorteks: Velp Scientifica

2.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Papatya (*Matricaria chamomilla*) bitkisinden lipazın saflaştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada bitkilerden yağın uzaklaştırılmasında organik çözücü olarak petrol eteri (40-60°C) ve sokslet cihazı kullanıldı.

Saflaştırma işleminde yağı uzaklaştırılmış papatya bitkilerinden, 60 mM fosfat tamponu (pH=7.0) ile hazırlanan ham ekstreler kullanıldı. Fosfat tamponunun hazırlanmasında dipotasyum hidrojen fosfat (Merck) ve potasyum dihidrojen fosfat (Merck)'tan yararlanıldı. Papatya bitkisinden hazırlanan ham ekstrinin amonyum sülfat kesiti için amonyum sülfat (Sigma) ve Sigma marka {D-9527 genişliği 43 mm (1,7"), çapı 27 mm (1,1")} dializ kesesi kullanıldı.

DEAE-selüloz kolon kromatografisinde, kolon dolgu maddesi olarak DEAE-selüloz (Sigma) kullanıldı. Hazırlanan ekstrelerin ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi çıkışında elde edilen fraksiyonların saklanması +4°C'lik buzdolabı ve dondurucusu kullanıldı.

Papatya bitkilerinden elde edilen ham ekstrede, %70'lik amonyum sülfat fraksiyonunda ve DEAE-selüloz kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlarda, enzim aktiviteleri tayinlerinde substrat olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck), tampon olarak dipotasyum hidrojen fosfat (Merck) ve potasyum dihidrojen fosfat (Merck)'tan yararlanıldı.

Protein miktar tayininde; Lowry metoduna göre standart olarak sığır serum albumini (Merck), protein miktar tayininde kullanıldı. Folin ayracı (Merck), bakır sülfat (Sigma 12849), dipotasyum tartarat, sodyum karbonat, sodyum hidroksit kullanıldı.

2.2. Metod

2.2.1. Papatya Ham Ekstresinin Hazırlanması

Ham ekstre hazırlamak için Blender yardımıyla parçalanmış papatya bitkisinden 94,5 g tartılıp 472.5 mL 0.06 mM fosfat tamponunda (pH= 7,0) +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırıldıktan sonra, bir gece bekletildi. Ertesi gün homojenizat iki kat bezden süzüldü. 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım alındı. Bu işlemlerin sonucunda papatya bitkisi ham ekstresi elde edildi. Ham ekstrede lipaz esteraz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

2.2.2. Papatya Ham Ekstresinde Lipazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması

Papatya bitkisindeki lipazı çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 25 mL'lik 10 adet behere, 5'er mL papatya bitkisi ham ekstresi konuldu. Birinci behere ortamdaki konsantrasyonu %10 olacak

şekilde toz amonyum sülfattan yavaş yavaş ilave edilerek karıştırıldı. Her beherde konsantrasyon %10 arttırılarak, %90'a kadar değişen oranlarda toz amonyum sülfat azar azar ilave edilerek karıştırıldı. Ham ekstreler içindeki amonyum sülfat tamamen çözüldükten sonra 45 dakika daha karıştırıldı ve ağızları kapatılarak soğuk dolapta bir gece bekletildi. Ertesi gün, her beherdeki ham ekstre 0°C'de 20000 rpm'de, 30'ar dakika, santrifüje edildi. En uygun konsantrasyonun belirlenmesi için alt ve üst fazlarda protein miktarları ve enzim aktiviteleri tayin edildi.

Elde edilen sonuçlardan papatya bitkisi için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %70 olduğu saptandı.

2.2.3. Papatya Ham Ekstresinde Lipazın %70 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi ve Dializ İşlemi

Papatya bitkisi lipazını çöktüren en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %70 olduğu saptandığından, ham ekstre ortamdaki konsantrasyonu %70 olacak şekilde, katı amonyum sülfat azar azar ilave edildi. +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 45 dakika karıştırıldıktan sonra ağız kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Çökelti pH'sı 7,0 olan 0,06 M sodyum fosfat tamponunda çözüldü ve hacmi ölçüldü. Bu çözeltilde de esteraz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra, amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla dializ kesesine (Sigma) {genişliği 43 mm (1.7"), çapı 27 mm (1.1")} konuldu. Soğuk dolapta, 0.01 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.0) ile çözeltili sık sık değiştirilerek ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak, çözeltilde sülfat iyonu kalmayınca kadar dializ işlemine devam edildi. Dializ işlemi tamamlanmış olan çözeltili, dializ kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla, 0°C'de 18000 rpm'de, 30 dakika, santrifüj edildi. Üstteki berrak çözeltili alındı ve %70 amonyum sülfat kesiti olarak adlandırıldı. Esteraz aktivitesi ve protein miktarı tayin edildikten sonra uygun hacimlere bölünerek buzdolabının dondurucusunda saklandı.

2.2.4. Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografisi

2.2.4.1. DEAE - Selülozun Hazırlanması

20 g DEAE-selüloz yaklaşık 200 mL 1 mM pH'sı 7,6 olan sodyum fosfat tamponu içinde manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve ardından çökmesi beklendi. Üstteki bulanık sıvı atıldı. Üzerine tekrar aynı miktarda tampon ilave edildi. Bu işlem birkaç kez yinelendi. Bir gece oda ısısında bekletildi. Ertesi gün üstteki sıvı döküldü. Tekrar 1 mM tampon konuldu ve 30 dakika karıştırıldı. Bu yöntemle şişirilmiş olan DEAE-selüloz kullanılarak saflaştırma işlemlerine devam edildi.

2.2.4.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Uygulaması

Yukarıda belirtilen şekilde şişirilmiş olan DEAE-selüloz, 1 cm çapındaki alt ucu ince madde ile kapatılmış alt kısmı musluklu bir cam kolona, kolon yüksekliği 5 cm olacak şekilde dolduruldu ve üç kolon hacmi pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfat tamponu geçirilerek dengelendi. Kolona 200 mg/mL protein olarak %70 amonyum sülfat kesiti uygulandı. Kolondan öncelikle 0,5 mM'lık sodyum fosfat tamponu (pH=7,0) geçirildi. Daha sonra kolondan sırasıyla yaklaşık 200 ml 0,5 mM sodyum fosfat tamponunda çözülmüş 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM ve 500 mM NaCl gradienti uygulandı. Fraksiyonlar her tüpte eşit hacim olacak şekilde toplandı (4-5 mL). Tüplerdeki çözeltilerin absorbansları elüe edilen tampona karşı spektrofotometrede, 280 nm'de okunarak elüsyon grafiği çizildi. Ayrıca, elüsyonlardaki lipaz aktivitesi tayin edilerek aktivite değerleri de aynı grafikte gösterildi. Enzimatik aktivite gösteren tüplerdeki çözeltiler bir araya toplandı ve bu çözeltinin lipaz aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı. Çözelti uygun hacimlere bölünerek, daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

2.2.5. Protein Miktar Tayini

Papatya bitkisinden lipazın saflaştırılması sırasında, ham ekstre ve % 70'lık amonyum sülfat fraksiyonunun elde edilmesi evrelerinde, protein miktarı Lowry

yöntemine (153) göre tayin edildi. DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktar tayinlerinde ise E_{280}/E_{260} Warburg yöntemi (154) kullanıldı.

2.2.6. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Ayıraçlar A ayıracı: 0,1 N NaOH içinde çözülmüş % 2 sodyum karbonat çözeltisi.

B ayıracı: % 0,5 bakır (II) sülfat'ın %1 dipotasyum tartarattaki çözeltisi.

Folin ayıracı: Folin ayıracı 1/3 oranında distile su ile seyreltildi.

C ayıracı (Alkali bakır çözeltisi): 50 mL A ayıracına 1 mL B ayıracı ilave edildi.

2.2.6.1. Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpüne, protein miktarı tayin edilecek çözeltiden 0,5 mL kondu, üzerine 2,5 mL C ayıracı ilave edilerek iyice karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,25 mL seyreltik Folin ayıracı ilave edildi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Oluşan mavi–mor renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 500 nm'de ayıraç körüne karşı okundu. Okunan bu absorbans değerinin sığır serum albumini ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla, protein miktarı %mg olarak saptandı.

2.2.6.2. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

Bovin serum albuminin distile sudaki %100 mg'lık çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile %2 mg, %4 mg, %6 mg, %8 mg, %10 mg, %20 mg, %30 mg, %40 mg, %50 mg, %60 mg, %70 mg, %80 mg ve %90 mg'lık konsantrasyonlardaki çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Lowry deneyi uygulandı. Deney 10 kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak serum albumini regresyon denkleminde standart grafiği çizilerek protein miktarları hesaplandı.

2.2.7. E₂₈₀/E₂₆₀ Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Kolondan elde edilen elüatların 280 nm ve 260 nm'deki absorbanları elüe edildikleri tamponlara karşı spektrofotometrede okundu. E₂₈₀/E₂₆₀ oranı hesaplandı ve bu değere uyan faktör tablodan bulundu. Çözeltinin içerdiği protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Protein mg/mL} = \text{Faktör} \times E_{280} \quad (3,1)$$

$$\text{Protein Konsantrasyonu (mg/mL)} = 1,5 \times A_{280} - 0,75 \times A_{260} \quad (3,2.)$$

Tablo 2.1 E₂₈₀/E₂₆₀ Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayininde Kullanılan Faktör Tablosu (131).

| E ₂₈₀ /E ₂₆₀ | % Nükleik asid | Faktör* |
|------------------------------------|----------------|---------|
| 1,75 | 0,00 | 1,116 |
| 1,63 | 0,25 | 1,081 |
| 1,52 | 0,50 | 1,054 |
| 1,40 | 0,75 | 1,023 |
| 1,36 | 1,00 | 0,994 |
| 1,30 | 1,25 | 0,970 |
| 1,25 | 1,50 | 0,944 |
| 1,16 | 2,00 | 0,899 |
| 1,09 | 2,50 | 0,852 |
| 1,03 | 3,00 | 0,814 |
| 0,979 | 3,50 | 0,776 |
| 0,939 | 4,00 | 0,743 |
| 0,874 | 5,00 | 0,682 |
| 0,846 | 5,50 | 0,656 |
| 0,822 | 6,00 | 0,632 |
| 0,804 | 6,50 | 0,607 |

| | | |
|-------|-------|-------|
| 0,784 | 7,00 | 0,585 |
| 0,767 | 7,50 | 0,565 |
| 0,753 | 8,00 | 0,545 |
| 0,730 | 9,00 | 0,508 |
| 0,705 | 10,00 | 0,478 |
| 0,671 | 12,00 | 0,422 |
| 0,644 | 14,00 | 0,377 |
| 0,615 | 17,00 | 0,322 |
| 0,595 | 20,00 | 0,278 |

* 1 cm'lik ışık yolu

2.2.8. Lipaz Aktivitesinin Tayini

Lipaz enzimi esteraz ve hidrolaz olmak üzere iki farklı aktiviteye sahiptir. Çalışmamızda papatya bitkisi lipaz aktivitesi, esteraz aktivitesi tayin yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı (155).

