



GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KESTANE (*Castanea sativa*) TOHUMUNDAN LİPAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

RİDVAN İLGÜN
OCAK 2016

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KESTANE (*Castanea sativa*) TOHUMUNDAN LİPAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

RİDVAN İLGÜN

OCAK 2016

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün Onayı.

17.01.2016

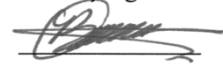
Doç. Dr. Mustafa Serkan SOYLU



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



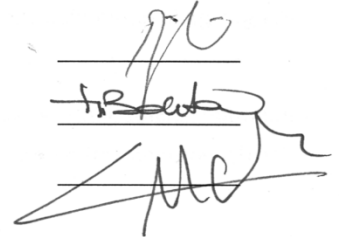
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Doç. Dr. Hakan BEKTAŞ

Yrd. Doç. Dr. Melek Çol AYVAZ



ÖZET

KESTANE (*Castanea sativa*) TOHUMUNDAN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

İLGÜN, Rıdvan

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Ocak 2016, 114 sayfa

Bu çalışmada, ülkemizde Giresun İli ve çevresinde bol miktarda yetişen kestane (*Castanea sativa*) tohumlarından lipaz enzimi ilk defa saflaştırıldı ve kinetik özellikleri incelendi.

Petrol eteri ile yağı uzaklaştırılmış kestane tohumları 0.06 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.0) ile homojenize edildi. Lipaz esterase aktivitesi gösteren homojenizatın %90'lık (NH₄)₂SO₄ kesiti elde edildi. Dializden sonra bu kesit sırasıyla hidroksiapatit ve DEAE-selüloz kolonlara uygulanarak lipaz enzimi 186.87 kez saflaştırıldı. Saflaştırma işlemlerinde protein miktarı Lowry ve E₂₈₀/E₂₆₀ Warburg yöntemlerine göre, lipaz esterase aktivitesi ise Erlanson yöntemine göre tayin edildi.

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

Optimum pH ve sıcaklık değerleri, pH ve sıcaklık stabiliteleri, optimum reaksiyon süresinin tayini, uygun enzim ve substrat konsantrasyonu belirlendi.

Kestane tohumlarından saflaştırılan lipazın optimum pH'sının 9.0, optimum sıcaklığının 30°C olduğu bulundu.

Enzimin çeşitli substratlara karşı ilgisi incelendiğinde, lipazın ilgisinin en çok p-nitrofenil miristada olduğu ve bu substrata karşı K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 1.017 mM ve 163.874 Ünite olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Kestane (*Castanea sativa*) Tohumu, Lipaz, Saflaştırma, Karakterizasyon.

ABSTRACT

LIPASE PURIFICATION FROM THE SEEDS OF CHESTNUT (*CASTANEA SATIVA*) AND ITS INVESTIGATION OF SOME KINETIC PROPERTIES

İLGÜN, Rıdvan

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bahar SÖKMEN

January 2016, 114 pages

In this study, lipase was firstly purified from chestnut (*Castanea sativa*) seeds, being abundant in Giresun (Turkey) and surroundings and the kinetic properties of the enzyme were investigated.

Chestnut seeds, being fat-free with petroleum ether extraction, were homogenized with 0.06 M sodium phosphate buffer (pH=7.0) 90% 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 186.87 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 chestnut seeds had an optimum pH value of 9.0 and an optimum temperature of 30°C.

When high affinity for various substrates of the enzyme is analyzed, it was found that most of the lipase of interest in myristate and 1.017, respectively p-nitrophenyl is the K_m and V_{max} values against the substrate unit is mm and 163.874.

Key Words: Chestnut (*Castanea Sativa*) Seed, Lipase, Purification, Characterization.

TEŞEKKÜR

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

Deneyisel çalışmalarda birlikte çalıştığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Tamer AKKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Kestane ve kestane tohumunun teşhisini yapan Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç.Dr. Zafer TÜRKMEN'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, **Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Biriminin FEN-BAP-A-220413-43** numaralı projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLOLAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
RESİMLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi.....	2
1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması	5
1.1.2. Enzimlerin Numaralandırılması ve Sınıflandırılması	6
1.1.1.1. Oksidoredüktazlar.....	6
1.1.1.2. Transferazlar	7
1.1.1.3. Hidrolazlar.....	7
1.1.1.4. Liyazlar.....	7
1.1.1.5. İzomerazlar:	7
1.1.1.6. Ligazlar (Sentetazlar).....	7
1.1.3. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Etmenler.....	9
1.1.3.1. Enzim Konsantrasyonu	9
1.1.3.2. Substrat Konsantrasyonu.....	10
1.1.3.3. Sıcaklık.....	10
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	12
1.1.3.10. İnhibitör.....	13
1.1.3.11. Substrat Yüzeyi	13
1.2. Enzim Endüstrisi	14
1.2.1. Başlıca Lipaz Kaynakları.....	16
1.2.2. Lipazların Sınıflandırılması	17
1.2.2.1. Spesifik Olmayan Lipazlar.....	17
1.2.2.2. 1,3-Spesifik Lipazlar.....	17
1.2.2.3. Yağ Asidi Spesifik Lipazlar	18
1.2.3. Lipazların Enzimatik Etkisi.....	18
1.2.4. Lipazların Katalizör Olarak Kullanımı	22
1.2.4.1. Hidroliz	20
1.2.4.2. Esterifikasyon.....	21
1.2.4.3. Transesterifikasyon	21
1.2.4.4. Doğal Olmayan Substratların Kataliz.....	22
1.2.5. Lipaz Enziminin Endüstriyel Uygulamaları.....	22
1.2.5.1. Yağ ve Oleokimya Endüstrisinde Lipazların Kullanımı.....	24
1.2.5.2. Biyolojik Olarak Bozunabilir Polimerlerin Üretiminde Lipazların Kullanımı	24
1.2.5.3. Tekstil Endüstrisinde Lipazların Kullanımı.....	25
1.2.5.4. Deterjan Endüstrisinde Lipazların Kullanımı	25
1.2.5.5. Gıda Endüstrisinde Lipazların Kullanımı	26
1.2.5.6. Rasemik Karışımların Ayırıştırılmasında Lipazların Kullanımı ...	28

1.2.5.7. Kozmetikte Lipazların Kullanımı	28
1.2.5.8. Tanı Aracı Olarak Lipazların Kullanımı	29
1.2.5.9. Medikal Uygulamalarda Lipazların Kullanımı	29
1.2.5.10. Biyosensör (Biyalgılayıcılar) Olarak Lipazların Kullanımı....	30
1.2.5.11. Deri Temizlemede (Yağ Gidermede) Lipazların Kullanımı	30
1.2.5.12. Çevre Yönetiminde Lipazların Kullanımı.....	31
1.2.5.13. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Lipazların Kullanımı ...	32
1.2.5.14. Biyodizel Üretiminde Lipazların Kullanımı	33
1.2.6. Lipazların Çeşitli Kaynaklardan Saflaştırılması	34
1.3. Kestane Bitkisi ve Özellikleri	39
1.3.1. Kökeni ve Yayılışı.....	40
1.3.2. Dünyada ve Türkiye’de Kestane Üretimi	40
1.3.3. Endüstriyel Önemi	46
1.3.3.1. Kestane Tohumu	47
1.3.3.2. Kestane Tohumunun Kimyasal Bileşimi	48
2. MATERYAL VE METOT	51
2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	51
2.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	51
2.3. Kestane Tohumu Ham Ekstresinin Hazırlanması	53
2.4. Kestane Tohumu Ham Ekstresinde Lipazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması	53
2.5. Kestane Tohumu Ham Ekstresinde Lipazın %90 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi	54
2.6. Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi	55
2.7. Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografisi	55
2.7.1. DEAE-Selülozun Hazırlanması	55
2.7.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Uygulaması	55

2.8. Protein Miktar Tayini	56
2.8.1. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	566
2.8.1.1. Deneyin Yapılışı.....	566
2.8.1.2. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi	57
2.9. E ₂₈₀ /E ₂₆₀ Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	57
2.10. Lipaz Aktivitesinin Tayini	59
2.10.1. Esteraz Aktivitesi Tayini.....	59
2.10.1.1. Ayraçlar.....	59
2.10.1.2. Deneyin Yapılışı	59
2.11. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	60
2.11.1. Kullanılan Çözeltiler	60
2.11.2. Jellerin Hazırlanması.....	60
2.11.3. Enzim Saflığının SDS - PAGE ile Kontrolü	61
2.12. Kestane Tohumundan Elde Edilen Lipazın Esteraz Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi	62
2.12.1. Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi	62
2.12.2. pH Stabilitesi.....	63
2.12.3. Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	63
2.12.4. Termal Stabilite	63
2.12.5. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması.....	64
2.12.6. Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi.....	64
2.12.7. Enzim Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	64
2.12.8. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	65
3. BULGULAR	66

3.1. Kestane Tohumu Lipazının Saflaştırılması.....	66
3.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu	66
3.1.2. Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi	66
3.1.3. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi	66
3.1.4. SDS-PAGE Elektroföresi	70
3.1.5. Esteraz Aktivitesine pH'nın Etkisi.....	71
3.1.6. Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi	71
3.1.7. Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	72
3.1.8. Esteraz Aktivitesinin Termal Stabilitesi	73
3.1.9. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması	73
3.1.10. Lipaz Enziminin Farklı Substratlara Göre K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	74
3.1.11. Enzim Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	76
3.1.12. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	77
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	78
5. KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ.....	98

TABLULAR DİZİNİ

1.1 Enzimlerin Kod Numaralarına Göre Sınıflandırılması.....	8
1.2 Endüstride Kullanılan Bazı Enzimler.....	15
1.3 Lipazların Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması.....	17
1.4 Lipazların Endüstriyel Kullanımına Örnekler.....	23
1.5 Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımının Tarihsel Gelişimi.....	32
1.6 İnsanlarda Bulunan Lipazlar.....	34
1.7 Bakteriyel Lipaz Kaynakları.....	36
1.8 Fungal Lipaz Kaynakları.....	36
1.9 Novo Nordisk Firmasının Farklı Alanlarda Kullanılan Ürünleri	37
1.10 Endüstriyel Olarak Önemli Lipaz Üreten Firmalar.....	38
1.11 Kestane Türlerinin Dünyaya Yayılışı.....	40
1.12 Kestane Türlerinin Seksiyonlarına Göre Ayırımı, Latince ve Genel Adları ile Doğal Yetiştirme Alanları.....	41
1.13 Kestane Grupları ve Türleri	41
1.14 Dünya Kestane Üretimi	42
1.15 Kestane Hastalıkları ve Zararlıları.....	43
1.16 Karadeniz Bölgesi Kestane Çeşitlerinin Kimyasal Bileşimleri.....	48
1.17 Aydın İlinde Yetiştirilen Bazı Kestane Çeşitlerinin Bileşimleri.....	49
1.18 Kestane Tohumunun Bileşimi ve Besin Öğeleri (g/100g).....	49
2.1 E ₂₈₀ /E ₂₆₀ Warburg Yöntemi ile Protein Miktar Tayininde Kullanılan Faktör Tablosu.....	58
3.1 Kestane Tohumlarından Lipazın Elde Edilme Evrelerinin Esteraz Aktivitesine Göre İncelenmesi.....	69
3.2 Kestane Tohumu Lipazının Farklı Substratları için K _m ve V _{max} Değerleri.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1 Enzim Substrat İlişkisi	4
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 Kestane Tohumu Ham Ekstresinin %90 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği.....	67
3.2 Hidroksilapatit Kolonu 100 Mm'lık Elüatının DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği.....	68
3.3 SDS-PAGE Jel Elektroforezi.....	70
3.4 Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	71
3.5 Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi.....	72
3.6 Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	72
3.7 p-Nitrofenil Asetatın Sıcaklık Stabilitesi.....	73
3.8 Zamanın Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	74
3.9 p-Nitrofenil Asetat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	74
3.10 p-Nitrofenil Bütirat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	75
3.11 p-Nitrofenil Kaprat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	75
3.12 p-Nitrofenil Laurat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi.....	75
3.13 p-Nitrofenil Miristad Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi... ..	76
3.14 Enzim konsantrasyonunun lipaz esteraz aktivitesine etkisi.....	77
3.15 Substrat konsantrasyonunun lipaz esteraz aktivitesine etkisi.....	77

RESİMLER DİZİNİ

1.1 Hacı İbiş Kestanesi	44
1.2 Osmanoğlu Kestanesi.....	45
1.3 Sarıaşılama Kestanesi.....	45
1.4 Hacı Ömer Kestanesi.....	45
1.5Giresun Bölgesinden Toplanan Kestane Ağacı ve Tohumlarına Ait Görseller.....	48

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, canlı organizmada kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün oluşturmayan, %100'lük bir verim sağlayan biyolojik katalizörler olup; proteinlerin en büyük özelleşmiş grubunu teşkil etmektedirler (1).

Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü enzimin kendisi değişikliğe uğramadan düzenlemektedir. Metabolik reaksiyonların büyük bir kısmı enzimler yardımıyla kontrol edilip hızlandırılır. Reaksiyonun başlangıç aşamasında enzimin etki ettiği madde substrat olarak adlandırılırken, reaksiyon sonucu miktarında artış görülen ve açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılır. 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 (2).

Lipazlar (E.C.3.1.1.3; trigliserol açilhidrolazlar), triaçilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Endüstride ve bilimsel araştırmalarda; hidroliz, esterleşme, transesterleşme, peptid sentezi gibi reaksiyonları ve bölge seçimli, stereoseçimli mekanizmaları katalizlemekte kullanılırlar (3,4).

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 (5).

Lipazlar, birçok tepkimeyi katalizleyebilme becerileri ile endüstride deterjan, gıda, deri, kağıt, kozmetik ve farmasötik alanlarda geniş bir kullanıma sahiptirler. Hidrolitik lipazların başlıca ticari kullanım alanı deterjanlardır. Toplam lipaz kullanımının %32'si deterjan endüstrisinde gerçekleşmektedir (3,4). Lipaz kullanım alanlarına süt ürünleri, unlu mamüller, içecekler, yiyecek sosları, et ve balık ürünleri, yağlar, kimyasallar ve temizlik ürünleride ilave edilmelidir (6). Hidrolitik enzimler

arasında lipazlar en geniş kullanım alanına sahip enzimlerdir (7). Lipazlar kullandıkları substratların çeşitliliği ve ekstrem koşullarda (sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi ortamlarda) kararlı yapılarını koruyabilme sebeplerinden dolayı önemli biyokatalizörler arasındadırlar (8,9).