2.2.8.1. Esteraz Aktivitesi Tayini

2.2.8.1.1. Ayıraçlar

0,050 M Sodyum asetat tampon çözeltisi (pH=5.0): 0,6804 g $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ destile suda çözülerek balon jodede 100 mL'ye tamamlandı. 0,050 M asetik asid çözeltisi ile pH'sı 5,0'e ayarlandı.

Dimetilsulfoksit (DMSO)

Substrat çözeltisi: 18 mg p-nitrofenil asetat (p-NFA) 1 mL DMSO'te çözüldü ve 99 mL 0,050 M $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ tamponu ilave edildi. Substrat çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve 1 saat içerisinde kullanıldı.

0.500 M Tris-HCl tamponu (pH=7.4) çözeltisi: 6,55 g Tris destile suda çözülerek balon jode 100 mL'ye tamamlandı. 0,500 M HCl çözeltisi ile pH'sı 7,4'e ayarlandı.

2.2.8.2. Deneyin Yapılışı

Esteraz aktivitesi, Erlanson'a göre substrat olarak p-NFA kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi (132). Bir deney tüpüne substrat ve enzim çözeltilerinden 0,5'er mL konarak, 0,5 mL 0,5 M Tris-HCl tamponu ilave (pH=7,4) edildi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkube edildi. Çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 400 nm'de, 60 mM sodyum fosfat tamponuna karşı (pH=7,0) karşı okundu. Bu absorpsiyon değerinin p-nitrofenol regresyon denkleminde uygulanmasıyla enzim tarafından, oda sıcaklığında, 1 dakikada açığa çıkarılan p-nitrofenol miktarı $\mu\text{mol/dakika}$ olarak belirlendi.

Bir ünite enzim aktivitesi; 1 dakikada açığa çıkan p-nitrofenol'ün miktarıdır ($\mu\text{mol/dakika}$).

2.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat -Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS - PAGE) (156)

2.2.9.1. Kullanılan Çözeltiler

A. 1 M Tris-HCl tamponu pH=8,8: 2,4228 g (0,1 M) Tris 16 mL saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH=8,8'e ayarlandı. Toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı.

B. 1 M Tris-HCl tamponu pH=6,8: 2,4228 g (0,1 M) Tris 16 mL saf suda çözüldü. 1N HCl ile pH=6,8'e ayarlandı. Toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı.

C. Numune Tamponu: 0,65 mL 1M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %10'luk SDS ve 1 mL % 87 gliserin, 1 mL % 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. 1M NaOH azar azar damlatılarak Mavi

renk alması sağlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

D. Yürütme Tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL saf suda çözüldü, 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

E. Renklendirme Çözeltisi: 0,66 g Coomassie Brilliant Blue R-250'nin 120 mL metanolde çözünmesi ve bunun üzerine 24 mL saf asetik asid ile 120 mL distile su ilavesiyle hazırlandı.

F. Renksizleştirme Çözeltisi: 7,5 hacim asetik asid, 5 hacim metanol ve 87,5 hacim destile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

2.2.9.2. Jellerin Hazırlanması

Ayırma Jeli: 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH=8.8), 4 mL %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,1 mL %10'luk SDS, 0,004 mL %99,99'luk N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED) ve 3,3 mL distile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0,1 mL %1,5'lik günlük hazırlanmış amonyum persülfat çözeltisi ilave edildi.

Yığıma Jeli: 1 M Tris-HCl (pH=6,8)'den 0,25 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 0,33 mL, %10'luk SDS'den 0,02 mL, %99,99'lik TEMED'den 0,002 mL ve distile sudan 1,4 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak günlük hazırlanmış %1,5'lik amonyum persülfat çözeltisinden 0,02 mL ilave edildi.

2.2.9.3. SDS - PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü

Papatya bitkisi lipazının DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi, Laemmli tarafından belirtilen (156) yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Ayırma jeli, ince uçlu bir enjektör yardımı ile 0,7 cm çapındaki cam tüplere, üstten 2-3 cm boşluk kalacak şekilde, hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek dolduruldu. Jel yüzeyinin düzgün olması için etanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki etanolmavi bant süzgeç kağıdı kesilerek ayırma jelinin yapısını bozmadan etanol emdirilmiş ve pürüzsüz yüzey elde edildikten sonra polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Yığma jeli polimerleştikten sonra molekül ağırlığı standart çözeltileri ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonunda elde edilen enzim çözeltisi toplam hacim 20 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Sırasıyla Ham ekstre, DEAE kolon eluatı, ve liyofize edilen DEAE kolon eluatı kuyucuklara yüklemesi yapıldı. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Kuyucuklara yüklendi. 40 mA akım geçirildi. Brom timol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0,5-0,3 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Elektroforez camlarındaki jel dikkatlice çıkarıldı, yığma jeli kesilip atıldı sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli, renklendirme çözeltisine konuldu ve 1,5-2 saat yavaş bir şekilde çalkalandı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. 30 dakikalık aralarla çözelti değiştirildi. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra %7'lik asetik asitte saklandı.

Papatya bitkisi lipazının molekül ağırlığı standart proteinlerin molekül ağırlıkları yardımıyla grafikten hesaplandı. Bantların orijine göre R_f değerleri bulundu. Hesaplanan R_f değerleri apsise, protein bantlarına karşılık gelen molekül ağırlıklarının logaritması da ordinata yazılarak molekül ağırlığı grafiği elde edildi. Aynı şekilde lipazın R_f değeri hesaplanarak, grafikten molekül ağırlığı tayin edildi.

2.2.10. Papatyadan Elde Edilen Lipazın Esteraz Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Papatya bitkisinden elde edilen lipazın esteraz aktivitesinde kinetik özellikleri incelemek sıcaklığın ve pH'nın etkisini incelemek için DEAE-selüloz kolonundan elde edilen fraksiyonlar kullanıldı.

2.2.10.1. Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi

Papatya bitkisinden elde edilen lipazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla enzimin pH = 4-12 aralığında gösterdiği esteraz aktivitesi ölçüldü. pH=4-5 aralığında asetat tamponu, pH=6-8 aralığında fosfat tamponu, pH=9-10 aralığında glisin-NaOH tamponu, pH=11-12 aralığında ise Na₂HPO₄-NaOH tamponu kullanıldı. Aktivite tayini, son hacim 0,3 mL olacak şekilde p-NFA'nın 0,1 mL sulu çözeltisine,

0,1 mL enzim çözeltisi ve 0,1 mL 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH=7,4) ilavesiyle oluşturuldu. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve 5 dakika sonunda serbest kalan p-nitrofenol, 400 nm'de 60 mM sodyum fosfat tamponuna (pH=7,0) karşı spektrofotometrede okundu (132).

Tüm denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Denemeler 3 kez yapılarak ortalamaları alındı. Değişik pH değerlerinde elde edilen esteraz aktivitesi absorbans değerleri ordinata, pH değerleri apsise konarak optimum pH eğrisi çizildi.

2.2.10.2. pH Stabilitesi

Lipaz enziminin pH stabilite özelliğini belirlemek amacıyla; enzimin pH= 4,0'dan pH= 12,0'a kadar değişen pH'larda, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakika süreyle inkübasyonu sonrası koruduğu esteraz aktivitesi değerleri, 100 mM p-nitrofenil asetat substratı kullanılarak ölçüldü (155).

Her bir pH'daki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürüldü. Zamana karşı % korunan aktivite grafiği çizildi.

2.2.10.3. Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Enzim çözeltisinden 3'er mL alınarak 10°C-70°C arasında, sıcaklık her defasında 10°C arttırılarak, su banyosunda 30 dakika süre ile tutuldu. Oda sıcaklığına getirilen çözeltilerde lipaz aktivitesitayinleri yapıldı (155). Denemeler 4 kez

tekrarlanarak ortalamaları alındı. Sıcaklık değerleri apsise, elde edilen enzim aktivite değerleri ordinatta olmak üzere optimum sıcaklık eğrisi çizildi. Oda sıcaklığında yapılan denemelerin aktiviteleri 100 kabul edilerek (kontrol) her bir sıcaklık için % aktivite değerleri hesaplandı.

2.2.10.4. Termal Stabilite

Lipaz enziminin termal stabilite özelliğini belirlemek amacıyla; enzimin 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C’lerde 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakika süreyle inkübasyonu sonrası koruduğu esteraz aktivitesi değerleri, 100 mM p-nitrofenil asetat substratı kullanılarak ölçüldü (155).

Her bir sıcaklıktaki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürüldü. Zamana karşı % korunan aktivite grafiği çizildi.

2.2.10.5. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması

Lipaz esteraz aktivitesinin uygun reaksiyon süresinin bulunması amacıyla substrat, enzim ve tampon çözeltilerden aktivite tayin yönteminde belirtilen miktarlarda alınarak reaksiyonun 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30. dakikalarında esteraz aktivitesi Erlanson yöntemine göre tayin edildi (155).

2.2.10.6. Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

Papatya bitkisinden saflaştırılan lipaz enziminin sadece p-nitrofenil asetata ilgisinin fazla olduğu saptandığından bu enzimin p-nitrofenil asetat için K_m ve V_{max} değerleri tayin edildi. Bu amaçla p-NFA, p-NFB, p-NFP, p-NFK, p-NFL ve p-NFM’in 0,25 mM, 0,5 mM, 2,0 mM, 4,0 mM, 6,0 mM ve 8,0 mM’lık izopropil alkoldeki çözeltileri hazırlandı. Enzim aktivitesi Vonderwulbecke ve arkadaşları (1992) ile Winkler ve Stuckman (1979)’ın yöntemleri değiştirilerek tayin edildi (157,158). Deneyler 10 defa tekrarlandı. En küçük kareler yöntemine göre

Lineweaver–Burk doğru denkleminde ve grafikten p-nitrofenil asetat için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı

2.2.10.7. Enzim Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi

Enzim konsantrasyonunun esteraz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla enzim çözeltisi, 0,1 – 1,0 mL arasında değişen hacimlerde alınarak yukarıda belirtilen şekilde esteraz aktivitesi tayin edildi (132).

2.2.10.8. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun esteraz aktivitesine etkisini araştırmak amacıyla p-nitrofenil asetat çözeltisinden 0,1 – 1,0 mL arasında değişen hacimlerde alınarak yukarıda belirtilen şekilde esteraz aktivitesi Erlanson yöntemine göre tayin edildi (155).

2. BULGULAR

3.1. Papatya Lipazının Saflaştırılması

3.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu

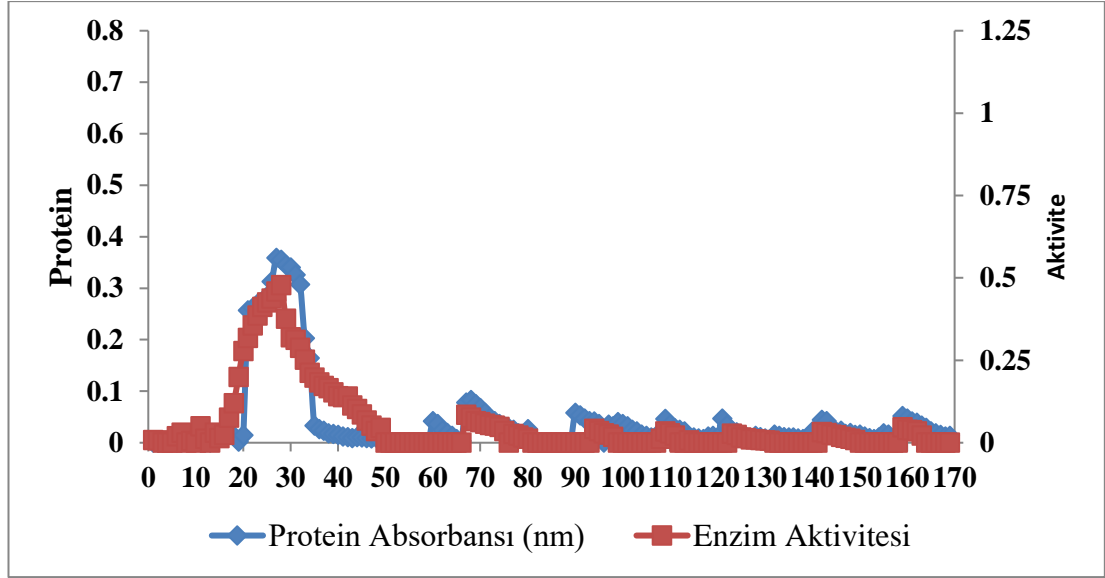
Papatya bitkisi ham ekstresinde lipazı çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %70 olduğu belirlendi.

3.1.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

100 mM fosfat eluatının DEAE-selüloz kolonuna uygulanması sonucunda lipazın 1 mM NaCl/0,5 M fosfat tamponu ile tek pik şeklinde olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1).

Papatya bitkisinden lipazın saflaştırılma evreleri ve bu evrelere ait sonuçlar Tablo 3.1’de gösterildi.

Çalışmamızda papatya bitkisi ham ekstresi hazırlama, amonyum sülfat kesiti ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi evrelerinde lipaz aktivitesi, esteraz (155) aktivitesi olarak tayin edildi. Papatya bitkisinden lipaz enzimi DEAE- selüloz kolon kromatografisi sonucu 26 kez saflaştırıldı (Tablo 3.1).



Şekil 3.1 Papatya Ham Ekstresinin %70 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği

Kolon Boyutu: 1.4x10 cm

Kolona uygulanan protein: 200 mg/mL

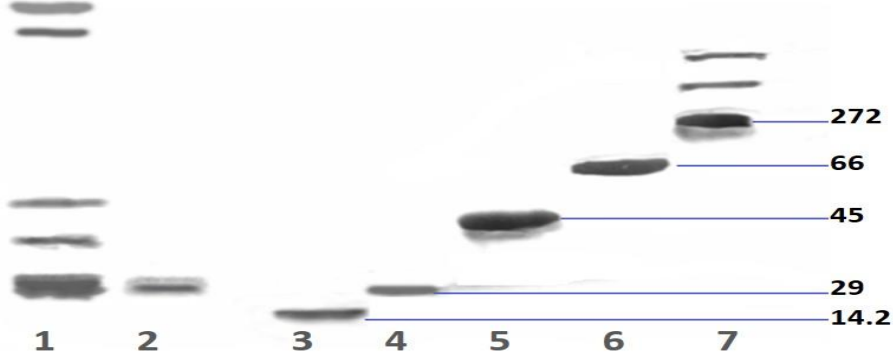
Elüsyon tamponları: pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfatta çözülmüş 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM NaCl.

Tablo 3.1 Papatyadan Lipazın Elde Edilme Evrelerinin Esteraz Aktivitesine Göre İncelenmesi

| İşlem Evreleri | Total Protein (mg) | Total Aktivite (U) | Spesifik Aktivite (U/mg) | Saflaştırma Oranı |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|
| Ham Ekstre | 2910,8 | 278578,114 | 95,71 | 1 |
| %70 Amonyum Sülfat Kesiti | 1361,7 | 173471,91 | 127,39 | 1,33 |
| Dializat | 2124 | 500704,2 | 235,74 | 2,46 |
| DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi | 198,4 | 493718,4 | 2488,5 | 26 |

3.1.3. SDS-PAGE Elektroforezi

Saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE uygulanarak tek protein bandı içerdiği saptandı. Molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart proteinler ile çizilen eğriden lipazın molekül ağırlığının 30 kDa olduğu saptandı. (Şekil 3.2).

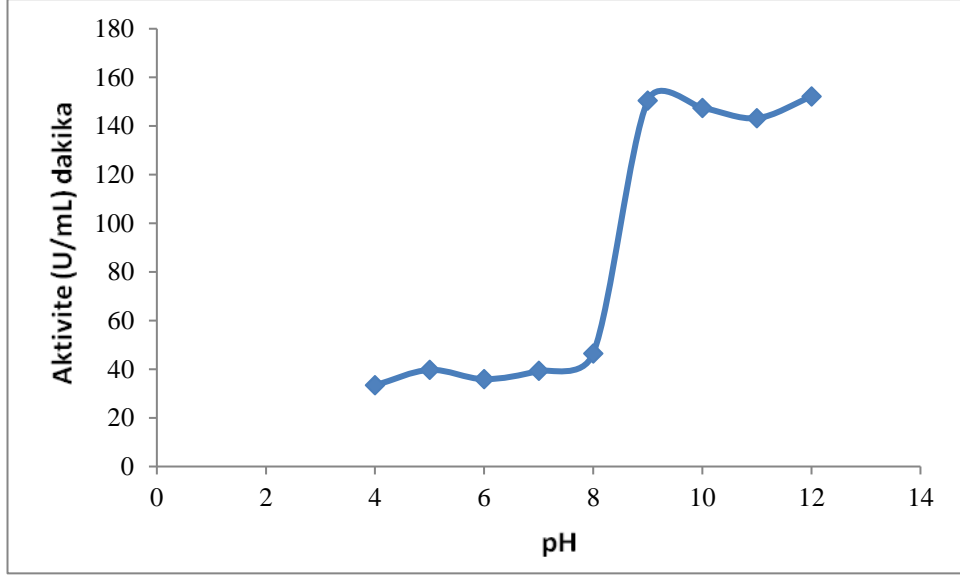


Şekil 3.2 SDS-PAGE Jel Elektroforezi

1. Bovine serum albumin (Mr = 14,2 kDa)
2. Karbonik anhidraz (Mr = 29 kDa)
3. Serum albumin (Mr = 45 kDa)
4. Alfa lakta albumin (Mr=66 kDa)
5. Üreaz (Mr= 272 kDa)
6. Ham ekstre (Mr = 20,5 kDa)
7. DEAE-selüloz enzim çözeltisi (Mr =30 kDa)

3.1.4. Lipaz Esteraz Aktivitesine pH'nın Etkisi

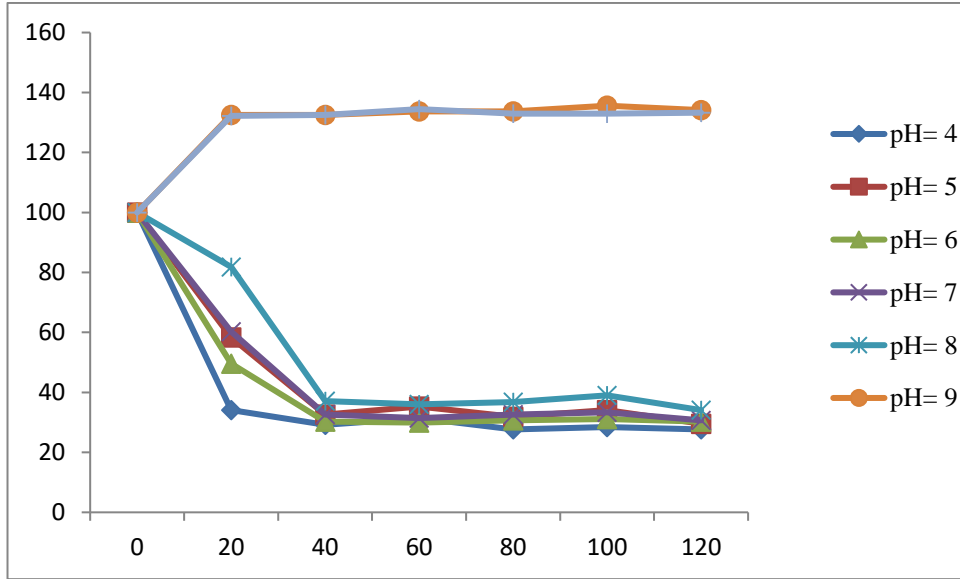
Farklı pH'larda (pH=4-12) lipaz aktivitesinin 400 nm'de, 100 mM p-nitrofenil asetat substratı kullanılarak Erlanson yöntemine göre incelenmesi sonucunda papatya bitkisi lipazının en yüksek aktiviteyi pH=12'de gösterdiği görüldü (Şekil 3.3) (155).