Bitkisel yağlı tohumlardan lipaz izolasyonu ve saflaştırılması üzerine yapılan araştırmalar incelenerek çalışma yapılmıştır (10,11). Kestane tohumu bileşiminde, proteinler ve yağlar gibi önemli besin ve bileşenleri bulunmaktadır. Bitkisel yağlı bir tohum olan kestane protein kapsamında lipazların bulunabileceği düşünülmektedir.

Türkiye, kestane üretiminde dünyada önde gelen ülkelerden biridir. Lipazlar birçok bitkisel, hayvansal ve özellikle mikroorganizmalardan saflaştırılmasına rağmen, bugüne kadar kestane tohumlarından saflaştırılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, Giresun'da yetişen kestane tohumundan (*Castanea sativa*) lipaz enzimi ilk defa saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Saflaştırılan enzimin substrat spesifitesi, optimum reaksiyon süresi, optimum sıcaklık, optimum pH'ı, pH ve 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 hücrelerde oluşan ve canlılardaki tüm reaksiyonların çok ılıman koşullarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki biyokimyasal katalizörlerdir (12). Hücre içerisinde üretilmesine rağmen birçoğu hücre dışında da aktivitelerine devam edebilirler (13,14). Enzimler bu özellikleri sayesinde endüstriyel alanlarda kullanım imkanı bulmaktadır.

Enzimin etkilediği maddeye '**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 (13).

Enzim alanında yapılan ilk çalışmalar, sindirime ilişkin enzimlerin araştırıldığı 1760-1825 yılları arasındadır. İlk kez 1825 yılında Berzelius, nişastanın

sindiriminde etkili olan bitkisel kaynaklı enzimler üzerinde çalışmış; 1860 yıllarında Pasteur fermentasyon enzimleri üzerinde araştırmalar yapmıştır. Fermentasyon ile ilişkilerinden dolayı başlangıçta verilen ferment adı 1878 yılında Khne tarafından Yunanca'da "maya içinde" anlamına gelen "enzim" ismi ile değiştirilmiştir (15). 1926'da James Sumner reazı izole ve kristalize ederek, spesifik enzimlerin özelliklerinin daha iyi incelenmelerine imkan sağlamıştır. Sumner, bu aşamada üreaz kristallerinin tamamen proteinden oluştuğunu keşfetmiş ve bütün enzimlerin protein olduklarını ileri sürmüştür. Bu düşünce, başka örneklerle desteklenmemesi sebebiyle bir süre tartışmalı kalmıştır. 1930'lara doğru John Northrop ve meslektaşlarının pepsin ve tripsini kristalize etmeleri ve bunların protein olduklarını bulmalarından sonra Sumner'ın vardığı sonuç yaygın olarak kabul görmüştür. Böylece enzimlerin protein yapısında olduğu ispatlanmıştır (16).

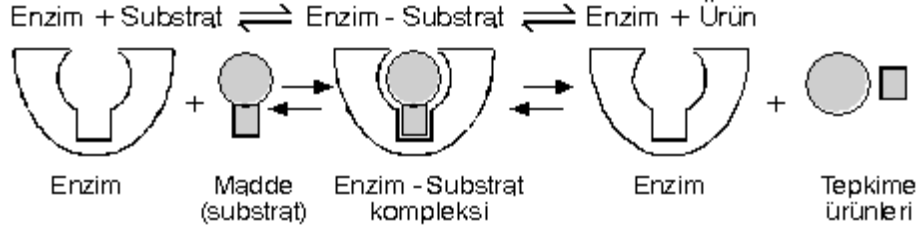
Enzimler, etkileşim içinde oldukları substratlarına karşı çeşitli düzeylerde özgünlük gösterir. Bir enzim, sadece tek bir substrat üzerinde etki ettiğinden ve sadece tek bir reaksiyonu katalizlediğinden "tam spesifiklik" gösterir. Yani aktif bölgesine yerleşebilecek tek bir türden substrat moleküllerine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

Bazı enzimler genel bir fonksiyonel gruba sahip olan bir sınıf substrat üzerine etkileme yapabilirler Bu durum, "grup spesifikliği" olarak ifade edilir. Örneğin; fosfatazlar, bir fosfat fonksiyonel grubu bulundurmalarına rağmen farklı substratların reaksiyonlarını katalizlemektedirler.

Kimyasal bağlara karşı zgn olan enzimlere ise "Bağ spesifikliği" olarak adlandırılır. Esterazlar bu gruba örnek verilebilir. Bu grub enzimler ester bağlarına sahip moleküllerin hidrolizini katalizlemekten sorumludurlar. Bazı enzimler ise "izomer spesifikliği" gösterir. (D-) ve (L-) izomer yapılarından sadece birinin reaksiyonunu katalizlerler (14).

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 adlandırılır (13).

Proteinlerin önemli bir sınıfını oluşturan enzimler peptid zincirleri halinde temel yapı taşı olarak amino asitlerden oluşan 3-boyutlu bir yapıyı teşkil eder. Enzimler bu 3-boyutlu tersiyer yapıları sayesinde, bağlanacakları ve değişime uğratacakları substrat moleküllerini seçme özelliğini kazanmışlardır. Kuaterner yapıları sahip birden fazla alt birimli enzimler mevcuttur. Enzimlerin kendilerine özgü bu 3-boyutlu yapıları substrat molekülünün uygun şekilde bağlanabilmesini sağlar. Bu durum enzimin katalitik aktivitesini sağlar.

Enzimlerin enzimlerle veya substratlarla gerçekleşen etkileşimleri proteinlerin 3-boyutlu yapılarının kazanılmasında da rol oynar. Bu etkileşimler genel

olarak iyonik bağ, Van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağı gibi etkileşimlerdir (14).

Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları katalizlenmemiş reaksiyonlara göre genellikle 10^6 - 10^{12} kat daha büyüktür (5,14). Enzimler çoğunlukla fizyolojik pH değerlerinde, 100°C 'nin altındaki sıcaklıklarda ve atmosferik basınçlarda biyokimyasal reaksiyonları katalizler (14).

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" mevcuttur. Bazı maddeler ise enzimlerin aktif bölgelerine tutunarak enzimin deformasyonunu sağlayarak, aktiviteyi düşürebilir. Hatta tamamen durdurabilir. Bu tür maddelere "inhibitör" adı verilir (17).

1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Bilinen enzimlerin sayısındaki artış 1950'lerin sonuna kadar çok hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. Bu gelişmeye paralel olarak aynı enzime farklı isimler verilmesi söz konusu olmuştur. Bu durumda adlandırmada karmaşıklığa sebep 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 1984 yılında

belirlenen sistematige göre 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 karışıklık olmaksızın sorunsuzca kullanılabilir. Bu tür yaklaşımlar literatürlerde yaygın olarak uygulanmaktadır (17).

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.

- a) İlk rakam, enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu belirtir.
- b) İkincisi, enzimin alt sınıfını (Subclass) ifade eder.
- c) Üçüncü rakam, ikinci alt grubu (Sub-Subclass),
- d) 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:

- i. Oksidoredüktazlar,
- ii. Transferazlar,
- iii. Hidrolazlar,
- iv. Liyazlar,
- v. İzomerazlar,
- vi. Ligazlar (1,16-18)

1.1.1.1. Oksidoredüktazlar

İndirgenme ve yükseltgenme olayını katalizleyen enzimlerdir. 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.

1.1.1.2. Transferazlar

Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Tek karbonlu grupları, aldehit ve keton gruplarını, açıl gruplarını, glikozil gruplarını, fosfat gruplarını, kükürt içeren grupları aktaranlar olmak üzere farklı alt sınıflara ayrılırlar.

1.1.1.3. Hidrolazlar

Hidroliz reaksiyonlarını, suyun $[H]^+$ ve $[OH]^-$ iyonları yardımıyla moleküllerin yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir. 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.

1.1.1.4. Liyazlar

Bir organik moleküldeki grupların hidrolitik veya oksidatif olmayarak ayrılmasını kataliz ederler. C-C, C-O, C-N gibi gruplar arasında çift bağ oluşturarak substrattan bazı grupların ayrılmasını katalizleyen enzimlerdir. Örneğin; piruvat dekarboksilaz.

1.1.1.5. İzomerazlar

Substratın molekül içi değişikliklerini katalizleme özelliğine sahip enzimlerdir. 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.

1.1.1.6. Ligazlar (Sentetazlar)

Ligazlar iki molekülün birleşmesini kataliz ederler. Bu birleşme için gerekli enerji ATP (Adenozin trifosfat), ADP (Adenozin difosfat) gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanır. Örneğin; piruvat karboksilaz, asetil CoA karboksilaz (18).

Tablo 1.1 Enzimlerin Kod Numaralarına Göre Sınıflandırılması (13)

1. Oksidoredüktazlar	Redoks reaksiyonlarını katalizler.
1.1	CH-OH grubuna etki edenler.
1.2	C-O grubuna etki edenler.
1.3	C-CH grubuna etki edenler.
1.4	C-NH ₂ grubuna etki edenler.
1.5	CH-NH grubuna etki edenler.
2. Transferazlar	Fonksiyonel grupların transferinde görev yaparlar.
2.1	C1- gruplarını transfer edenler.
2.2	Karbonil gruplarını transfer edenler.
2.3	Açıl gruplarını transfer edenler.
2.4	Glikozil gruplarını transfer edenler.
2.5	N- içeren gruplarını transfer edenler.
2.6	Fosfat gruplarını transfer edenler.
2.7	S- gruplarını transfer edenler.
3. Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler.
3.1	Esterleri hidrolizleyenler.
3.2	Glikozid bağlarını hidrolizleyenler.
3.4	Peptid bağlarını hidrolizleyenler.
3.5	Diğer C-N bağlarını hidrolizleyenler.
3.6	Asit anhidridlerini hidrolizleyenler.
4. Liyazlar	Çifte bağa katılma ve çifte bağın oluşum reaksiyonlarını katalizlerler.
4.1	C-C Liyazlar
4.2	C-O Liyazlar
4.3	C-N Liyazlar
5. İzomerazlar	İzomerleşme reaksiyonlarını katalizlerler.
5.1	Rasemazlar
5.3	İntramoleküler oksidoredüktazlar.
5.4	İntramoleküler transferazlar.
6. Ligazlar	Sentez reaksiyonlarını katalizlerler.
6.1	C-O bağını oluşturanlar.
6.2	C-S bağını oluşturanlar.
6.3	C-N bağını oluşturanlar.
6.4	C-C bağını oluşturanlar.

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 (14).

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

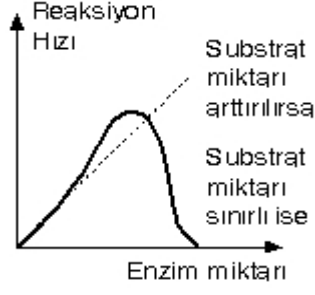
Özgül (spesifik) aktivite: Miligram protein başına düşen enzim aktivitesidir. Bu tanım daha çok izole edilen enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla kullanılır.

Dönüşüm sayısı (k_{kat}): Her bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısıdır (16).

Enzim reaksiyon hızı üzerine enzim ve substrat konsantrasyonlarının, sıcaklığın, ortam pH'ının, zamanın, reaksiyon ürünlerinin, hormonların, ışık vb. gibi fiziksel faktörlerin etkisi vardır (14).

1.1.3.1. Enzim Konsantrasyonu

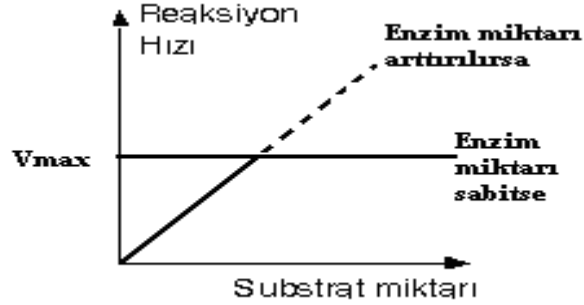
Substratın yüksek miktarda bulunduğu bir ortamda optimal şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı (V_0), enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Belirli bir süre sonra ortamda enzimin reaksiyona girebileceği substrat sınırlı olduğundan hız giderek azalmaya başlar (14).



Şekil 1.2 Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi (14)

1.1.3.2. Substrat Konsantrasyonu

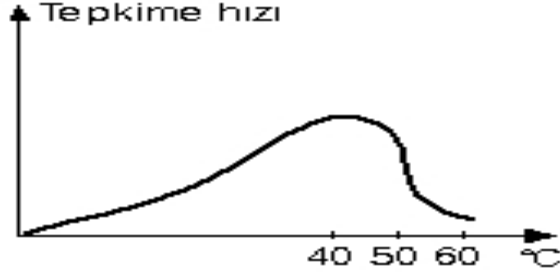
Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe ortamda reaksiyona girebilecek enzim bulunmadığından hız giderek daha az artar ve belirli bir maksimum hız (V_{max}) düzeyinde dengeye gelir ve sabitleşir (14). Aşağıda farklı kaynaktan alınan şekiller gösterilmiştir.



Şekil 1.3 Substrat Miktarının Reaksiyon Hızına Etkisi (14)

1.1.3.3. Sıcaklık

Enzimatik reaksiyonların hızı sıcaklık artışıyla belirli bir noktaya kadar artar. Ancak belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra enzimlerin yapıları denatüre olduğundan etkilerini kaybederler (14,19). Her enzimin substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir maksimum sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa “*optimum sıcaklık*” denir. (14).



Şekil 1.4 Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi (14)

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 etkisiz kalır ve yapısı bozulur (14).

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 (19).

1.1.3.5. Reaksiyon Ürünleri

Enzim reaksiyonu devam ettikçe, reaksiyon ürünleri belli bir zamandan sonra enzimin aktivitesinde düşmeye sebep olur ve enzim reaksiyonunun hızı azalır. Bu inhibisyonun temel sebebi, reaksiyon ürünlerinin molekül yapısı bakımından substrata benzemeleri ve enzime substrattan daha fazla bağlanma isteğidir (20).

1.1.3.6. Zaman

Enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızı, zamanla azalır. Bunun sebebi, reaksiyon ürünlerinin kendi aralarında birleşerek tersi yönde bir reaksiyon

meydana getirmeleri, zamanla enzimde aktive kaybının olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşması ve substratın tükenmesidir (14).

Bu faktörlerin etkilerini ortadan kaldırılmak için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unun kullanıldığı reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir (19).

1.1.3.7. Işık ve Diğer Fiziksel Etkenler

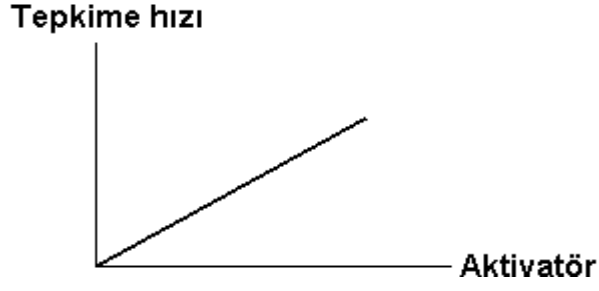
Enzimlerin etkisi ışığa bağlı olarak artabilir veya azalabilir. Enzim çözeltilerinin kuvvetlice çalkalanması neticesinde enziminyapısında bozulmaya yol açar (20).

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 sebep olarak aktivitesini kaybetmesine neden olurlar; Böylelikle, lösin, metiyonin, izolösin, ADP (Adenozin difosfat) tarafından geri çevrilebilir (16).

1.1.3.9. Aktivatör

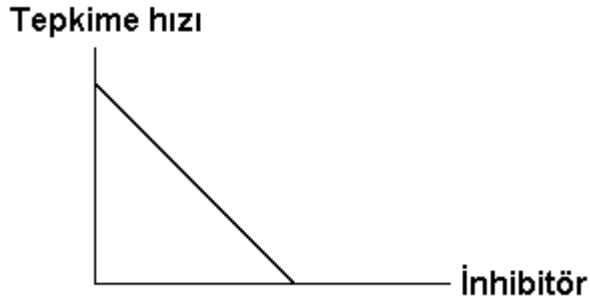
Enzim çalışmasını hızlandıran maddelere aktivatör adı verilir. Bileşik enzimlerde vitamin ve mineraller aktivatör olarak görev yapıp apoenzim kısmına bağlanırlar. Ortamdaki aktivatör miktarının artması enzimin çalışmasını hızlandırır (21).



Şekil 1.5 Aktivatörün Reaksiyon Hızına Etkisi (21)

1.1.3.10. İnhibitör

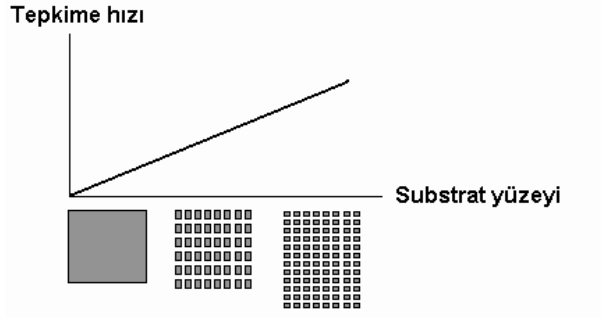
Enzimin çalışmasını yavaşlatan veya engelleyen maddelere inhibitör adı verilir. İnhibitörler enzimin substrata ilgisini azaltıp, enzimin çalışmasını engeller. Siyanür, arsenik, kurşun ve civa gibi maddeler enzimler için inhibitör etki yapar. Ortamdaki inhibitör miktarı artarsa, reaksiyon durur (21).



Şekil 1.6 İnhibitörün Reaksiyon Hızına Etkisi (21)

1.1.3.11. Substrat Yüzeyi

Besinlerin mekanik olarak sindirilmesi substrat yüzeyini artırır. Substrat yüzeyinin artması reaksiyonu hızlandırır (21).



Şekil 1.7 Substrat Yüzeyinin Reaksiyon Hızına Etkisi (21)

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 muazzam fırsatlar sağlamaktadır (22).

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 (23).

Günümüzde enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda prosesi, ziraat, tekstil, deri sektörü, birçok endüstriyel malzemenin üretimi ve işlenmesi, çeşitli toksik maddelerin muamelesi gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (12,24).

Enzimler bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Fakat endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimler daha fazla kullanılmaktadır (23). Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi pazar faktörleri tarafından da etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim nispeten 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 uyarlanmaktadır (25). Günümüzde azalan

doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görünmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (26).

1960'lara kadar toplam enzim satışı her yıl sadece birkaç milyon dolarken; biyokimyasal üretim, fermentasyon prosesleri, iyileştirme metotları ve enzim sayısının artmasıyla enzim piyasasında önemli gelişimler söz konusudur. Dünyada enzim üretimi, 12 büyük ve 400 küçük firma tarafından sağlanmaktadır (3). Endüstriyel öneme sahip mikrobiyal enzimler dünyada Genencor International, Amano Pharmaceuticals, Biocatalysts, Novo Nordisk vs (8) gibi çeşitli firmalar tarafından üretilmektedir. Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı 1.4 milyar dolarken yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve %4-5 dolayında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından. Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin %75'i gıda ve deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadır. Endüstri alanında proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır. Bu alanda her gün yeni potansiyel kaynaklar araştırılmakta ve gündeme gelmektedir (26).

Tablo 1.2 Endüstride Kullanılan Bazı Enzimler (27)

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 kontrolü	Oksidazlar
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, bitkisel kaynaklardan, hayvansal dokulardan ve mikroorganizmalardan 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 (28).

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 (29).

Tablo 1.3 Lipazların Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması (30)

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 Sınıflandırılması

Lipazlar substratlara karşı spesifliklerine göre üç ayrı grupta incelenir (31-33).

1. Spesifik Olmayan Lipazlar
2. 1,3-Spesifik Lipazlar
3. Yağ Asidi Spesifik Lipazlar

1.2.2.1. Spesifik Olmayan Lipazlar

Bu grupta yer alan enzimler, trigiseridlerin tüm pozisyonlarındaki açıl gruplarını koparabilmektedir. Reaksiyonda ara ürün olarak diaçil ve mono açil gliseridler oluşur. *Candida cylindraceae*, *Corynebacterium acnes*, *Taphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girer (30, 31).

1.2.2.2. 1,3-Spesifik Lipazlar

Bu gruptaki lipazlar, trigliseridlerde eşdeğer durumdaki (1) ve (3) pozisyonlarını spesifik olarak hidrolizler. Reaksiyon sonunda yağ asidine ek olarak mono (2-monoaçil) ve digliseridler (1,2-diaçil ve 2,3-diaçil) oluşur. Kimyasal açıdan kararsız

olan bu yapılar diaçil gliseridlere veya (1) ve (3) monoaçil gliseridlere izomerleşerek enzimler tarafından tekrar hidrolizlenebilir konuma dönüşürler. Sonuç olarak (1) ve (3) spesifik lipazlar, spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseridleri gliserin ve serbest yağ asitlerine parçalar (34).

Örneğin; *Pankreas Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen (6) ve *Penicillium cyclopium* A ve B, *Geotrichum candidum*, *Huicola lonigihosa*, *Candida cylindracea*, *Storhylococcus aureus*, *Propioni bacterium acnes*, *Caryne bacterium acnes*, *Choromobacterium viscosum* lipazlar 1,3-spesifiktir (33).

1.2.2.3. Yağ Asidi Spesifik Lipazlar

Bu gruptaki lipazlar, açilgliserinlerdeki bazı yağ asitlerine spesifik olup bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalar. 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 (6). Örneğin, *Geotrichum candidum* tarafından üretilmiş lipazın uzun zincirli bir yağ asidinin özel bir tipinin esterlerinin hidrolizi için birçok özelliğe sahip olduğu bildirilirken (5), grubun üyelerinden *Aspergillus niger* lipazı, maleik asit, süksinik asit, ve aromatik asitlerden benzoik asit, fenil asetik asit gibi asitlerle, gliseridlerin sentezinde başarıyla kullanılmıştır. *Aspergillus niger* ile *Rhizopus delemar* lipazı, değişik yağ asitleri ve bazen dikarboksilik asitlerin oleil alkol esterlerinin sentez reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılmışlardır (33). Ayrıca soya fasulyesinden yağ asidi etil esterlerinin sentez reaksiyonlarında Novozym 435 lipaz enzimi kullanılmıştır (7,34).

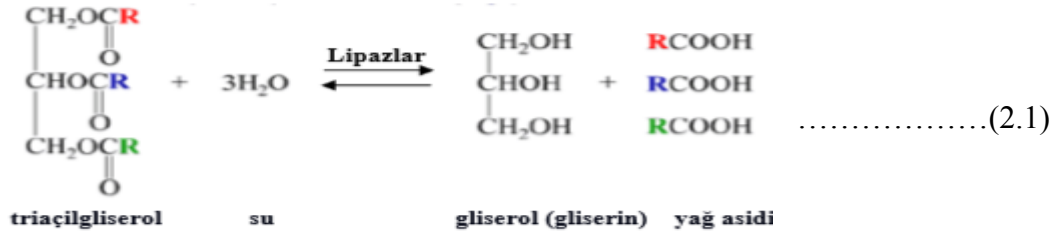
1.2.3. Lipazların Enzimatik Etkisi

Lipazlar (trigliserol açilhidrolazlar; EC 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 (7).

Lipazlar, sulu ortamda yağların hidrolizini katalizleyerek, diaçilgliserin, monoaçilgliserin, gliserin ve serbest yağ asitlerini oluşturur. Gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar çoğunlukla tersinir özellik gösterir (30,35).

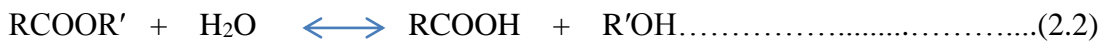
Triaçilgliserollerden gliserin ve serbest yağ asitlerinin oluşumu aşağıda belirtilmektedir.



Lipazların doğal substratları olan uzun zincirli yağ asitlerinin gliserin esterleri suda çözünürlükleri çok azdır. Lipazlar, enzimin çözündüğü sulu faz ve su ile karışmayan substrat fazı arasındaki arayüzeyde ester bağlarının hidrolizini katalizler. Lipazların suda çözünen esterlere karşı aktiviteleri oldukça düşüktür (30).

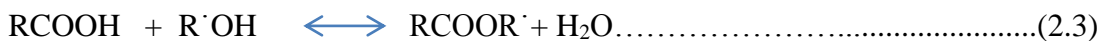
Lipaz katalizli reaksiyonlar iki temel kategoride incelenebilir (36):

1.Hidroliz



2. Sentez

a) Esterifikasyon



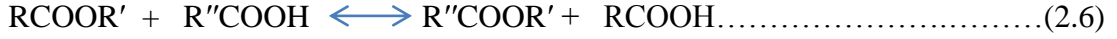
b) İnteresterifikasyon



c) Alkoliziz



d) Asidoliziz



Eşitlik (2.4) - (2.6) çoğunlukla transesterifikasyon terimi altında toplanır. Reaksiyon ortamında suyun az olduğu durumlarda interesterifikasyon ana reaksiyondur (30, 37).

Belirli koşullar altında lipazlar, transesterifikasyon reaksiyonlarının bir numaralı katalizörleridir (38).

Lipazların substrat spesiflikleri, analitik ve endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Substrat spesifliği, enzimin moleküler özellikleri ve substratın yapısına bağlı olup, enzimin substrata bağlanmasına etki eden faktörler tarafından kontrol edilir. Lipazlar substrata spesifliklerine göre üç ayrı grupta incelenir (30, 31).

1.2.4. Lipazların Katalizör Olarak Kullanımı

Lipazların biyolojik fonksiyonu, esterlerin özellikle triaçilgliserollerin serbest yağ asitleri 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 (39). Hidroliz (ileri reaksiyon) ve sentez (tersinir) reaksiyonları arasındaki denge, reaksiyon karışımının su aktivitesi ile kontrol edilir (40). 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.

1.2.4.1.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 (41). Su oranının fazla olduğu sulu ortamlarda meydana gelir ve ester hidrolizi baskın olan reaksiyondur (36). Bu teknoloji çoğunlukla yağ asitleri, digliserid, monogliserid, süt ürünleri tatlandırıcısı, ev ve işyerleri için deterjanların üretiminde kullanılmaktadır (41).

1.2.4.2. 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 (3).

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 yapılabilmektedir. Enzim teknolojisiyle beraber; normal şartların avantajlarını, ve yüksek 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 metanolden geranil ve metil esterlerin üretimi verilebilir (41).

1.2.4.3. Transesterifikasyon

Transesterifikasyon; bir ester yapısıyla bir asitin (asidoliz), bir esterle başka bir ester (interesterifikasyon) ya da bir esterle bir alkolün (alkoliz) açıl radikallerinin değişmesi anlamına gelmektedir (41). Diğer bir ifadeyle transesterifikasyon; bir ester asit kısmının 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 alkolse alkoliz; açıl alan grup bir amin grubu ise de aminoliz reaksiyonu oluşmaktadır (42).

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 (41).

1.2.4.4. Doğal Olmayan Substratların Katalizi

Lipazların etkinliğı karboksilik asit esterlerinin hidroliz ve sentez reaksiyonlarını katalize etmekle sınırlı değildir. Nükleofiller olarak su ve alkollerden başka diğer bileşikler 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 (41).

1.2.5. Lipaz Enziminin Endüstriyel Uygulamaları

Lipazlar çeşitli uygulamaları olan önemli biyokatalizörlerdir. Lipazlar endüstriyel enzim pazarının sadece % 5 ini oluşturmaktadır. Biyoteknolojide önemi de gün geçtikçe artmaktadır (39). Endüstriyel alanlarda kullanılan lipazların çoğı mikrobiyal kaynaklı olmasına rağmen, bitkisel kaynaklı lipazlarda endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (43).

Endüstriyel lipazların çoğı mikrobiyal kaynaklıdır ve genellikle küf mantarları ve bakterilerden elde edilmektedir. Doğal kaynaklardan ekstraksiyonla elde edilen lipazlar daha az araştırılmış bir alandır (3,44).

Lipazların endüstrideki uygulama alanları, reaksiyonlardaki rolü, ürün ve uygulamaları Tablo 1.4’de belirtilmiştir.

Tablo 1.4 Lipazların Endüstriyel Kullanımına Örnekler (3)

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, Emülsiyolaştırıcılar.
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 açil 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

1.2.5.1. Yağ ve Oleokimya Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Mucor miehei (IM 20) ve *Candida antartika* (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 (9).

Oleokimyasal işlemlerde lipazlar, alkoliz, hidroliz ve gliseroliz esnasında termal dereceyi minimuma indirmek ve enerjiyi korumak için kullanılır (9,45,46). 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 (9).

1.2.5.2. Biyolojik Olarak Bozunabilir Polimerlerin Üretiminde Lipazların Kullanımı

Lipaz enzimleri organik sentezlerde kullanılan en önemli enzim gruplarından biridir. Lipazların bu alanda yararı doğada kolay bozunabilen bileşikler üretmektedir.

Lipazlar ester sentezlerini katalizleyebilir ve organik çözücü sistemlerinde transesterifikasyon reaksiyonları ile biyobozunur poliesterlerin enzim katalizli üretim olanağını sağlar. Aromatik poliesterler lipaz biyokatalizi ile sentezlenebilirler.