Şekil 3.3 Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

3.1.5. Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi

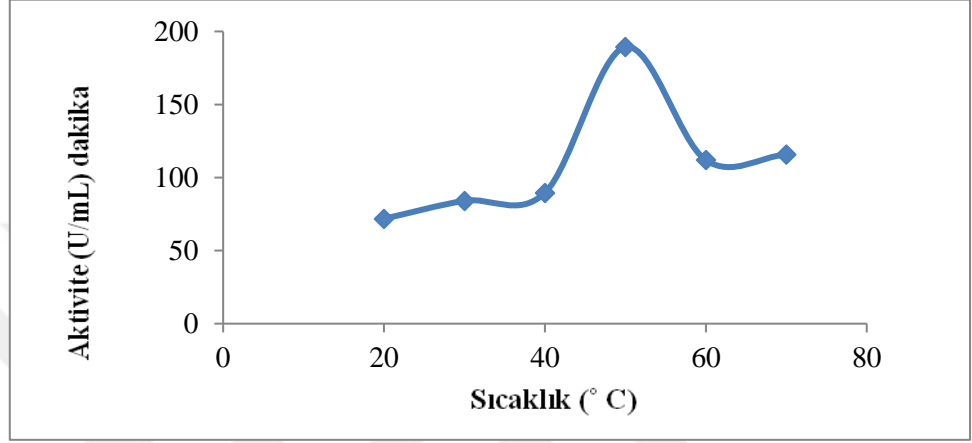
Esteraz aktivitesinin pH'a bağımlı stabilitesini belirlemek amacıyla pH=4-10 arasında; 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakikalardaki bekleme süreleri sonucunda hesaplanan aktivitelere göre çizilen grafikte pH=10'da enzim aktivitesinin en yüksek olduğu ve zamana bağlı olarak aktivitenin 100. dakikadan sonra az da olsa arttığı saptandı. Diğer pH'larda önemli farklılıklar görülmedi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi

3.1.6. Lipaz Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

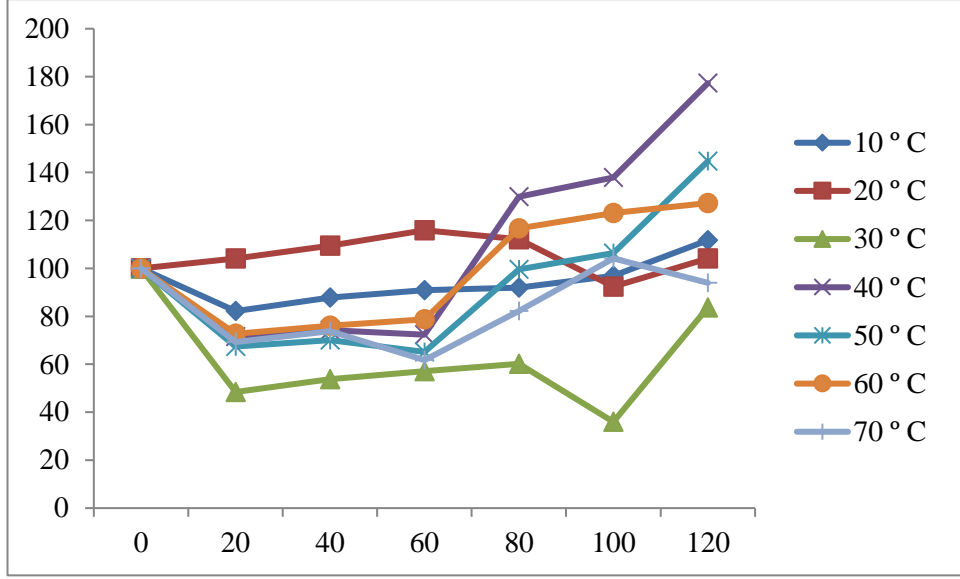
Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi 10°C-70°C arasında p-NFA substratı kullanılarak incelendiğinde, en yüksek aktivitenin 30°C'de olduğu bulundu. Sıcaklığın daha da artmasıyla aktivitenin azaldığı saptandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

3.1.7. Lipaz Esteraz Aktivitesinin Termal Stabilitesi

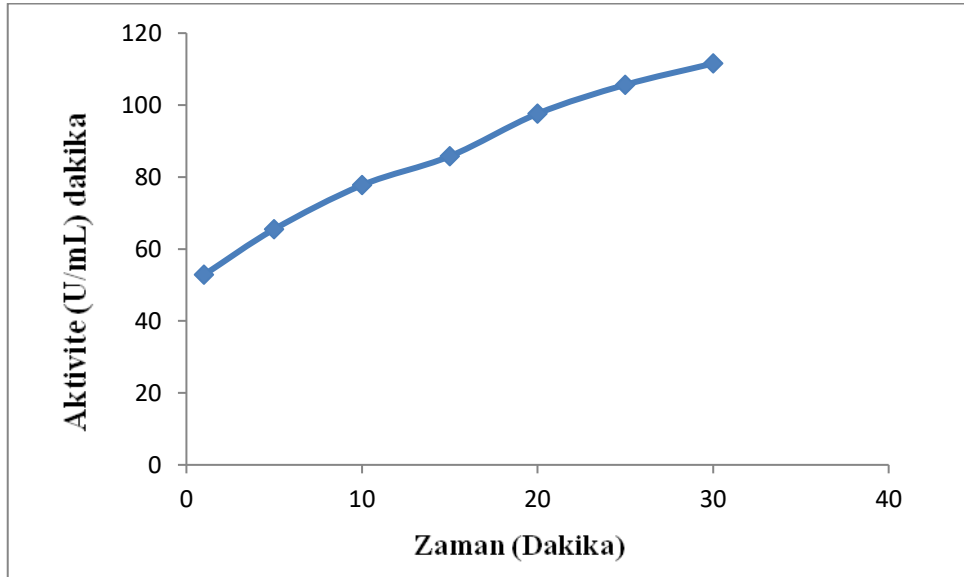
Lipazın sıcaklığa bağımlı stabilitesini belirlemek amacıyla 10-70°C arasında 20, 40, 60, 80, 100 ve 120. dakikalardaki bekleme süreleri sonucunda hesaplanan aktivitelere göre çizilen grafiklerden lipazın aktivitesinin tüm sıcaklıklarda bekleme sürelerindeki aktivite değerlerinde çok azalma olduğu saptandı. En yüksek aktivite kaybı 100. dakikadan sonra görüldü (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 p-Nitrofenil Asetatın Sıcaklık Stabilesi

3.1.8. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması

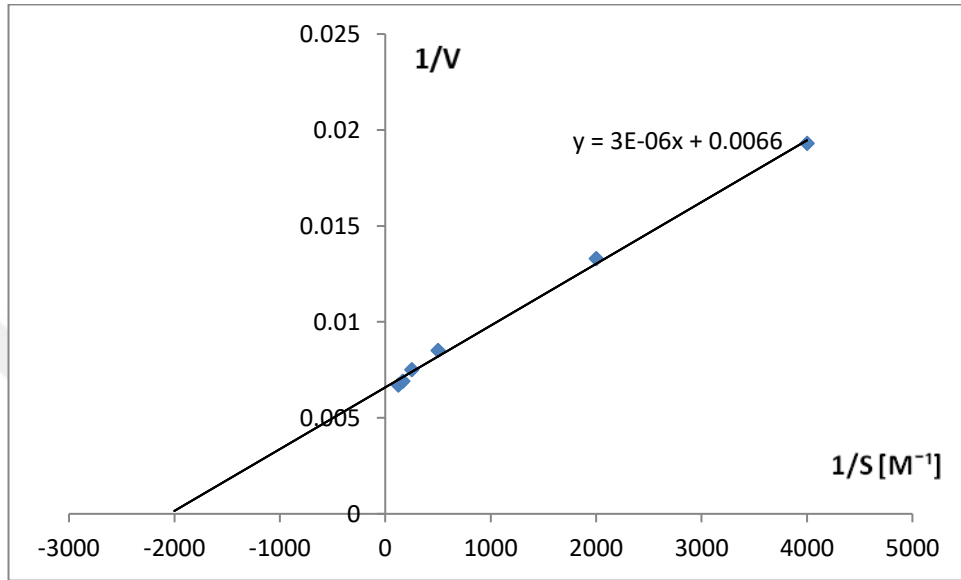
Lipaz esteraz aktivitesinin 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30. dakikalarındaki reaksiyonlar sonucunda aktivitenin zamana bağlı olarak arttığı saptandı. Ancak aktivitede artışın 5. dakikada başlaması nedeni ile aktivite tayininde 5 dakikada ölçümlerin yapılmasına karar verildi (Şekil 3.7).



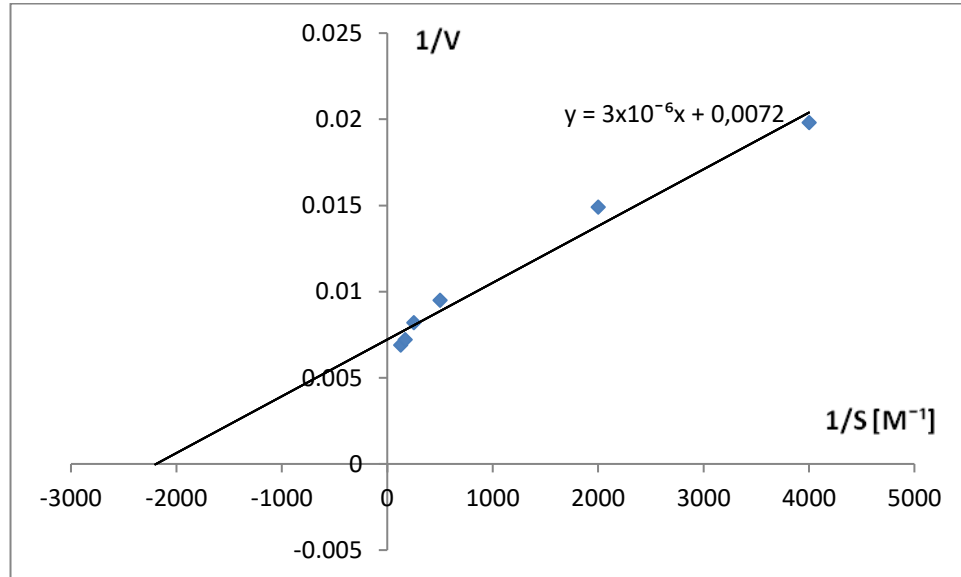
Şekil 3.7 Zamanın Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi

3.1.9. Lipazın Farklı Substratlara Göre K_m ve V_{max} Değerleri

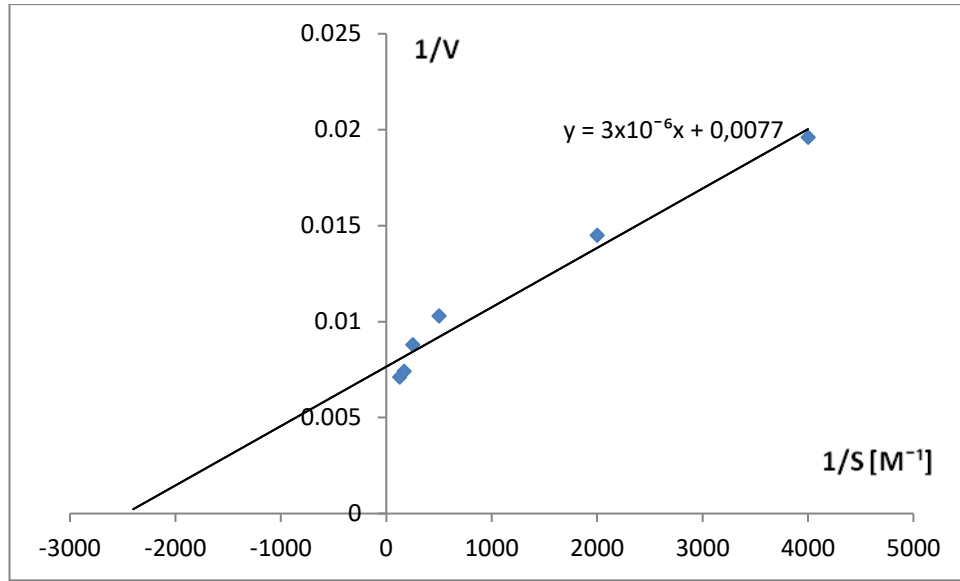
Lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk denkleminde yararlanılarak hesaplandı. Lipazın substrat olarak en fazla ilgisinin p-nitrofenil asetada olduğu görüldü (Şekil 3.8).



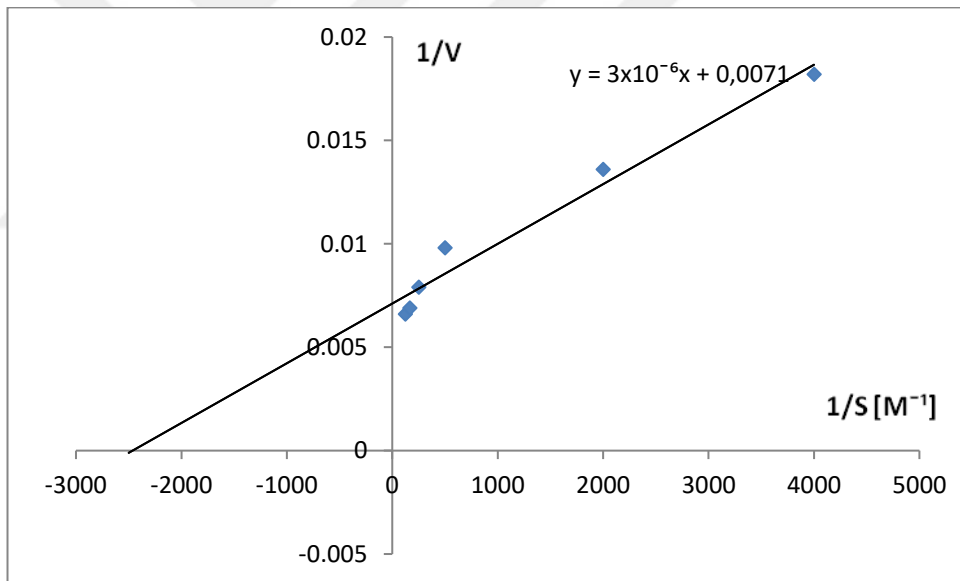
Şekil 3.8 p-Nitrofenil Asetat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



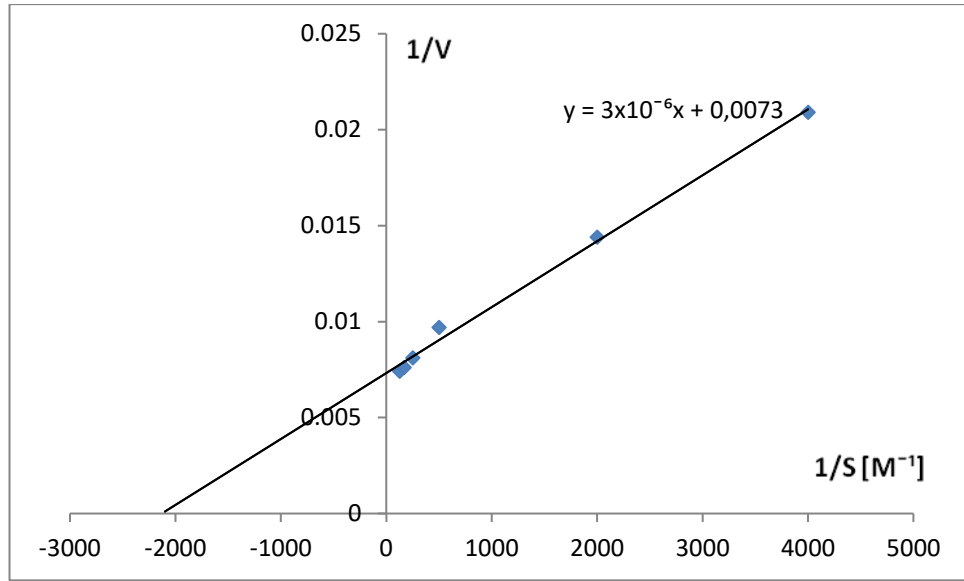
Şekil 3.9 p-Nitrofenil Bütirat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



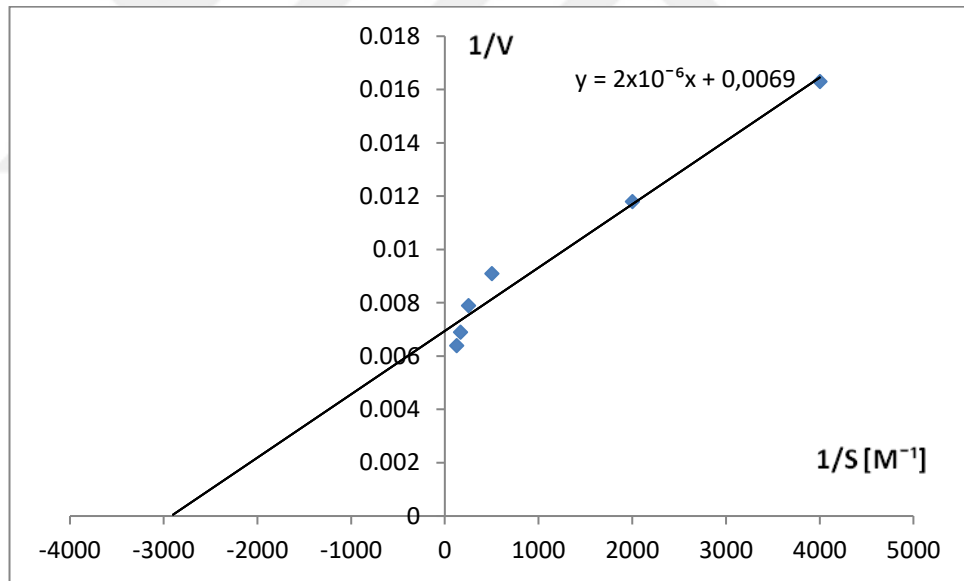
Şekil 3.10 p-Nitrofenil Kaprat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



Şekil 3.11 p-Nitrofenil Laurat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



Şekil 3.12 p-Nitrofenil Miristat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



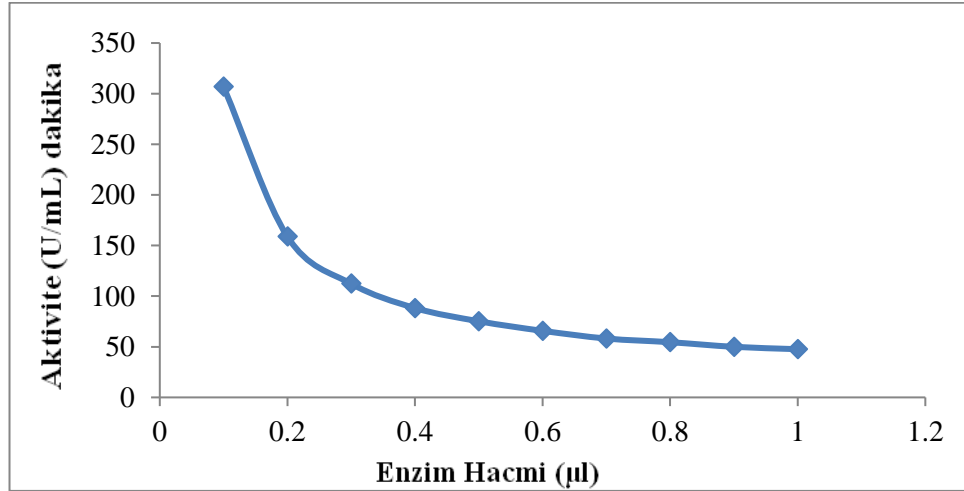
Şekil 3.13 p-Nitrofenil Palmitat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi

Tablo 3.2 Papatya Lipazının Farklı Substratları İçin K_m ve V_{max} Değerleri

| Substrat | K_m | K_m (mM) | V_{max} (U) |
|----------|-----------|------------|---------------|
| p-NPA | 0,0004545 | 0,4545 | 151,52 |
| p-NPB | 0,0004167 | 0,4167 | 138,89 |
| p-NPK | 0,0003896 | 0,3896 | 129,87 |
| p-NPL | 0,0004225 | 0,4225 | 140,85 |
| p-NPM | 0,0004109 | 0,4109 | 136,99 |
| p-NPP | 0,0002899 | 0,2899 | 144,93 |

3.1.10. Enzim Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi

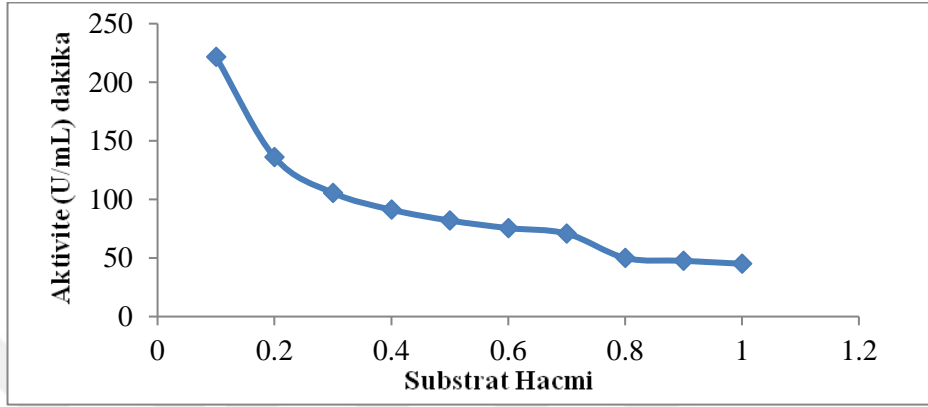
0,1-1,0 mL arasında değişen hacimlerde alınan enzim çözeltileriyle lipaz esteraz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Enzim hacminin artması ile lipaz aktivitesinin arttığı görüldü. Ancak 0,1 mL enzim hacminde aktivite belli bir değerde dengelendiği yinede enzim hacminin artması ile aktivitenin çok fazla artış göstermediği saptandı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Enzim Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi

3.1.11. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi

Farklı miktarda p-nitrofenil asetat substratına karşı lipazın esteraz aktiviteleri ölçüldü. En yüksek aktivitenin 0,7 mL substrat ile olduğu bulunduğundan çalışmamızda 0,7 mL substrat kullanarak aktivite deneyleri yapıldı (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli endüstriyel işlemlerde (margarin, süt ve yağ endüstrisinde, deterjan ve gıda endüstrisinde, saf kimyasalların ve ilaçların sentezinde, kağıt imalatında, kozmetik endüstrisinde, eczacılıkta ve tekstilde) kullanım alanlarına sahip olan lipazların, çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırıldığı ve bazı kinetik özelliklerinin incelendiği görülmüştür. Lipazın papatya bitkisinden saflaştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, papatya lipazı ilk kez saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

Bitki tohumlarındaki yağların uzaklaştırılmasında çözücü olarak, hekzan (64,159), aseton (64) kloroform (111), petrol eteri, izopropil alkol (160) gibi çözücüler kullanılmıştır. Çalışmamızda papatyadaki yağı uzaklaştırmak için farklı çözücüler kullanılarak en yüksek oranda ekstrakte eden çözücünün petrol eteri olduğu bulunmuştur.