Örneğin; 1-Butil oleat, kış aylarında kullanılan biyodizelin viskozitesini azaltmak için bütanol ve oleik asitin doğrudan esterifikasyonu ile üretilmektedir (9).

1.2.5.3. 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 (9).

1.2.5.4. Deterjan Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

Hidrolitik lipazlar 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 (9).

Lipazların deterjan üretiminde kullanılması aşağıda belirtilen özellikler açısından avantaj oluşturur (9,10,47).

- 1- Düşük yıkama sıcaklıklarında deterjanların kullanımına imkan vererek enerji tasarrufu sağladığından deterjanların çevresel yükünü azaltmaktadır.
- 2- Genellikle deterjanlarda daha az olması istenilen kimyasalların azaltılmasına imkan sağlamaktadır.

- 3- Biyolojik olarak parçalanabilir ve zararlı kalıntı bırakmaz. Ayrıca kanalizasyon arıtma tesislerinde olumsuz etkisi yoktur ve sucul yaşam üzerinde herhangi bir riski mevcut değildir.
- 4- Yüksek pH (10-11) ve yüksek sıcaklıklara (30-60°C) dirençlidirler.
- 5- 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 (48).

Deterjanlarda kullanılmak üzere ticari olarak üretilen bakteri kaynaklı *Aspergillus oryzae*, *Acinetobacter radioresistens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes* ve *Chromobacterium* lipazlarıdır (9).

1.2.5.5. Gıda Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

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 (7,9,49). Bu işlemlerden sonra uygun hale getirilmiş bitkisel yağlar, gelecekte piyasada büyük bir potansiyele sahip olacaktır (9).

Lipazlar, tat ve güzel koku bileşikleri olarak bilinen kısa zincirli yağ asitleri ve alkollerin esterlerinin sentezi ile lezzeti geliştirmek için gıdalara eklenerek kullanılmaktadır (9).

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 (9,50). Özellikle mikrobiyal kaynaklı lipazların, ringa balığı yağı, tonbalığı yağı ve hodan yağı gibi yağlardan çoklu yağ asitleri elde etmek için kullanılmaktadırlar (51,52).

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 palmiye yağındaki palmitik asidin stearik asitle yer değiştirmesi, immobilize edilmiş *Rhizomucor miehei* lipazı ile transesterifikasyon reaksiyonu sayesinde gerçekleşmektedir (3,53).

Tereyağın lipaz katalizörlü interesterifikasyon reaksiyonu ile uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin yerine doymamış yağ asitlerinin geçmesi de sağlanmaktadır (3).

Lipazlar, içkilere katkı maddesi, peynir mayalamada lezzet artırıcı ayrıca et ve balık ürünlerinden yağların uzaklaştırılmasında yardımcı olarak kullanılmaktadır (48,50).

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 (9).

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 (9,54).

1.2.5.6. Rasemik Karışımların Ayırıştırılmasında Lipazların Kullanımı

Lipazlar, birbirleriyle karışmayan tek fazlı çeşitli rasemik organik asit karışımlarının ayırıştırılmasında kullanılmaktadır (32). Ayrıca tıbbi ilaçlar, zirai ilaçlar ve pestisitlerin kiral yapı bloklarının sentezi için kullanılmaktadır (9).

Farklı orijinlerden türeyen bazı lipazlar, polar olmayan organik çözücülerde oldukça kararlıdır (35). Bu sebeple stereospesifik hidroliz yoluyla rasemik karışımların ayırıştırılması gibi suda çözünmeyen esterlerin hidrolizinde kullanılabilirler (9).

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 (9).

1.2.5.7. 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 (45).

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 (9).

1.2.5.8. 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 (9).

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 (53).

1.2.5.9. 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 (9).

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 (55).

1.2.5.10. Biyosensör (Biyolojik) Olarak Lipazların Kullanımı

Biyosensörler (biyolojik), bünyesinde biyolojik bir duyarlı 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 (56,57).

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 (9).

1.2.5.11. Deri Temizlemede (Yağ Gidermede) Lipazların Kullanımı

Lipazlar, yağ uzaklaştırılmasında çevresel olarak daha güvenilirdir. Deri işleme sürecinde; 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 (9,45). Lipaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimleri içeren enzim karışımları, deri işleme sürecinde 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 büyüyen ve enzimleri deri işlenmesinde kullanılmak üzere elverişli olan birçok *Bacillus* türü bulunmuştur. Alkali lipazlar; alkali/nötr proteazlar ve sürfaktan içeren bir karışım içinde kullanılabilirler (45). Alışılmış 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 görünümüdür. Lipazlar ayrıca hidrofobik su geçirmez deri üretimini sağlamada kullanılırlar. Ayrıca araçlar için döşemelik deri kalitelendirmesi içinde kullanılabilirler (9).

1.2.5.12. Çevre Yönetiminde Lipazların Kullanımı

Atıkların yok edilmesi için yapılan biyoremediasyon (Toksifikasyonu önlemek ve çevresel kirleticileri parçalamak için mikroorganizmaların kullanımı esasına dayanan biyoremediasyon) çevre kirliliğinin bertarafında ve önlenmesinde etkili bir biyoteknolojik yaklaşım olarak önem kazanmaktadır (45,58). Çeşitli kaynaklardan elde edilen lipazlar kullanılarak, yağlı atıklar ve kalıntılar temizlenebilmektedir (45).

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 (9,45).

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 selülaz içeren endüstriyel bir karışım, toplam askıda katı madde'de %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 (9,45).

1.2.5.13. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Lipazların Kullanımı

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 (9). Tarihsel olarak enzimlerin kağıt endüstrisinde bazı kullanım alanları mevcuttur. Kağıt endüstrisinde enzim kullanımının tarihsel gelişimi Tablo 1.5’te gösterilmektedir (59).

Tablo 1.5 Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımının Tarihsel Gelişimi (59)

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 (9,60); 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 (9). 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 (61).

1.2.5.14. 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 (9,62,63).

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 (9,64).

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 (65).

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 (9).

1.2.6. Lipazların Çeşitli Kaynaklardan Saflaştırılması

Lipazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur (25,66-68). Ticari olarak kullanımı yaygın olan hayvansal kaynaklı (genellikle sığır ve domuz) lipazlardır. Bu lipazlar üzerinde en çok araştırma yapılan enzimdir (69,70). 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 (71).

Lipazların farklı hayvan dokularında dağılmış olan enzimlerdir (10). Yapılan çalışmalarda lipaz sıçanın kas dokusundan, kalbinden, karaciğerinden (72-74); balık karaciğerinden, morina balığı pankreasından (75,76); at, hindi, sığır, keçi, deve ve tavuk pankreasından (77,78); sığır aortu ve sütünden (74,79,80) farklı yöntemlerle saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiştir.

İnsan dokularında bulunan lipazlar Tablo 1.6'da kısaca özelliklerine değinilerek gösterilmiştir.

Tablo 1.6 İnsanlarda Bulunan Lipazlar (81)

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 lipazlar, tarafından taşınan trigiseridleri hidroliz ederek 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 bebelerde bulunur.	-
Endotel Lipaz	LIPG	Endotel	-	-
Panreatik Lipaz İlişkili Protein 2	PNLIPRP2 veya PLRP2	Sindirim Sıvısı	-	-
Panreatik Lipaz İlişkili Protein 1	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 (81). Ayrıca İnsan sütlerinden lipoprotein lipazı, eritrositlerinden membrana bağlı monoaçilgliserol lipazı ve karaciğerinden ise lipoprotein lipazı saflaştırılmıştır (82-84).

Lipazın mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmakta olup, bu çalışmalarda kullanılan saflaştırma yöntemleri farklılıklar göstermektedir. Ticari lipazlar genelde mikrobiyal kaynaklıdır. Lipaz üreten mikroorganizmalar bakteriler, funguslar ve mayalardır (31).

Tablo 1.7 Bakteriyel Lipaz Kaynakları (3,85,86)

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>
Bakteri	Staphylococcus	<i>Staphylococcus canosu</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Staphylococcus hyicus</i>
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>
		<i>Staphylococcus warneri</i>
	Aeromona	<i>Aeromona hydrophila</i>
		<i>Aeromona sorbia LP004</i>
	Acinetobacter	<i>Acinetobacter pseudoalcaligenes</i>
		<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	Choromobacterium	<i>Choromobacterium viscosum</i>
	Pseudomonas sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Pseudomonas fragi</i>
		<i>Pseudomonas mendocina</i>
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Burkholderia sp.	<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 sp	<i>Lactobacillus delbruckii</i>	

Tablo 1.8 Fungal Lipaz Kaynakları (3,85,86)

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 sp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Candida sp.	-
	Torulopsis sp.	<i>Torulopsis ernobi</i>
	Rhodotorula sp.	<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 (87). Mikrobiyal lipazlar büyük miktarlarda üretilebildiklerinden endüstriyel açıdan hayvansal ve bitkisel lipazlardan daha önemlidirler (88).

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 (3). Tablo 1.9’da Novo Nordisk firmasının farklı alanlarda kullanılan ürünleri gösterilmiştir (89).

Tablo 1.9 Novo Nordisk Firmasının Farklı Alanlarda Kullanılan Ürünleri (89)

ÜRÜN ADI	KULLANIM ALANI
Lipopan®	Maya Endüstrisi
Lipozyme®	Yağ Ürünleri
Novozym® 27007	Nişasta Ürünleri
Palatase™	Süt Ürünleri
Clear-Lens™ LİPO	Kişisel Bakım
Greasex	Deri Sanayii
Lipolase™	Deterjan Endüstrisi

LipoPrime®	Deterjan Endüstrisi
NovaCor™ AD	Deri Endüstrisi
Novozym® 735	Tekstil Endüstrisi
Novozym® 871	Hayvan Yemi

Tablo 1.10 Endüstriyel Olarak Önemli Lipaz Üreten Firmalar (90)

Lipaz Üreticisi	Firma
<i>Achromobacter</i> sp.	Meito Sangyo
<i>Alcaligenes</i> sp.	Meito
<i>Arthrobacter</i> sp.	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</i> sp.	Amano
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
<i>Rhizopus</i> sp.	Serve, Negase
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Precibio (France), Boehringer-Mannheim, Rapidase, Gits-Brocades
<i>Rhizopus delemar</i>	Chemical 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 (10,11,71). Bitkilerde lipazlar enerji depolayan dokularda bulunmaktadır (3,91). Oda sıcaklığında aktivitesinin yüksek

olması, temininin kolay ve ucuz olması nedeniyle endüstri alanlarında bitkisel kaynaklı lipazlar da kullanılır (92).

Bitkilerin farklı kaynaklarından lipaz izolasyonu çalışmaları da aşağıda toplanmıştır. Bir grup bilim adamı buğdayda lipaz çalışması olarak başlangıç yapmıştır (93). Buğday ve buğday kepeğinde lipolitik aktivite ve lipaz aktivitesi çalışılmıştır (94). Buğdayda aktif grupları belirleme çalışmasında esteraz ile lipaza yer verilmiştir (95). Badem tohumu (96,97), fındık tohumu (98,99), pirinçteki lipolitik aktivitenin çoğunluğu pirinç kepeğinde bulunur. Isıya karşı kararlı bir lipaz pirinçte tanımlanır (43,100). Kayısı tohumu (10), Ayçiçeği (101,102), yer fıstığı depo dokusunda (103), Amerikan fıstığı tohumu (104), çörek otu (105,106), yulaf tohumu (107,108), mısır tohumu (109,110), arpa tohumu (111), çimlenmiş susam (112), sorgum (113,114), defne (115), Fransız fıstığı (116), Hindistan cevizi (117), keten tohumu (118), acıbakla (119) gibi bitkilerden lipaz eldesiyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca ağaçların değişik türlerinden de lipaz elde edilmiştir. Bu yönde Teksas'tan Kuzey Kalifornia'ya kadar uzanan kıyı şeridinde yetişen *Sapium sebiferum* L.'den (Çin don yağı ağacı) lipaz elde edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır (38).

1.3. KESTANE BİTKİSİ VE ÖZELLİKLERİ

Kayingiller familyasında yer alan kestaneler (*Castanea*), uzun ömürlü bir ağaç olup 30-35 metre boyuna ulaşabilen, kuvvetli bir gövdeye sahip olan bir ağaçtır. Kestanenin bilimsel olarak botanik sistematüğinde Fagales Takımına ait olan bitki, Fagaceae Familyasının, *Castanea* Cinsi ve *Castanea* spp türü olarak yerini alır. Anadolu kestanelerinin de içinde bulunduğu *Castanea Sativa* Mill. türü Akdeniz havzasının yerli türüdür. Kestanenin anavatanlarından biri olan Anadolu'da çok eski zamanlardan beri Karadeniz, Marmara ve Ege Bölgeleri gibi nemli orman alanlarında *Castanea Sativa* Mill türü kestane doğal olarak yetişmektedir (120).

1.3.1. Kökeni ve Yayılışı

Orman ağacı olarak kestane Güney Avrupa kökenli olup daha çok İtalya'da Alplerin eteğinde yetiştirilir. Bundan başka Fransa, İspanya, Yugoslavya ve Yunanistan'da üretimi yapılmaktadır (121). Ülkemize ait olan kestane köken olarak Güney Avrupa ve Asya olan 20-35 m boyda ve 2 m çap yapabilen bir türdür (122). Karadeniz, Marmara ve Ege sahil kesimlerindeki orman alanlarında kendiliğinden yetişmektedir. Doğal yayılış alanı içinde kış soğuklarından genellikle etkilenmemektedir. İlkbahar ve sonbahar donlarına karşı duyarlıdır. Yıllık yağış miktarı 600-1600 mm olan bölgelerde yetişir (121).

Kestanenin bilinen 13 türü kuzey yarımkürenin ılıman iklim kuşağına yayılmış durumdadır (123). Tablo 1.11 kestane türlerinin dünyadaki yayılışı gösterilmiştir.

Tablo 1.11 Kestane Türlerinin Dünyadaki Yayılışı (122).

Kestane Türleri	
Japon kestanesi	<i>Castanea crenata</i>
Amerika kestanesi	<i>Castanea dentata</i>
Çalı kestanesi	<i>Castanea alnifolia</i>
Henry kestanesi	<i>Castanea henryi</i>
Ozark kestanesi	<i>Castanea ozarkensis</i>
Çin kestanesi	<i>Castanea mollissima</i>
Doğu kestanesi	<i>Castanea pumila</i>
Seguin kestanesi	<i>Castanea seguinii</i>
Anadolu kestanesi	<i>Castanea sativa</i>

1.3.2. Dünyada ve Türkiye'de Kestane Üretimi

Kestane meyveleri dikenli ve sert kabuklar içinde gelişir. Meyvelerin olgunlaşma ve hasat zamanı Eylül-Ekim aylarıdır. Kestane yaprakları Mayıs ayından Ekim ayına kadar toplanarak kurutulur ve kaldırılır. Meyveleri Eylül ve Ekim aylarında çatlayarak içindeki tohumları (kestaneleri) kendiliğinden yere dökülür. Toplanan kestaneler kurutularak ve nemsiz bir yerde muhafaza altına alınırlar (124).