Enzimlerin çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasında, farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere ve kaynaklarına göre çalışmalarda saflaştırma oranları da değişmektedir. Yapılan çalışmalarda lipaz, kayısı tohumundan 21,03 kat (23), ayçiçek tohumundan 603 kat (119), pirinç kepeğinden 7,6 kat (161), süttten izole edilen *Serratia marcescens*'ten 20,88 kat (162), *Aspergillus niger*'den 50 kat (163), *P.seudomonas* sp.'den 37 kat (164) ve kestane tohumundan 186,87 kat (165) olarak saflaştırılmıştır. Çalışmamızda papatya lipazı 26 kat saflaştırılmıştır. Bu değer, diğer bitkilerle ilgili çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

Lipazın saflaştırılması evrelerinde, ham ekstre ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi çıkışlı enzim örneklerinde yapılan SDS-PAGE sonucunda, ham ekstrenin birden fazla protein bandı içerdiği, DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonucu elde edilen enzimin ise tek bir protein bandı içerdiği görüldü. Bu bandın R_f değerinin standart olarak kullanılan proteinlerin R_f değerleri ile karşılaştırılması sonucu lipazın molekül ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu. Bitki lipazları ile ilgili yapılan çalışmalarda, lipazların molekül ağırlıklarının nispeten küçük olduğu,

örneğin; *Mucor hiemalis f. hiemalis* lipazının 49 kDa (166), *Jatropha curcas* L. tohum lipazının molekül ağırlığının 21,6 (167), ayçiçek tohum lipazının 22 kDa (119), pirinç kepeğinin 9.4 kDa (64), *Brassica napus* L. bitkisinin ise 55 kDa (161), palm meyvasının 32 kDa (166) molekül ağırlığında oldukları bulunmuştur.

Bitkisel kaynaklı yağlı tohumların lipaz aktivitesine etki eden pH değerleri üzerine yapılan çalışmalarda, kestane tohum lipazının optimum pH'sı 8-9 (23), ayçiçek tohum lipazının optimum pH'sı 8-9 (119), pirinç kepeği lipazının optimum pH'sı 7-7,5 (64), hint yağı bitki tohumundan elde edilen lipazın optimum pH'sı 4,2 (118,168,169), *Umbellularia californica* tohumlarından saflaştırılan lipazın optimum pH'sı 8,5 olarak (170) bulunmuştur. Ayrıca, amerikan fıstığı, ayçiçek, hıyar, pamuk, fındık, domates tohumu ve mısırdan elde edilen lipazların optimum pH değerleri de 9,0 olarak bulunmuştur. Papatya lipazının pH stabilitesi incelendiğinde pH 12'de enzimin dayanıklılığının en yüksek olduğu görülmektedir. Saflaştırılan enzimin optimum pH değerinin ve dayanıklılığının pH=12 olması nedeni ile, bu enzimin bazik yapıda bir enzim olduğu söylenebilir.

Bitkisel kaynaklı yağlı tohumlar üzerine yapılan çalışmalarda lipaz aktivitesinin sıcaklık etkisi ve dayanıklılığı değerlendirildiğinde optimum sıcaklığın 30-60°C arasında, sıcaklık stabilitesinin de farklı sıcaklık değerleri arasında olduğu görülmektedir (64,171,169). Kayısı tohumundan saflaştırılan lipazın 25°C (23), palm yağı (*Elaeis guineensis*)'ndan saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığının 30°C (169), acı bakladan saflaştırılan lipazın ise 25°C olduğu verilmiştir(172), *Trichosporon asteroides*'ten saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığının 60°C olduğu ve enzimin 70°C'deki sıcaklığa karşı stabil olduğu bulunmuştur (173). *Aeromonas sobria* LP004'den saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığının 45°C olduğu ve 40°C'den daha yüksek sıcaklıklarda enzimin kararlılığını kaybettiği görülmüştür (174). Papatya lipazının sıcaklık stabilitesi incelendiğinde enzimin 20-70°C arasında farklı inkübasyon sürelerinde dahi kararlı olduğu (fazla bir aktivite kaybının olmadığı) görülmüştür.

Bu çalışmada, sıcaklık ve pH stabilitesi göz önüne alındığında enzimin sıcaklığa dayanıklı bir enzim olduğu ve pH stabilitesinin de kararlı bir yapıda olduğu

söylenbilir. Uygun enzim konsantrasyonu, substrat ve reaksiyon sürelerinin tayininde bulduğumuz değerler, enzim aktivitesinin uygun reaksiyon şartlarında yapıldığını göstermektedir.

Sonuç olarak papatyadan lipaz enzimi ilk kez saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Buna göre;

- Papatyadan lipaz, esteraz aktivitesine göre 26 kat saflaştırıldı.
- Papatyadan saflaştırılan lipazın, SDS-PAGE elektroforezi sonucunda molekül ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu.
- Lipaz enziminin p-nitrofenil asetat substratına göre optimum sıcaklık değerinin 50°C, optimum pH değerinin 12 olduğu bulundu.
- Lipaz esteraz aktivitesi için uygun reaksiyon süresi ise 5 dakika olarak belirlendi.
- Lipaz enziminin en çok ilgi gösterdiği p-nitrofenil palmitat substratına karşı Km ve Vmax değerlerinin, sırasıyla 0,2899 mM ve 144,93 U olduğu bulundu.
- Lipaz esteraz aktivitesinin uygun enzim ve substrat konsantrasyonunun sırasıyla 0,1 ve 0,7 mL olduğu belirlendi.

Elde edilen sonuçlardan, ülkemizde yetişen papatya bitkisinden lipaz enziminin saflaştırılıp çeşitli endüstri alanlarında kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

5. KAYNAKLAR

1. Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. ve Soccol, V. T., 1999. *The realm of microbial lipases in biotechnology*, *Biotechnology Applied Biochemistry*, 29, pp. 119-131.
2. Houde, A., Kademi, A. ve Leblanc, D., 2003. *Lipases and their industrial applications*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 155-170.
3. Bhat, M.K., 2000. *Cellulases and related enzymes in biotechnology*. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.
4. Veeraragavan, K., 1990. A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity, *Analytical Biochemistry*, 186, pp. 301-305.
5. Mogensen, J. E., Sehgal, P. ve Otzen, D., 2005. *Activation, inhibition, and destabilization of Thermomyces lanuginosus lipase by detergents*, *Biochemistry*, 44, pp. 1719-1730.
6. Kim, H. K., Park, Y. S., Kim, H. ve Oh, T. K., 1996. *Partial interfacial activation of Proteus vulgaris lipase overexpressed in Escherichia coli*, *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*, 60, pp. 1365-1367.
7. Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. 2001. *Research review paper: Production, purification, characterization, and applications of lipases*. *Biotechnology Advances* 19: pp. 627-662.
8. Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata F.X. 2000. *Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases*. *Enzyme and Microbial Technology* 27: pp. 187-204.
9. Hong, M. C. ve Chang, M. C., 1988. *Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated Acinetobacter radioresistens CMC-1*, *Biotechnology Letters*, 20, pp. 1027-1029.
10. Taipa, M. A., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. S., 1992. *Purification of lipases*, *Journal of Biotechnology*, 26, pp. 301-311.

11. Fuciños, P., Abadin, C. M., Sanromán, A., Longo, M. A., Pastrana, L. ve Rúa, M. L., 2005. *Identification of extracellular lipases/esterases produced by Thermus thermophilus HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization*, *Journal of Biotechnology*, 117, pp. 233-241.
12. Sağiroğlu, A. ve Telefoncu, A., 1993. *Synthesis of stereospecific esters and resolution of rasemic alcohols with immobilized lipases*, *Indian Journal of Chemistry*, 32B, pp. 227-233.
13. Bosc-Bierne, I., Rathelot, J., Perrot, C. ve Sarda, L., 1984. *Studies on chicken pancreatic lipase and colipase*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 794, pp. 65-71.
14. Eliana, S. K., Medieta, O. ve Rodrigues, M. I., 2001. *Studies on lipase-affinity adsorption using response-surface analysis*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33, pp. 153-159.
15. Yadav, R. P., Saxena, R. K., Gupta, R. ve Davidson, S., 1998. *Purification and characterization of a regiospesific lipase from Aspergillus terreus*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28, pp. 243-249.
16. Rúa, M. L., Díaz-Mauriño, T., Fernández, V. M., Otero, C. ve Ballesteros, A., 1993. *Purification and characterization of two distinct lipases from Candida cylindracea*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1156, pp. 181-189.
17. Mohamed, M. A., Mohamed, T. M., Mohamed, S. A. ve Fahmy, A. S., 2000. *Distribution of lipases in the gramineae: Partial purification and characterization of esterase from Avena fatua*, *Bioresource Technology*, 73, pp. 227-234.
18. Demirkan, B., 2008. Ceviz (*Juglans regia* L.) tohumu lipazının saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, pp. 99, Edirne.
19. Şengel, B., 2007. Deterjan katkı maddesi olarak mikrobiyal kaynaklı lipaz üretim koşulları. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, pp. 174, Ankara.
20. Ünlü, A. E., 2004. *Candida rugosa* lipazının özellikleri ve enantiyoseçimliliğinin artırılması. Seminer. Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.

21. Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbial Biotechnology* 64: 763-781.
22. Hasan, F., Aamer, A.S., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251.
23. Bilgin Sökmen, B., 2005. Kayısı (*Armeniaca Vulgaris* Lam.) tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, pp. 137, İstanbul.
24. Yeşiloğlu, Y., Başkurt, L., 2008. Partial purification and characterization of almond seed lipase. *Preparative Biochemistry Biotechnology* 38: 397-410.
25. Kührevioğlu, İ. Ö. ve Keha, E. E. 2009. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, İstanbul.
26. Kuzu, S.B. 2008. Kitinaz üreten bacillus izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 82, Adana.
27. Güner, S. 2007. *Biyokimya I*. Kradeniz Teknik Üniversitesi, Kitap Satış Bürosu, Trabzon.
28. Gözükar, E., 1997. Enzimler - Biyokimya. Ofset Repromat Ltd. Sti. Ankara.
29. Bugg, T.D., 2004. Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. Blackwell Publishing, pp. 19-30.
30. Harvey, R.A., Champe, P.C. and Ferrier, D.R., 2007. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa.
31. Aehle, W., 2004. Enzymes in industry production and application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, pp. 484.
32. Altınışık, M. 2009. *Enzimler*. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>. Web adresinden 01 Nisan 2015 tarihinde edinilmiştir.
33. Tekman, Ş., Öner, N. 1981. *Genel Biyokimya Üçüncü Baskı*. pp. 351-367, Fatih Yayınevi, İstanbul.
34. Can, A., Akev, N. 2008. *Eczacılık Fakültesi Öğrencileri İçin Biokimya Dersleri*. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul.