Kestaneler; yaprak şekillerine, yaprak üstünde ve ince dallarındaki tüylenmelere ve meyve özelliklerine göre gruplama yapılmıştır. Buna göre üç grup oluşturulmuş ve botanikçi bilim adamlarına göre 11, bazılarının göre ise 16 tür tanımlanmıştır (120).

Tablo 1.12 Kestane Türlerinin Seksiyonlarına Göre Ayırımı, Latince ve Genel Adları ile Doğal Yetiştirme Alanları (120)

Seksiyonu ve Latince Adı	Genel Adı	Doğal Yetiştirme Alanı
Gerçek Kestane (Castanea) Seksiyonu		
<i>Castanea molissima</i> Bl.	Çin kestanesi	Çin Halk Cumhuriyeti
<i>Castanea crenata</i> Sieb. & Zucc.	Japon kestanesi	Japonya, Kore yarımadası
<i>Castanea sativa</i> Mill	Avrupa kestanesi	Türkiye, Güney Avrupa
<i>Castanea dentata</i> Borkh	Amerikan kestanesi	ABD'nin doğu bölgeleri
<i>Castanea seguinii</i> Dode	Seguin kestanesi	Çin Halk Cumhuriyeti
<i>Castanea davidii</i> Dode		Çin Halk Cumhuriyeti
Balanocastanon Seksiyonu (Chinkapin'ler)		
<i>Castanea pumila</i> Mill.	Alleghany chinkapin	ABD'nin Güneydoğusu
<i>Castanea ozarkensis</i> Ashe		Arkansas ve Missouri
<i>Castanea ashei</i> Sudw.	Ashei chinkapin	Kuzey Karolina ve Florida
<i>Castanea alnifolia</i> Nutt.		Georgia ve Florida
<i>Castanea floridana</i> Ashe	Florida chinkapin	Texas, Georgia ve Florida
<i>Castaneapaucispina</i> Ashe		ABD'nin Güneydoğusu
Hypocastanon Seksiyonu		
<i>Castanea henryi</i> Rehd Wils.	Henryichinkapin	Çin Halk Cumhuriyeti

Tablo 1.13 Kestane Grupları ve Türleri (125)

Grubu	Yapraklarındaki Tüylenme Özelliği	Kupula İçindeki Meyve Sayısı	Gruptaki Türler
I. Grup	Tüysüz veya yaprak altı damarlarında çok az tüy var	1-5 Adet	<i>C. dentata</i> <i>C. sequinii</i>

			<i>C. henryi</i>
II. Grup	Yapraklarının alt kenarları tüylü	1-3 Adet	<i>C. sativa</i> <i>C. mollissima</i> <i>C. crenata</i>
III. Grup	Yapraklar yoğun şekilde tüylü	1 Adet	<i>C. ashei</i> <i>C. alnifolia</i> <i>C. florida</i> <i>C. pumila var.</i> <i>C. pumila var.</i> <i>ozarkensis</i>

Tablo 1.14 Dünya Kestane Üretimi (120)

Ülkeler	2000	2001	2002	2003
Çin Halk Cum.	598.185 ton	599.077 ton	599.077 ton	599.077 ton
Bolivya	34.400 ton	34.500 ton	34.500 ton	34.500 ton
İtalya	50.000 ton	50.000 ton	50.000 ton	50.000 ton
Japonya	26.700 ton	29.000 ton	30.100 ton	30.100 ton
Güney Kore	92.844 ton	94.130 ton	72.405 ton	72.405 ton
Portekiz	33.317 ton	26.118 ton	31.385 ton	28.000 ton
İspanya	10.000 ton	10.000 ton	10.000 ton	10.000 ton
Rusya Federasyonu	16.000 ton	16.000 ton	16.000 ton	17.000 ton
Fransa	13.224 ton	13.032 ton	14.075 ton	14.000 ton
Türkiye	50.000 ton	47.000 ton	50.000 ton	50.000 ton
Diğer Ülkeler	26.902 ton	26.949 ton	26.135 ton	17.453 ton
Toplam	951.572 ton	945.806 ton	933.677 ton	922.535 ton

Ülkemizin iklim ve toprak özellikleri kestane yetiştiriciliği için uygundur. Üretimde ülke geneline yayılma söz konusudur. Ege bölgemizde yetiştiriciliği önemli bir düzeye ulaşmıştır. Ancak bu duruma rağmen ülkemizde yaygın “kapama

kestane bahçeleri” bulunmamaktadır. Doğu Karadeniz’de üretim ormanlık alanda gürgen, kızılâğaç vb. ağaçlarla karışık olarak kestane ağaç toplulukları bulunur. Batı Karadenize doğru küçük gruplar halinde yüksek miktarda kestaneliklere rastlanılmaktadır.

Bölgeler göz önüne alındığında Ege ve Karadeniz Bölgelerinin toplam kestane üretimdeki payı %90’ın üzerindedir. İllere göre üretimde ise sırası ile Aydın, Kastamonu, İzmir ve Sinop ön plana çıkmaktadır.

Karadeniz kıyı şeridinde yetişen küçük meyveli kestane “kuzu kestane” olarak bilinmektedir. Bu karadeniz kıyı şeritte yer alan kestanelerin 2000 yılı verilerine göre Türkiye’deki toplam üretim oranı %24 olarak belirlenmiştir. Marmara Bölgesinde hastalıkların hızla yayılması sonucu kestane ağaçları zarar görmüş ve verim kaybı yüksek seviyelerdedir (120).

Türkiye, kestane üretiminde dünyanın önde gelen ülkelerindedir. Tablo 1.14 göz önüne alındığında üretimimizde son yıllarda genel bir azalış eğilimi söz konusudur. Üretimin hızla azalmasına nedeni aşağıdaki Tablo 1.15’te belirtilen hastalıklar ve zararlılardır. Ancak son yıllarda üretim artırıcı yönde yapılan çalışmalar yapılmıştır. Gelecekte kestane üretimimizin önemli ölçüde üretim artışları gözlenecektir (125).

Tablo 1.15 Kestane Hastalıkları ve Zararlıları (125)

<u>Hastalıklar</u>	<u>Etkili olduğu kısım</u>
Mürekkep hastalığı (Phytophthora cambivora)	Kök boğazı ve köklerde
Dal kanseri (Endothia parasitica)	Gövde ve dallarda
<u>Zararlılar</u>	
Kestane iç kurdu (Laspeyresia splendana)	Meyveler
Kestane kirpi güvesi (Pammene fasciana)	Yumak ve meyveler
Kestane kurdu (Balaninus elephas)	Meyveler

Türkiye’nin 2013 verilerine göre toplam kestane üretimi 60.019 tondur. Bunun yanında Aydın İlinde üretilen kestane miktarı da 21.406 tondur (126).

Kestane çeşidinde aşağıda sıralanan özelliklerin olması istenir. Erkencilik, yüksek verim, iri ve lezzetli meyve, kabuğun ince olması ve kolay soyulması, uzun süre depolanabilmesi, şekerlemede dağılmaması, kestane hamuruna uygunluk ve hastalık ve zararlılara dayanıklılık olmalıdır (125). Kestane yetiştiriciliğinde seçilecek çeşitlerde birbirini dölleyen verimli, meyvesi iri, meyve iç zarının tohuma yapışıklılık durumu, kolay hasat edilebilmesi ve hamur yapımına uygun olması gibi özellikler dikkate alınarak çeşit seçimi yapılır.

Bu amaçla yetiştirilen önemli kestane çeşitleri;

- **Erkenci çeşitler:** Karamehmet (62304), Hacıbiş (62305), Firdola (62309).
- **Hamur yapımına uygun çeşitler:** Mahmutmolla (51112), Hacıömer (52214).
- **İri çeşitler:** Sarı aşılama (51111), Osmanoğlu (51101), Ayı tabanı (52112).

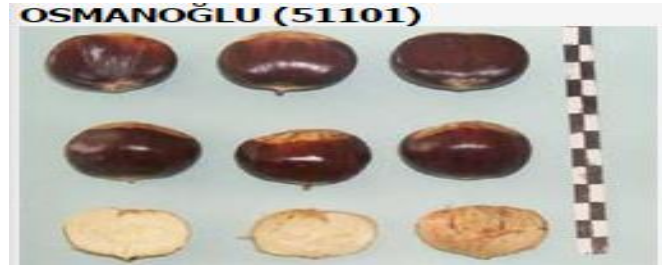
Hacıbiş (62305): Ağacı orta kuvvette yayvan gelişir. Verimi orta düzeydedir. Meyveleri genellikle çok küçük genişçe ovaldir. Meyve kabuğu kalın, meyve eti krem renginde ve kalitesi iyidir. Eylül ayının 3. haftasında olgunlaşır. Tozlayıcıları; Karamehmet ve Firdola'dır. Sofralık tüketime uygun bir çeşittir (125).

Resim 1.1 Hacıbiş Kestanesi (127)



Osmanoğlu (51101): Ağacı orta kuvvette yayvan gelişir. Verimli bir çeşittir. Meyveleri küçük-orta, iri genişçe oval şekilli, meyve eti kerem rengindedir. Eylül ayının 3. haftası olgunlaşır. Tozlayıcıları; Karamehmet; Firdola ve Sarıaşlamadır. Kestane şekerine uygun bir çeşittir (125).

Resim 1.2 Osmanoğlu Kestanesi (127)



Sarıaşlama (51111): Ağacı orta kuvvette yarı dik gelişir. Verimli çeşittir. Meyveleri orta iri-iri, genişçe oval, meyve kabuğu ince kahverengi meyve eti krem renginde, kaliteli bir çeşittir. Sofralık tüketime ve kestane hamuru yapımına uygun bir çeşittir (125).

Resim 1.3 Sarıaşlama Kestanesi (127)



Mahmutmolla (51112): Ağaçları orta kuvvette dik gelişir. Verimli bir çeşittir. Meyveler orta iriliktedir. Taze iken zor soyulur. Eylül ayının son haftasında hasat edilir. Tozlayıcısı 51111'dir. Hamur yapımına uygun bir çeşittir (125).

Hacıömer (52214): Ağaçları orta kuvvette ve yayvan gelişir. Meyveleri orta iriliktedir. Verimli bir çeşittir. Eylül ayının 3. haftası hasat edilir. Tozlayıcısı 52510'dur. Taze tüketime ve hamur yapımına uygun bir çeşittir. Kestanenin pomolojik sınıflandırmasına baktığımızda ise iki grup karşımıza çıkar (125).

Resim 1.4 Hacı Ömer Kestanesi (127)



Marrone: En yüksek kaliteli meyvelerdir. Tohum zarı meyveyi bölmez ve tohumun içerisine girmez. Daha iri meyvelidir (125).

Chataigne: Tohum zarı meyveyi böler ve tohumun içerisine girer. Daha küçük meyvelidir (125).

Bizim ülkemizde çok kullanılmamakla birlikte yurt dışında yetiştirilen ve önemli yer oluşturan yabancı kestane çeşitleri bulunmaktadır. Bunlar; İtalya: Chiusa, Pesio, Luserna, Val susa, Castel del rio, Fransa: Montagne, Sardonne, Comballe, Bouche de bétizac, Bournette, Maridonne, Maraval, Marigoule, Marsol, İspanya: Amarelante 1, Famosa, Garrida, Inxerta, Longal, Loura, Japonya: Ishizuki, Tsukuba, Tanzawa, Ginyosedir (125).

1.3.3. Endüstriyel Önemi

Ülkemizde kestane, genel olarak kestane şekeri ve az miktarda kestane püresi ve bal olarak değerlendirilmektedir. Sektör ihracata yönelik üretim yapmaktadır. Kestane sektörünün de en önemli sorunu gıda kodeksi bulunmayan ve sağlıklı koşullarda üretim yapan firmalardır (120).

Kestane, doğada tamamen doğal şartlar altında yetiştirilen, tarımsal ilaç, suni gübre kullanılmayan organik tarım ürünüdür. İçerdiği besin öğelerine ilaveten organik tarım ürünü olması nedeniyle kestane, beslenme diyetlerinde eskiden beri yer aldığı önemini günümüzde de korumaktadır (122).

Ülkemizde ayrıca kestane balı üretimi de sözkonusudur. Kestane balı yoğun olarak Giresun ilinde üretilmektedir. Bu ilde yılda ortalama 150-200 ton kestane üretimi gerçekleşmektedir. Ancak kestane balı üretimi diğer ballara kıyasla daha düşüktür. Üretimin bu kadar düşük olmasında kestane balının ancak kestane çiçeğinin açtığı 15 Haziran ile 10 Temmuz arası gibi kısa bir sürede gerçekleşmesi ve bu dönemin yağışlı geçmesi durumunda kestane üretiminde yıllara göre farklılıklar olmaktadır (128).

Kerestesi, dayanıklılık ve dekoratif özellikleri bakımından meşe ağacının odununa benzemektedir. Kestane kerestesi kuruma anında çatlaması ve eğilmesi nedeniyle, bu ağaçtan büyük boyutlu kereste yapılmasını engellemektedir. Ancak

dayanıklılığı sebebiyle bazı ahşap bahçe işlerinde bu ağaçtan faydalanılmaktadır. Kestanenin kerestesi İtalya'da fiçı yapımında, düzgün dalları ise zeytin silkmede kullanılmaktadır (122,129).

1.3.3.1. Kestane Tohumu

Çalışmamızda kullanılan kestane (*Castanea Sativa* Mill.) tohumlarının hasadı, Giresun'da ekim-kasım aylarında yapılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan kestane tohumları, 15 Kasım 2013 tarihinde Giresun İline bağlı (Güveç ve Sarvan Köyü) ve Keşap ilçesine bağlı (Kayabaşı, Engüz, Karabedir köylerinden) alınan örnekler toplandı. Kestane tohumlarının teşhisi, Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Zafer TÜRKMEN tarafından yapıldı.

Castanea Sativa Mill. bitkiler aleminin, Magnoliopsida (iki çenekliler) sınıfının, Fagaceae (kayngiller) familyasında yer almakta olup sistematigi şu şekildedir;

Âlem : Plantae (Bitkiler)

Bölüm : Magnoliophyta (Kapalıtohumlular)

Sınıf : Magnoliopsida (İki çenekliler)

Takım : Fagales

Familya : Fagaceae(Kayngiller)

Cins : *Castanea*

Tür : *C. sativa*

Castanea sativa Mill. ve *Castanea vulgaris* Lam. farklı isimler verilen aynı bitkilerdir.

Resim 1.5 Giresun Bölgesinden Toplanan Kestane Ağacı ve Tohumlarına Ait Görseller.



1.3.3.2. Kestane Tohumunun Kimyasal Bileşimi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Karadeniz Bölgesinde (Sinop-Erfelek) yetişen 55 genotipinin doğal bileşimleri ile ilgili analizler yapmıştır. Analiz sonuçları kuru madde üzerinden (g/100 g) olup, Tablo 1.16.'da gösterilmiştir.

Tablo 1.16 Karadeniz Bölgesi Kestane Çeşitlerinin Kimyasal Bileşimleri

	MİNİMUM DEĞER	MAKSİMUM DEĞER	ORTALAMA
Kabuk Kalınlığı (mm)	0.30	0.71	0.51
Protein (N X 5.30)	3.43	8.27	5.683
Yağ	0.66	3.08	1.890
Nişasta	29.88	63.66	47.32
Lif (külsüz)	0.06	0.29	0.129
Kül	1.40	4.92	2.809
Fosfor	47.68	229.68	133.67
Kalsiyum	69.71	201.70	87.863
Magnezyum	59.71	202.89	105.87
Çinko	2.63	21.87	6.970
Demir	1.84	16.99	6.684

Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi ve Tübitak destekli projede “Aydın İlinde yetiştirilen yöresel bazı kestane çeşitlerinin ağaç oluşumu ve depolanma sonrası biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması” adlı bir araştırma projesi yürütmüştür. Bu projede dokuz ayrı çeşit kestane ele alınmış olup, analiz sonuçları kuru madde üzerinden (g/100 g) verilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 1.17’de özetlenmiştir.

Tablo 1.17 Aydın İlinde Yetiştirilen Bazı Kestane Çeşitlerinin Bileşimleri

ANALİZLER		MİNIMUM DEĞER	MAKSİMUM DEĞER	ORTALAMA
Toplam	Dönem 1	35.35	53.69	43.36
Karbonhidrat	Dönem 2	36.65	70.14	48.41
Toplam	Dönem 1	21.55	43.01	30.99
Nişasta	Dönem 2	29.42	61.36	39.77
Toplam Şeker	Dönem 1	7.33	16.95	12.37
	Dönem 2	5.03	11.96	8.64
Protein	Dönem 1	4.55	7.00	5.6
	Dönem 2	3.85	7.35	5.48
Yağ	Dönem 1	1.03	3.00	1.78
	Dönem 2	1.23	3.05	2.08

Akdeniz havzası içinde yer alan İtalya, Fransa, İspanya ve İsviçre gibi ülkelerde yetişen kestane çeşitlerinin bileşimleri ile ilgili analiz sonuçları ise Tablo 1.18’de gösterilmiştir.

Tablo 1.18 Kestane Tohumunun Bileşimi ve Besin Öğeleri (g/100g)

	Taze	Kurutulmuş	Kavrulmuş	Haşlanmış	Un
Yenebilir Kısım %	81	100	82	88	100
Nem %	52.9	10.1	42.4	63.3	11.4
Kalori (kcal)	160	287	200	120	343
Besin Öğeleri					
Karbonhidratlar	34	57.8	39	24.4	63.6

Şekerler	9.6	16.1	10.7	7.5	23.6
Nişasta	24.4	41.7	28.3	16.9	40
Lif	7.3	13.8	8.3	5.4	14.2
Çözünebilir	0.6	1.1	0.7	0.6	1
Çözünmeyen	6.7	12.7	7.6	4.8	13.2
Protein	3.2	6	3.7	2.5	6.1
Yağ	1.8	3.4	2.4	1.3	3.7

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Destile Su Cihazı	: Nüve-NS-108
Etüv	: Binder
pH Metre	: Butech
UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu UV Mini-1240
Terazi	: Ohaus
Hassas Terazi	: Sartorius, Ohaus
Su Banyosu	: Memmert
Ultrasonikasyon	: Selecta
Otomatik Pipetler	: Brand Pipetleri, Dragon Lab.
Rotary Evaporatör	: Büchi Rotavapor R-200
Elektroforez	: Bio-RAD

2.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kestane (*Castanea Sativa*) tohumlarından lipazın saflaştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada tohumlardan yağı uzaklaştırılmasında organik çözücü olarak petrol eteri (40-60°C) ve sokslet cihazı kullanıldı.

Saflaştırma işleminde yağı uzaklaştırılmış kestane tohumlarından, 60 mM fosfat tamponu (pH=7.0) ile hazırlanan ham ekstreler kullanıldı. Fosfat tamponunun hazırlanmasında K_2HPO_4 (Carlo Erba7758-11-4) ve KH_2PO_4 (Carlo Erba7778-77-0)'dan yararlanıldı. Kestane tohumlarından hazırlanan ham ekstre nin amonyum sülfat kesiti için $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma 31119) ve Sigma marka {D-9527 genişliği 43 mm (1.7"), çapı 27 mm (1.1")} dializ kesesi kullanıldı.

Ham ekstre ve amonyum sülfat kesitinin hazırlanmasında King marka blender, Chiltern Hotplate HS 31 manyetik karıştırıcı ve SIGMA 3K 30 soğutuculu santrifüj kullanıldı.

Kolon kromatografisinde dolgu maddesi olarak hazır alınan hidroksilapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) (Sigma 289396) kullanıldı.

DEAE-selüloz kolon kromatografisinde, kolon dolgu maddesi olarak DEAE-selüloz (Sigma D-3764) kullanıldı. Hazırlanan ekstrelerin ve hidroksilapatit ve DEAE-selüloz kolon kromatografileri çıkışında elde edilen fraksiyonların saklanması +4°C'lik buzdolabı ve dondurucusu kullanıldı.

Enzim aktivitesi ve protein miktar tayinlerinde Shimadzu UV mini 1240 spektrofotometre, tampon çözeltilerin hazırlanmasında ise Beckman pH metresi kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümü ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasında, Clifton ve Memmert su banyoları, Giresun Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Laboratuvarında bulunan Bio-RAD marka Dikey Elektrophorez (Protein Jel Mini elektrophorezi) enzimin molekül ağırlığı bulmak amacıyla kullanıldı.

Kestane tohumlarından elde edilen ham ekstrede, %90'lık amonyum sülfat fraksiyonunda, hidroksilapatit ve DEAE-selüloz kolon kromatografilerinden elde edilen fraksiyonlarda, enzim aktiviteleri tayinlerinde substrat olarak p-nitrofenil asetat (p- NFA) (Fluka 46021), tampon olarak Tris(hidroksimetil)aminometan (Merck), $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck 303TA571865), dimetilsulfoksit (DMSO) (Merck 116743)'den yararlanıldı.

Protein miktar tayininde; Lowry metoduna göre standart olarak sığır serum albumini (Merck 112018), protein miktar tayininde kullanıldı. Folin ayracı (Merck), CuSO_4 (Sigma 12849), dipotasyum tartarat, sodyum karbonat, sodyum hidroksit kullanıldı. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrophorezi (SDS-PAGE)'nde ise, N,N'-metilendiakrilamid (Merck 805968), akrilamid (Merck 800830) ve amonyum persülfat (Merck K33569001436) kullanıldı. Jellerin hazırlanmasında Tris(hidroksimetilaminometan) (Merck), HCl (Merck 100314), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Fluka 71725), N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED) (Fluka 87687), amonyum persülfat (Merck 1200); numune tamponunda

Tris(hidroksimetilaminometan) (Merck), HCl (Merck 100314), SDS (Sigma L3771), β -merkapt etanol (Merck 805740.0250), brom timol mavisi (Merck 103026.0005), gliserin (Merck 4091); yürütme tamponunun hazırlanmasında Tris(hidroksimetilaminometan) (Merck), glisin (Sigma 15524) ve SDS (Sigma L3771); renklendirme çözeltisinde Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck 115444.0025), metanol (Merck 106008.2500) ve asetik asid (Merck 100056); renksizleştirme çözeltisinde asetik asid (Merck 100056) ve metanol (Merck 106008.2500) kullanıldı. Molekül ağırlığını tayin etmek için standart olarak Sigma marka marker kit (MW-ND500-1KT) kullanıldı.

2.3. Kestane Tohumu Ham Ekstresinin Hazırlanması

Kestane tohumlarında yağ oranı fazla olduğundan yağın enzimlere zarar vermeyen bir çözücü sisteminde ayrılmasını sağlamak amacıyla, petrol eteri, metanol, kloroform gibi çözücüler kullanıldı. Blender yardımıyla parçalanmış 60 g kestane tohumu, Sokslet cihazında 420 mL çözücü ile 3 saat ekstrakte edildi. Çözücü rotary evaporatörde uzaklaştırıldı. Bu şekilde yağı uzaklaştırılmış kestane tohumları tekrar tartılarak, +4°C saklandı. Benzer çalışmalar göz önüne alındığı için kestane yağını en iyi ekstrakte eden çözücünün petrol eteri olduğu için tohumlardan yağı uzaklaştırmak amacıyla petrol eteri kullanıldı.

Kestane tohumlarından ham ekstre hazırlamak üzere petrol eteri ile yağı alınmış 60 g kestane tohumu üzerine 420 mL 0.06 M fosfat tamponu (pH= 7.0) (1:7, w/v) ilave edildi ve +4°C'de manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırıldıktan sonra, ağzı kapatılarak bir gece +4°C bekletildi. Ertesi gün homojenizat iki kat bezden süzülde. 0°C'de 20000 rpm (37565 rcf)'de, 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım alındı. Bu işlemlerin sonucunda kestane tohumu ham ekstresi elde edildi. Ham ekstrede lipaz esteraz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

2.4. Kestane Tohumu Ham Ekstresinde Lipazı Çöktüren Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Saptanması

Kestane tohumlarındaki lipazı çöktürecek uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, 25 mL'lik 10 adet behere, 5'er mL kestane

tohumu 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 (37565 rcf)'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 kestane tohumu için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %90 olduğu saptandı.

2.5. Kestane Tohumu Ham Ekstresinde Lipazın %90 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi ve Dializ İşlemi

Kestane tohumu lipazını çöktüren en uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %90 olduğu saptandığından, ham ekstre ortamdaki konsantrasyonu %90 olacak şekilde, toz amonyum sülfat azar azar ilave edildi. Soğuk dolapta manyetik karıştırıcı ile 45 dakika karıştırıldıktan sonra ağız kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün 0°C'de 20000 rpm (37565 rcf)'de, 30 dakika, santrifüje edildi. Süpernatant atıldı. Çökelti pH'sı7.0 olan 0.06 M sodyum fosfat tamponunda çözüldü ve hacmi ölçüldü. Bu çözeltide de esteraz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra, amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla dializ kesesine (Sigma D-9527 {genişliği 43 mm (1.7"), çapı 27 mm (1.1")}) konuldu. Soğuk dolapta, 0.01 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.0) ile çözelti sık sık değiştirilerek ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak, çözeltide sülfat iyonu kalmayınca kadar dializ işlemine devam edildi. Dializ işlemi tamamlanmış olan çözelti, dializ kesesinde çöken kısımları uzaklaştırmak amacıyla, 0°C'de 20000 rpm (37565 rcf)'de, 30 dakika, santrifüj edildi. Üstteki berrak çözelti alındı ve %90 amonyum sülfat kesiti olarak adlandırıldı. Esteraz aktivitesi ve protein miktarı tayin edildikten sonra uygun hacimlere bölünerek buzdolabının dondurucusunda saklandı.

2.6. Hidroksiapatit Kolon Kromatografisi

Hazır olarak temin edilen hidroksiapatit, alt ucu ince sinterli madde ile kapatılmış, 2.4 cm çapında, alt kısmı musluklu bir cam kolona, kolon yüksekliği 9 cm olacak şekilde dolduruldu. Kolon, hacminin yaklaşık üç katı kadar pH'sı 7.0 olan 0.5 mM sodyum fosfat tamponu geçirilerek dengelendi. Kolona yaklaşık 203.5 mg/mL protein olarak %90 amonyum sülfat kesiti uygulandı. Kolondan sırasıyla 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM ve 200 mM sodyum fosfat tamponları (pH=7.0) geçirilerek gerçekleştirildi. 4-5 mL hacimler halinde toplanan (60 mL/saat) eluatların absorbansları elue 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 birleştirilerek, lipaz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldıktan sonra uygun hacimlere bölünerek, daha sonra kullanılmak üzere dondurucuda saklandı.

2.7. Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografisi

2.7.1. 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. 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.

2.7.2. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Uygulaması

Yukarıda belirtilen şekilde şişirilmiş olan DEAE-selüloz, 1.4 cm çapındaki alt ucu ince sinterli 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 hidroksiapatit kolonundan elde edilen 100 mM'lık eluat 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 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM ve 100 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.

2.8. Protein Miktar Tayini

Kestane tohumundan lipazın saflaştırılması sırasında, ham ekstre ve % 90'lık amonyum sülfat fraksiyonunun elde edilmesi evrelerinde, protein miktarı Lowry yöntemine (130) göre tayin edildi. Hidroksiapatit ve DEAE-selüloz kolon kromatografileri ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktar tayinlerinde ise E_{280}/E_{260} Warburg yöntemi (131) kullanıldı.

2.8.1. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Ayıraçlar A ayıracı: 0.1 N NaOH içinde çözülmüş % 2 Na_2CO_3 çözeltisi

B ayıracı: % 0.5 $CuSO_4$ '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.

2.8.1.1. 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.

2.8.1.2. 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.

2.9. E₂₈₀/E₂₆₀ Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Kolondan elde edilen elüatların 280 nm ve 260 nm'deki absorbansları 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).

E₂₈₀/E₂₆₀	% 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

2.10. Lipaz Aktivitesinin Tayini

Lipaz enzimi esteraz ve hidrolaz olmak üzere iki farklı aktiviteye sahiptir. Çalışmamızda kestane tohumu lipaz aktivitesi, esteraz aktivitesi tayin yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı (132).

2.10.1. Esteraz Aktivitesi Tayini

2.10.1.1. 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.

Dimetilsulfoksid (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 jodede 100 mL'ye tamamlandı. 0.500 M HCl çözeltisi ile pH'sı 7.4'e ayarlandı.

2.10.1.2. 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 (µmol/dakika).