35. Chaturvedi, M. Singh, Chugh R. Man, S. Pandey, 2010. Lipase production from bacillus subtilis MTCC 6808 by solid state fermentation using ground nut oil cakes as substrate. *Research Journal of Microbiology* 5: 725-730.
36. Özata, A., Kutlu, M. 2000. *Enzimoloji Ders Notları*. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
37. Van Beilen, J.B., Li, Z., 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 338-344.
38. Sağıroğlu. A., K., 1999. Enzim Teknolojisi. *Bilim ve Teknik* 383: 74-80.
39. Telefoncu, A. 1997. *Enzimoloji*. pp. 193-243-353-383, Tübitak Yayınları, Aydın.
40. Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002. Kağıt endüstrisinde enzim kullanımına genel bir bakış. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi* 5 (1): 61-71.
41. Telefoncu, A., 1986. *Temel ve uygulamalı enzimoloji*. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çeşme, pp. 326, İzmir.
42. Topal, S., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum. M., Çeltik, Ö., 2000. Türkiye'nin tarımsal mikroflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turkish Journal of Biology* 24: 79-93.
43. <http://biyodoc.com/Enzim-calismasina-etki-eden-faktorler.html> Web adresinden 04 Nisan 2015 tarihinde edinilmiştir.
44. Arpigny, J.L., Jaeger, K.E., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal* 343: 177-183.
45. Yang, D. S., Rhee, J.S. 1992. Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent. *Biotechnoogy and Bioenergy* 40: 748-752.
46. Telefoncu, A. 1997. *Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskısı, pp. 249-306, Kuşadası-Türkiye.
47. Huang, Y., 2002. Lipase Production in Fungi, Doktora Tezi, Auburn University, Alabama, ABD.
48. Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. and Gulati, R. 1999. Microbial Lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science* 77: 101-115.
49. Jaeger, K. ve Reetz, M. T., 1998. Microbial Lipases form versatile tools for biotechnology, *TTPTECH*, 16, pp. 396-403.

50. Muller, H., Austin, L. ve Posorske, J. G., 1987. Paper Presented at National AOCS Meeting, New Orleans, May, 19, pp. 15
51. Wiseman, A., 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edition, John Wiley& Sons, Chicester, England, pp. 457 s.
52. Klibanov, A.M.1990. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Accounts of Chemical Research* 23: pp. 114-120.
53. Hou, C.T.2002. Industrial uses of lipase. *In Lipid Biotechnology*, pp. 387-397.
54. Akşamoğlu, A., 1997. Lipaz enziminin florisil üzerine immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
55. Dalla Rosa, C.,Morandim, M.B., Ninow, J.L., Oliveira, D., Treichel, H., Vladimir Oliveira, J. 2008. Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane. *The journal of Supercritical Fluids* pp. 49-53.
56. Öztürk, B. 2001. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Institute of Technology, pp. 106, İzmir.
57. Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A. B., Basri, M., 2006. Lipases: Introduction, New Lipases and Proteases. *Nova Science Publishers, Inc.*, pp. 1-22, New York.
58. Gandhi, N.N. 1997. Review: Applications of Lipase. *Journal of American Chemist's Society* 74: 621-634.
59. Gao, Y.Y., Chen, W.W., Lei, H., Liu, Y., Lin, X., Ruan, R. 2008. Optimization of transesterification conditions for the production of fatty acid metyl ester (FAME) from Chinese tallow kemel oil with surfactant-coated lipase. *Biomass and Bioenergy* 33 (2): 277-282.
60. Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha, A., 2011. Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overviewl. *Research Journal of Microbiology* 6 (1):1-24.
61. Elibol, M., Yaşa, İ., Karaçancı, Ş., Çoban, I., Özsoy, G., 2008. Zeytinyağı işletmeleri katı (prina) ve sıvı (karasu) atıklarından mikrobiyal lipaz üretimi. pp.10, *Tubitak*, Ankara.

62. Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J., 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9: 4-6, 113-148.
63. Divakar, S., Manohar, B., 2007. Use of lipases in industrial production of esters, industrial enzymes structure function and applications. *Julio Polaina ve Andrew P. MacCabe Editörs Springer, Spain, 17: 283-300.*
64. Prabhu, V. A., Tambe, S. P., Gandhi, N. N., Sawant, S. B., Joshi, J. B., 1999. Rice bran lipase: Extraction, activity and stability. *Biotechnology Progress* 15: 1083-1089.
65. Dandik, L., Aksoy, H. A., 1996. Applications of nigella sativa seed lipase in oleochemical reactions. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 277-281.
66. Vulfson, E. N., 1994. Industrial applications of lipases, In: Wooley, P., Peterson, S. B., editors, *Lipases-their structure biochemistry and applications*, Cambridge University Pres, pp. 271-288.
67. Schmid, R. D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, pp. 1608-1633.
68. Bornscheuer, U. T., 2000. *Enzymes in lipid modification*, Weinheim: Wiley-VCH, pp. 66.
69. Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U.T. 1998. Biotransformations with lipase. *Biotechnology* 8: 37-192.
70. Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S. 2001. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochemistry* 36 (10): pp. 933-939.
71. Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification* 41: 38-44.
72. Gill, I., Valivety, R. 1997. Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* 15: 401-409.
73. Belarbi, E.H., Molina, E., Chisti, Y. 2000. A process for highly yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 516-529.

74. <http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir>. [HYPERLINK](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html)
["http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html"](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html) [HYPERLINK](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html)
["http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html"](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html) [HYPERLINK](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html)
["http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html"](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html) [HYPERLINK](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html)
["http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html"](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html) [HYPERLINK](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html)
["http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html"](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html) [HYPERLINK](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html)
["http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html"](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html) [HYPERLINK](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html) [HTML](http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html) Web
adresin-den 21 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir.
75. Öztürk, B., 2002. Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. *İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Gıda Mühendisliği Dergisi* 20-23.
76. Tanyol, M., 2011. Pseudomonas Fluorescens (NRRL B-2641) Bakterisi Kullanılarak Lipaz Üretimi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, pp. 145.
77. [_ozkan.balikesir.edu.tr/ads/adsorpsiyon09.pps](http://ozkan.balikesir.edu.tr/ads/adsorpsiyon09.pps) web adresinden 21 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir. Biyosensörler konusunda Power Point sunusudur.
78. kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok10.ppt web adresinden 21 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir. Biyosensörler konusunda Power Point sunusudur.
79. Dindar, E., Topaç Şağban, F.O., Başkaya, H.S., 2010. Kirlenmiş Toprakların Biyoremediasyon ile Islahı. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 15 (2): 123-137.
80. Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı. *KSU journal Science and Engineering* 5(1): 61-71.
81. Irie, Y., T. Matsukura., K. Hata., 1989. European Patent, app. EP 374700.
82. Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S., 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molaculer Catalysis B: Enzymatic* 16, 53-58.
83. Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., Kondo, A., 2001. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of Rhizopus oryzae lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Applied Microbiology Biotechnology* 57, 515-520.

84. <http://biyokure.org/biyodizelin-cevreye-etkisi/5482/Web> adresinden 22 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir.
85. Gürkaya, B., Akbin, M., Uyar, B., Kapucu, N., Biyodizel üretimi için *Thermomyces Lanuginosa* lipazının farklı desteklere tutuklanması. 4. Enerji Verimliliği ve Kalitesi Sempozyumu, 12-13 Mayıs 2011 Kartepe/Kocaeli pp. 262-264.
86. Cortez, J., Mangiapane, H., Cortez, L., Griffin, M. 1999. Application of enzyme technology in the textile industry. The Nottingham Trent University, ISBN 0-905488-45-8.
87. Gao, X. G., Cao, S. G., Zhang, K. C. 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 74-82.
88. Kojima, Y., Shimizu, S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (3): 219-226.
89. Sera, M., Tanaka, K., Morita, T., Ueki, H., 1990. Increasing effect of vanadate on lipoprotein lipase activity in isolated rat fat pads. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 279: 291-297.
90. Brockerhof, H., Jensen, R. G., 1974. Lipolytic Enzymes, Academic Press, London, pp. 329.
91. Mukherjee, K. D., Hills, M. J. 1994. in Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application (Woolley, P. and Petersen, S. B., eds), Cambridge University Press, Cambridge. pp. 49-75.
92. Strohfeltdt, P., Heugel, C., 1984. Characterization of triglyceride lipase activities in rat skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 121: 87-95.
93. Chung, J., Scanu, A. M., 1977. Isolation, molecular properties, and kinetic characterization of lipoprotein lipase from rat heart. *The Journal of Biological Chemistry* 252: 4202-4209.
94. Kresse, H., Loffler, B. M., Kunze, H., 1991. Improved procedure for the purification of hepatic lipase from rat liver homogenate. *Biochemistry International* 23: 885-893.

95. Gjellesvik, D. R., Lombardo, D., Walther, B. T., 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*) purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1124: 123-134.
96. Metin, K., Akpınar, M. A., 2000. Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792 karaciğer lipaz enziminin kinetik özellikleri. *Turkish Journal of Biology* 24: 489-502.
97. Rathelot, J., Julien, R., Bosc-Bierne, I., Gargouri, Y., Canioni, P., Sarda, L., 1981. Horse pancreatic lipase. Interaction with colipase from various species. *Biochimie* 63: 227-234.
98. Mejdoub, H., Reinbolt, J., Gargouri, Y., 1994. Dromedary pancreatic lipase: Purification and structural properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1213: 119-126.
99. Lee, M. W., Severson, D. L., 1994. Partial purification of diacylglycerol lipase from bovine aorta. *Biochemical Journal* 298: 213-219.
100. Iverirus, P. H., Ostlund-Lindqvist, A. M., 1976. Lipoprotein lipase from bovine milk. *The Journal of Biological Chemistry* 251: 7791-7795.
101. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Lipaz> web adresinden 26 Mart 2015 tarihinde elde edilmiştir.
102. Zechner, R., 1990. Rapid and simple isolation procedure for lipoprotein lipase from human milk. *Biochimica et Biophysica Acta* 1044: 20-25.
103. Somma-Delpero, C., Valette, A., Lepetit-Thevenin, J., Nobili, O., Boyer, J., Verine, A., 1995. Purification and properties of a monoacylglycerol lipase in human erythrocytes. *Biochemical Journal* 312: 519-525.
104. Dichek, H. L., Parrott, C., Ronan, R., Brunzell, J. D., Brewer, H. B., Santamarina-Fojo, S., 1993. Functional characterization of a chimeric lipase genetically engineered from human lipoprotein lipase and human hepatic lipase. *Journal of Lipid Research* 34: 1393-1401.
105. Stead, D., 1986. Microbial Lipases: their characteristic, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research* 53: 481-505.
106. Hadeball W., 1991. Production of Lipase by *Yarrowia lipolytica* I. Lipases from yeasts (Review). *Acta Biotechnolgy* 11 (2): 159-167.
107. Wiseman, A. 1995. Introduction to principles. In: Wiseman A, editor. Handbook of enzyme biotechnology. 3rd ed. Padstow, Cornwall, UK: Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd, pp. 3-8.