2.11. Sodyum Dodesil Sülfat -Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS - PAGE) (133)

2.11.1. 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.

2.11.2. Jellerin Hazırlanması

Ayrırma Jeli: 5 mL 1 M Tris-HCl (pH=8.8), 4.4 mL %30 akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid, 0.203 mL %10'luk SDS, 1-2µL %99.99'luk N,N,N',N'-tetrametil etilen

diamin (TEMED) ve 3.13 mL distile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine son olarak 0.266 mL %1.5'lik günlük hazırlanmış amonyum persülfat çözeltisi ilave edildi.

Yığma Jeli: 1 M Tris-HCl (pH=6.8)'den 1.24 mL, %30 akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %10'luk SDS'den 0.1 mL, %99.99'lik TEMED'den 1 μ L ve distile sudan 5 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak günlük hazırlanmış %1.5'lik amonyum persülfat çözeltisinden 0.2 mL ilave edildi. Yığma jeli ile işlem yaparken distile su miktarı 5 mL çekildi.

2.11.3. Enzim Saflığının SDS - PAGE ile Kontrolü

Kestane tohumu lipazının DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi, Laemmli tarafından belirtilen (133) 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 μ L olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Sırasıyla Ham ekstre, Hidroksiapatit kolon eluatı, ve Liyofize edilen DEAE kolon eluatı kuyucuklara yüklemesi yapıldı. Sığır sütünden elde edilen α -lactalbumin (14.2 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır serum albumini (66 kDa Monomer-132kDa Dimer) ve fasülyeden elde edilen üreaz (272 Trimer- 545 Heksamer) içeren standart protein çözeltileri, içerisinde 200 μ g protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 20 μ L 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, yağma 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 asidde saklandı.

Kestane tohumu 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.

2.12. Kestane Tohumundan Elde Edilen Lipazın Esteraz Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

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

2.12.1. Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi

Kestane tohumundan 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 Na_2HPO_4 -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.

2.12.2. 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 (132).

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

2.12.3. 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 (132). 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.

2.12.4. 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 (132).

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

2.12.5. 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 (132).

2.12.6. Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisinin İncelenmesi

Kestane tohumundan saflaştırılan lipaz enziminin farklı substratlara karşı ilgisini saptamak için K_m ve V_{max} değerleri tayin edildi. Bu amaçla p-NFA, p-NKB, 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 (134,135). 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.

2.12.7. 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).

2.12.8. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun esteraz aktivitesine etkisini araştırmak amacıyla p-nitrofenil asetat cözeltisinden 0.1 - 1.0 mL arasında değişen hacimlerde alınarak yukarıda belirtilen şekilde esteraz aktivitesi Erlanson yöntemine göre tayin edildi (132).

3. BULGULAR

3.1. Kestane Tohumu Lipazının Saflaştırılması

3.1.1. Uygun Amonyum Sülfat Konsantrasyonu

Kestane tohumu ham ekstresinde lipazı çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun %90 olduğu belirlendi.

3.1.2. Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi

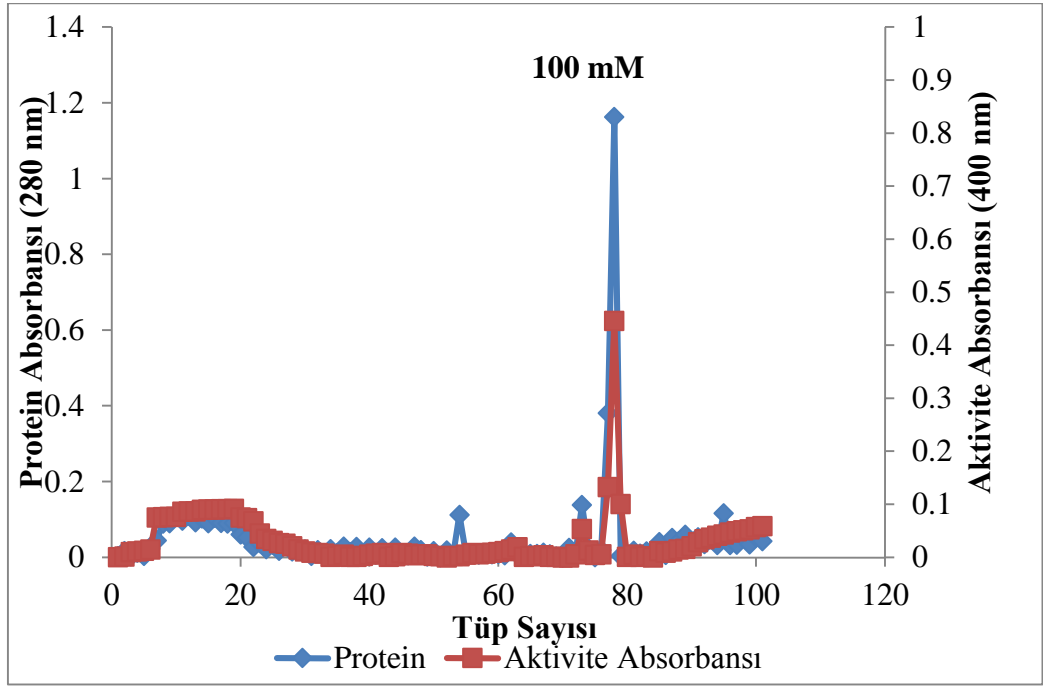
Kestane tohumu ham ekstresinin %90 amonyum sülfat kesitinin hidroksilapatit kolonuna uygulanması ve 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM'a kadar farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponları (pH=7.0) ile elüsyonu sonucunda, 5 mM, 50 mM ve 100 mM'lık elüatlarda lipaz aktivitesi görüldü. En yüksek lipaz aktivitesi 100 mM fosfat tamponu ile elde edilen elüatlarda bulundu (Şekil 3.1). En yüksek lipaz aktivitesi gösteren tüplerdeki elüatlar daha ileri bir saflaştırma için DEAE-selüloz kolonuna tatbik edildi. En yüksek lipaz aktivitesi gösteren tüplerdeki elüatlar bir araya toplanarak protein miktarı ve lipaz esteraz aktivitesi tayin edildi; bu çözelti daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

3.1.3. DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi

Hidroksilapatit kolon çıkışlı 100 mM fosfat eluatının DEAE-selüloz kolonuna uygulanması sonucunda lipazın 1 mM NaCl/0.5 M sodyum fosfat tamponu ile tek pik şeklinde olduğu gözlemlendi (Şekil 3.2).

Kestane tohumlarından lipazın saflaştırılma evreleri ve bu evrelere ait sonuçlar Tablo 3.1'de gösterildi.

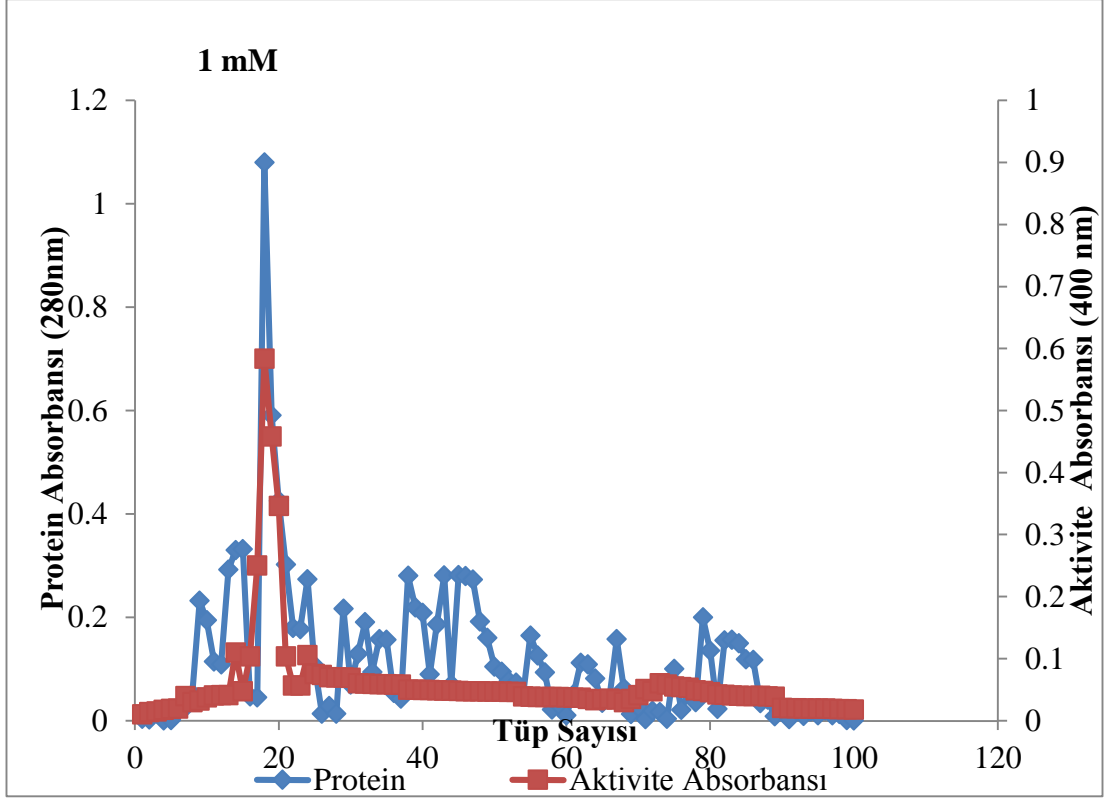
Çalışmamızda kestane tohumu ham ekstresi hazırlama, amonyum sülfat kesiti, hidroksilapatit ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi evrelerinde lipaz aktivitesi, esteraz (132) aktivitesi olarak tayin edildi. Kestane tohumlarından lipaz enzimi DEAE- selüloz kolon kromatografisi sonucu 186.87 kez saflaştırıldı (Tablo 3.1).



Şekil 3.1 Kestane Tohumu Ham Ekstresinin %90 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği.

Kolon boyutu: 1.2x 9 cm; Kolona uygulanan protein: 203.5 mg/mL

Akış hızı: 60 mL/saat elüsyon tamponları: pH'sı 7.0 olan 5 mM,10 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM sodyum fosfat tamponu.



Şekil 3.2 Hidroksilapatit Kolonu 100 Mm'lık Elüatının DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği.

Kolon boyutu: 1.2x 9 cm Kolona uygulanan protein: 203.472 mg/mL elüsyon tamponları: pH'sı 7.0 olan 0.5 mM sodyum fosfatta çözülmüş 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM ve 100 mM NaCl.

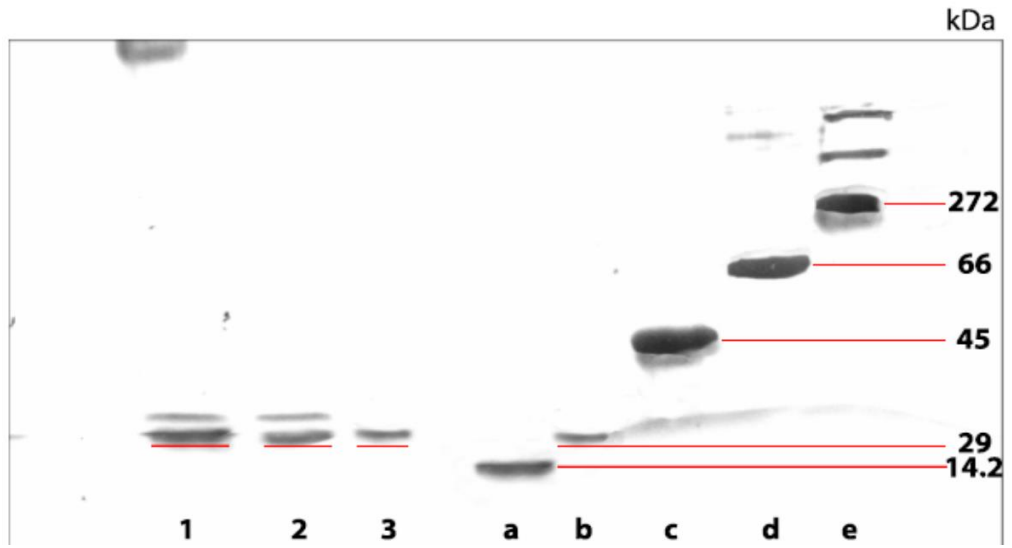
Tablo 3.1 Kestane Tohumlarından Lipazın Elde Edilme Evrelerinin Esteraz Aktivitesine Göre İncelenmesi

İşlem Evreleri	Total Protein (mg)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı
Ham Ekstre	7432	198754	26.74	1
%90 Amonyum Sülfat Kesiti	501	12507	24.97	0.93
Dializat	158	4817	30.49	1.14
HidroksilapatitKolon Kromatografisi	38	9200	242.11	9.05
DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi	14	69958	4997	186.87

3.1.4. 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 3.3).