108. Gill, J., Parish, J.H. 1997. Minireview: Lipases-Enzymes at an Interface. *Biochemical Education* 25 (1): 2-5.
109. Ülker, S., 2009. Toprak Kökenli Mikrofunguslarda Lipaz Üreten Suşların Araştırılması, Lipaz Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, pp. 72, Trabzon.
110. Balashev, K., Jensen, T. R., Kjaer, K., Bjornholm, T. 2001. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie* 83 (5): 387-397.
111. Sağıroğlu, A., Arabacı, N., 2005. Sunflower seed lipase: Extraction, purification, and characterization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 35: 41-56.
112. Singer, T. P., Hofstee, B. H. J., 1948. Studies on Wheat Germ Lipase. In: Methods of Estimation, Purification, and General Properties of the Enzyme. *Archives of Biochemistry* 18 (2): 229-243.
113. Rose, D. J., Pike, O. A., 2006. A Simple method to measure lipase activity in wheat and wheat bran as an estimation of storage quality. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 83 (5): 415-419.
114. Korneeva, O. S., Popova, T. N., Kaprochikov, V. S., Montina, E. A., 2008. Identification of Catalytically Active Groups of Wheat (*Triticum aestivum*) Germ Lipase. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44 (4): 349-355.
115. Başkurt L. 2005. Badem (*Amygdalus communis* L.) proteinlerinden lipaz izolasyonu ve özelliklerinin belirlenmesi. *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, pp. 94. Tekirdağ.
116. Kılıç, İ. 2003. Batı Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen fındık (*Corylus avellana* L.) tohumundan lipaz izolasyonu ve katalitik özelliklerinin belirlenmesi. *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, pp. 67. Tekirdağ.
117. Parcerisa, J., Codony, R., Boatella, J., Rafecas, M., 1999. Triacylglycerol and phospholipid composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) lipid fraction during fruit development. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47: 1410-1415.
118. Huang, A. C., Moreau, R. A., 1978. Lipases in the storage tissues of peanut and other oil seeds during germination. *Planta* 141 (1): 111-116.

119. Beisson, F., Gardies, A. M., Teissere, M., Ferte, N., Noat, G., 1997. An esterase neosynthesized in post-germinated sunflower seeds is related to a new family of lipolytic enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry* 35: 761-765.
120. Sagiroglu, A., Arabaci, N., 2005. Purification and characterization of lipase from sunflower seed. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 35 (1): 37-51.
121. 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): 723-727.
122. Jacks, T. J., Yatsu, L. Y., 1974. "Phosphate Inhibition of Lipase Activity in Peanuts", *Journal of American Oil Chemist's Society* 51: 112-113.
123. Piazza, G., Bilyk, A., Schwartz, D., Haas, M., 1989. Lipolysis of olive oil and tallow in an emulsifier-free two-phase system by the lipase from oat seeds (*Avena sativa* L.). *Biotechnology Letters* 11: 487-492.
124. Mohamed, M., Mohamed, T. M., Mohamed, S. A., Fahmy, A. S., 2000. Distribution of lipases in the gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *avena fatua*. *Bioresource Technology* 73 (3): 227-234.
125. Polizelli, P. P., Tiera, M. J., Bonilla-Rodriguez, G. O., 2008. Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *pachiraaquatica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85 (8): 749-753.
126. Akova, A., Ustung, G., 2000. Activity and Adsorption of Lipase from *Nigella sativa* Seeds on Celite at Different pH values. *Biotechnology Letters* 22 (5): 355.
127. 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 American Oils Chemists' Society* 80 (1): 43-48.
128. İsbilir, S. S., Ozcan, M. H., Yagar, H., 2008. Some Biochemical Properties of Lipase from Bay Laurel (*Laurus nobilis*L.) Seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85 (3): 227-233.
129. Lin, Y. H., Yu, C., Huang, A. H., 1986. Substrate specificities of lipase from corn and other seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 244 (1): 346-356.

130. Huang, A. H. C., Lin, Y. H., Wang, S. M., 1988. Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 65 (6): 897-899.
131. Wanasundara, P. K. P. D., Wansudara, U. N. and Shahidi, F., 2001. Lipolytic activity of enzymes from germinating seeds of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Food Lipids* 8: 75-84.
132. Borek, S., Ratajczak, W., Ratajczak, L., 2006. Ultrastructural and Enzymatic Research on the Role of Sucrose in Mobilization Storage Lipids in Germinating Yellow Lupine Seeds. *Plant Science* 170 (3): 441-452.
133. Kubicka, E., Grabska, J., Jedrychowski, L. and Czyz, B., 2000. Changes of specific activity of lipase and lipoxygenase during germination of wheat and barley. *International Journal of Food Science and Nutrition* 51 (4): 301-304.
134. Kun, O. S. M., 1997. Chemical changes and nutritive values of burukutu (a Nigeria beverage). *Nahrung* 41 (6): 375-377.
135. Uvere, P. O., Orji, G. S., 2002. Lipase activities during malting and fermentation of sorghum for burukutu production. *Journal of the Institute of Brewing* 108 (2): 256-260.
136. Sammaour, R. H., 2005. Purification and partial characterization of an acid lipase in germinating lipidbody linseedlings. *Turkish Journal of Botany* 29 (3): 177-184.
137. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Papatyagiller>. Erişim Tarihi: 9 Temmuz 2013.
138. Baytop A., 1996, Farmasötik Botanik Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. Üniversite Yayın No:3637, Eczacılık Fakültesi Yayın No:58, pp. 315.
139. Ahmet Maranki, Kozmik bilgiler ışığında Şifalı Bitkiler. 2008: Mozaik yayınları.
140. Gül G., 1995, *Matricaria chamomilla* L. var. *recutita* Grierson Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, TC. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi pp. 96, Ankara.
141. Hadi, M. H. S., Noormohammadi, G., Sinaki, J. M., Khodabandeh, N., Yasa N., and Darzi, M. T., 2004, Effects of planting time and plant density on flower yield

and active substance of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/3/5/280_hadim.htm, (erişim tarihi: 26 Aralık 2006)

142. Marquard, R., und Kroth, E., 2001. Anbau Und Qualitätsanforderungen Ausgewählter Arzneipflanzen Buchedition Agrimedia GmbH Spittal 4 Bergen/Dumme., pp. 302.

143. Orav, A., Kailas, T., and Ivask K., 2001, *Matricaria recutita* L. Essential constituents of from Estonia, Proc. Estonian Acad. Sci. Chem., pp. 50, 1, 3945.

144. Salamon, I., 2004, The Slovak gene pool of german chamomile (*Matricaria recutita* L.) and comparison in its parameters, Hort. Sci. (Prague), 31(2), pp. 70-75.

145. Pirzad, A., Alyari, H., Shakiba, M. R., Salmasi S., Z., and Mohammadi A., 2006, Essential oil content and composition of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes, Journal of Agronomy 5 (3), 451-455.

146. İşman, Ö. G., 2009, *Matricaria recutita* (alman papatyası), *Fitomed :Bilimsel Fitoterapi Dergisi*, 2(10), 43-46.

147. Horst, B., Ingeborg, G., Rolf F., Kristina, W., 200,1 Physiological postharvest responses of *matricaria* (*Matricaria recutita* L.) flowers, Postharvest Biology and Technology . 22, 39-51.

148. Ceylan, A., 1996, Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ Bitkileri), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 481, 306.

149. Pirzad, A., Shakiba, M., R., Salmasi, S. Z., Mohammadi, S. A., Darvishzadeh, R., Hassani, A., 2010, Phenology of German Chamomile and its Changes under Different Irrigation Regimes and Plant Densities, *Notulae Scientia Biologicae*, 2(1) 43-48.

150. Baghalian K., Haghiry, A., Naghavi, M. R., Mohammadi, A., 2008, Effect of saline irrigation water on agronomical and phytochemical characters of chamomile (*Matricaria recutita* L.), *Scientia Horticulturae* 116, 437-441.

151. Royer, F.a.R.D., Weeds of the Northern US and Canada. 1999, University of Alberta Press: Edmonton, Canada.
152. T.C. Millî Eğitim Bakanlığı. 2008. (Mesleki eğitim ve öğretim sisteminin güçlendirilmesi projesi) Bahçecilik Compositae familyası. Ankara.
153. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
154. Warburg, O., Christian, W., 1941. Isolierung und Kristallinsation des Garungsferments Enolase. *Biochemische Zeitschrift* 310: 384-421.
155. Erlanson, C., 1970. p-Nitrophenyl acetate as a substrate for a carboxyl-ester hydrolase in pancreatic juice and intestinal content. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 5: 333-336.
156. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
157. Sobek, H., Gorich, H., 1988. Purification and characterization of a heat-stable esterase from the Thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemical Journal* 250: 453-458.
158. Torossian, K., Bell, A. W., 1991. Purification and characterization of an acid-resistant triacylglycerol lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 13, 205-211.
159. Basha, S.M., 1997. Separation of peanut proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 400-402.
160. Savage, G. P., Mcneil, D. L., Dutta, P. C., 1997. Lipid composition and oxidative stability of oils in hazelnuts (*Corylus avellana* L.) grown in New Zealand. *Journal of American Oil Chemist's Society* 74: 755-
161. 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: 1728-1738.
162. Abdou, M. A., 2003. Purification and partial characterization of psychrotrophiz *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science* 86: 127-132.

163. Namboodiri, V. M. H., Chattopadhyay, A., 2000. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids* 35: 495-502.
164. Dong, H., Gao, S., Han, S., Cao, S., 1999. Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30: 251-256.
165. İlgün, R., 2016. Kestane Tohumundan (*Castanea Sativa*) Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 114.
166. Hiol, A., Jonzo, M. D., Druet, D., Comeau, L., 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *Hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 80-87.
167. Staubmann, R., Ncube, I., Gubitz, G. M., Steiner, W., Read, J. S., 1999. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. *Journal of Biotechnology* 75: 117-126.
168. Fuchs, C., Vine, N., Hills, M. J., 1996. Purification and characterization of acid lipase from the endosperm of castor oil seeds. *Journal of Plant Physiology* 149: 23-29.
169. Abigor, D. R., Opute, F. I., Opoku, A. R., Osagie, A. U., 1985. Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 599-606.
170. Haas, M. J., Cichowicz, D. J., Dierov, J. K., 2001. Lipolytic activity of California-laurel (*Umbellularia Californica*) seeds. *Journal of American Oil Chemist's* 78 (10): 1067-1071.
171. Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., Comeau, L. C., 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 421-430.
172. Sanz, L. C., Olais, J. M., 1990. Characterization of lupin seed lipase. *Food Chemistry* 37: 221-228.

173. Dharmsthiti, S., Ammaranond, P., 1997. Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 26: 111-116.

174. Lotrakul, P., Dharmsthiti, S., 1997. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *Journal of Biotechnology* 54: 113-120.



ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Giresun Merkez İlçesi'nde doğdu. İlköğrenimini Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda, Orta öğrenimini Giresun Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2014 yılında mezun oldu. Halen Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Yüksek Lisans programına devam etmektedir.