Image Report: GRUMLAB 2015-03-30 20hr 24min

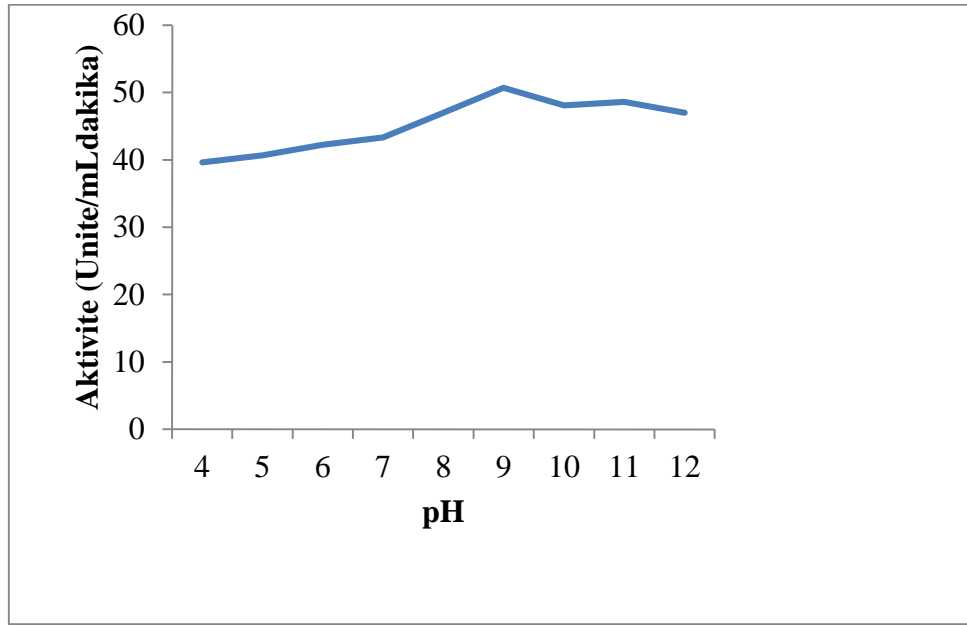


Şekil 3.3 SDS-PAGE Jel Elektroforezi

1. Ham ekstre
2. Hidroksi apatit eluatı
3. DEAE-selüloz enzim çözeltisi
- a. Bovine milk laktalbumin (Mr = 14.2 kDa)
- b. Karbonik anhidraz (Mr = 29 kDa)
- c. Albumin(Mr = 45 kDa)
- d. Serum albumin (Mr = 66 kDa monomer, Mr=132 kDa dimer)
- e. Fasülyeden elde edilen üreaz (Mr= 272 kDa trimer, 545 kDa hekzamer)

3.1.5. Lipaz Esteraz Aktivitesine pH'nın Etkisi

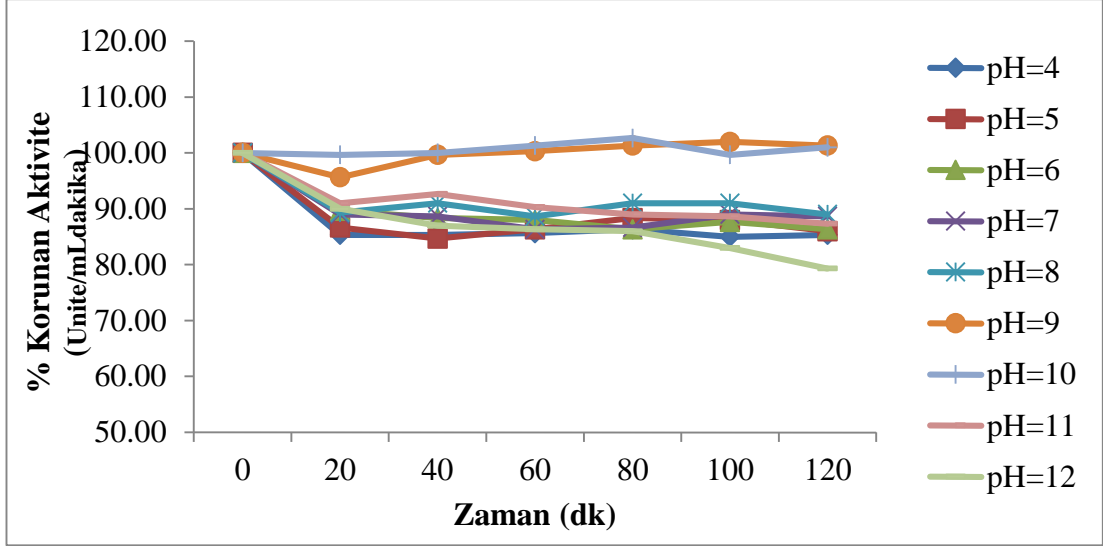
Farklı pH'larda (pH=4-12) lipaz aktivitesinin 400 nm'de, 100 mM p-nitrofenil asetat substratı kullanılarak Erlanson yöntemine göre incelenmesi sonucunda kestane tohumu lipazının en yüksek aktiviteyi pH=9'da gösterdiği, pH=10'dan sonra aktivitenin azaldığı görüldü (Şekil 3.4) (132).



Şekil 3.4 Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

3.1.6. Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi

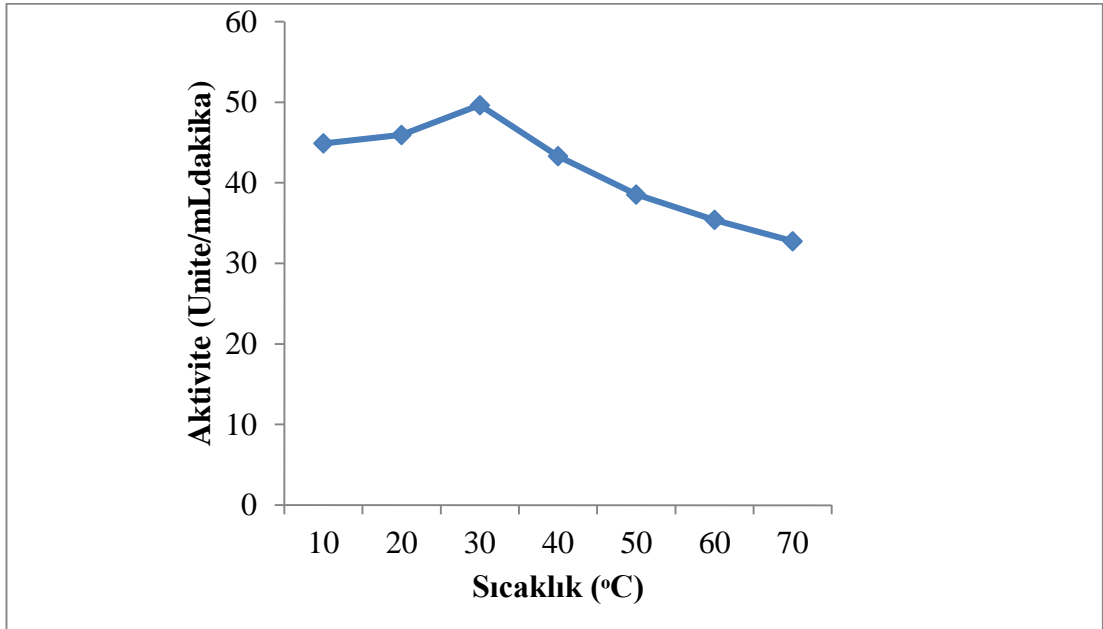
Esteraz aktivitesinin pH'a bağımlı stabilitesini belirlemek amacıyla pH=4-12 arasında; 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakikalardaki bekleme süreleri sonucunda hesaplanan aktivitelere göre çizilen grafikte pH=10'da enzim aktivitesinin en yüksek olduğu ve zamana bağlı olarak aktivitenin 100. dakikadan sonra az da olsa arttığı saptandı. Diğer pH'larda önemli farklılıklar görülmedi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi

3.1.7. Lipaz Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

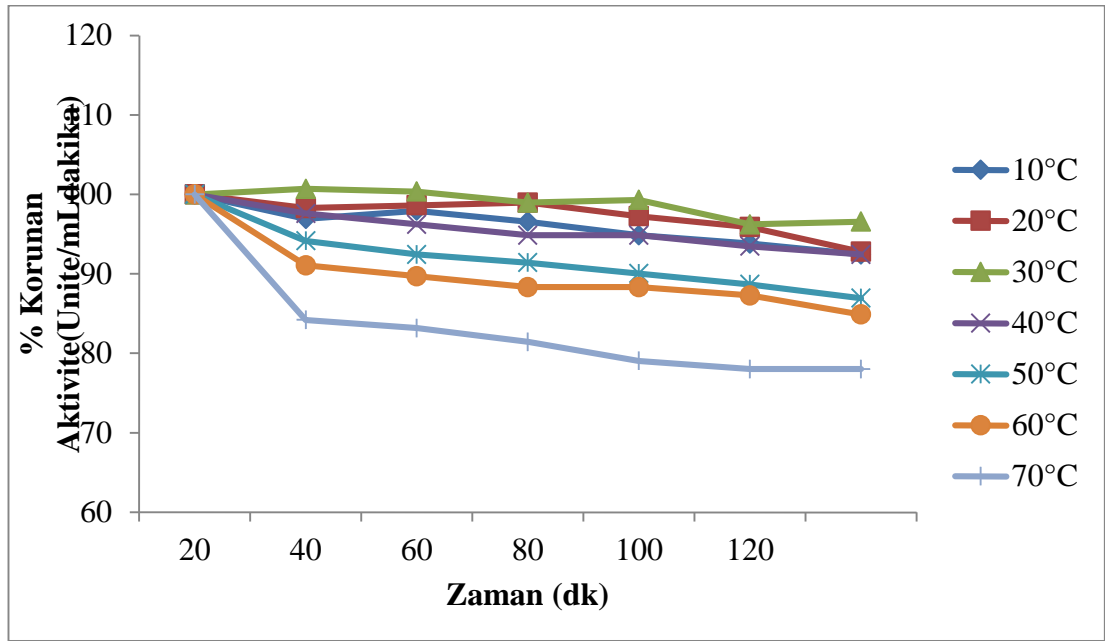
Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi 10°C-70°C arasında p-NFA substratı kullanılarak incelendiğinde, en yüksek aktivitenin 30°C'de olduğu bulundu. Sıcaklığın daha da artmasıyla aktivitenin azaldığı saptandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

3.1.8. Lipaz Esteraz Aktivitesinin Termal Stabilitesi

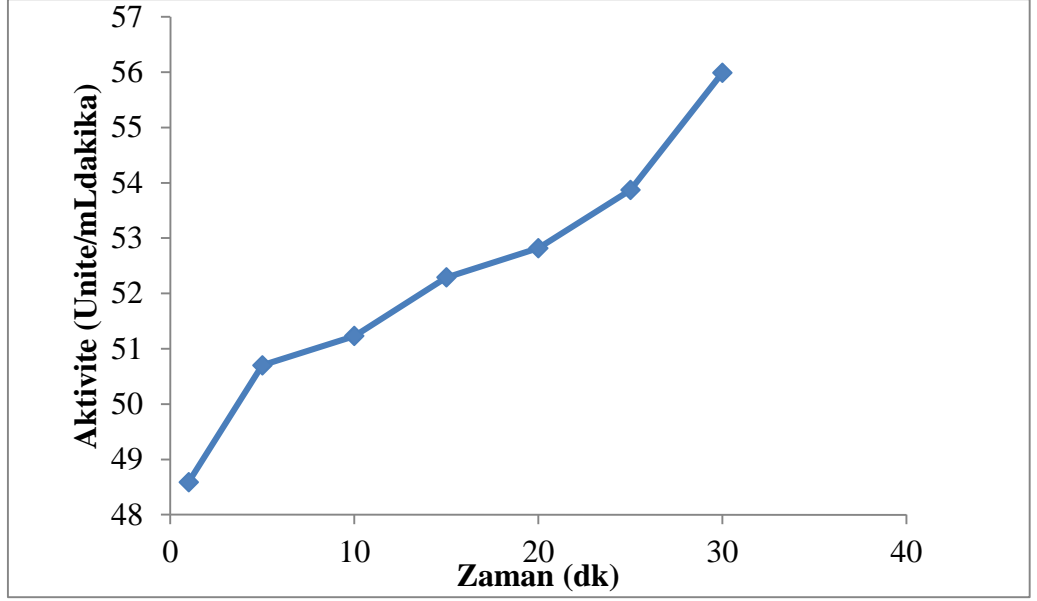
Lipazın sıcaklığa bağımlı stabilitesini belirlemek amacıyla 10-70°C arasında 20, 40, 60, 80, 100 ve 120. dakikalardaki bekleme süreleri sonucunda hesaplanan aktivitelere göre çizilen grafiklerden lipazın aktivitesinin tüm sıcaklıklarda bekleme sürelerindeki aktivite değerlerinde çok azalma olduğu saptandı. En yüksek aktivite kaybı 100. dakikadan sonra görüldü (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 p-Nitrofenil Asetatın Sıcaklık Stabilitesi

3.1.9. Uygun Reaksiyon Süresinin Bulunması

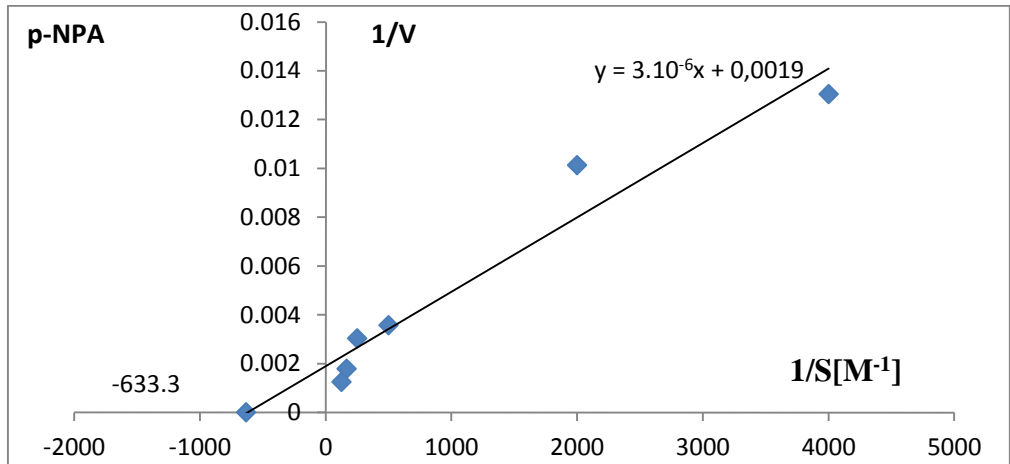
Lipaz esteraz aktivitesinin 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30. dakikalarındaki reaksiyonlar sonucunda aktivitenin zamana bağlı olarak arttığı saptandı. Ancak aktivitede artışın 5. dakikada başlaması nedeni ile aktivite tayininde 5 dakikada ölçümlerin yapılmasına karar verildi (Şekil 3.8).



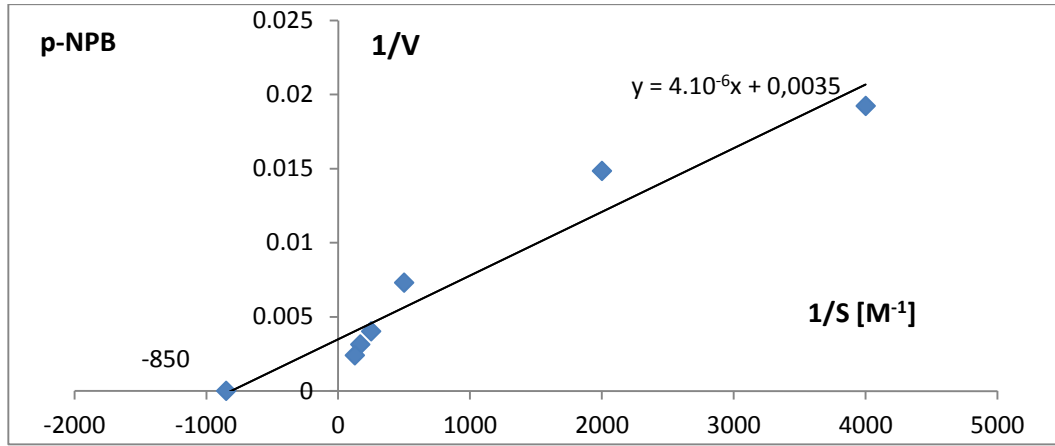
Şekil 3.8 Zamanın Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi

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

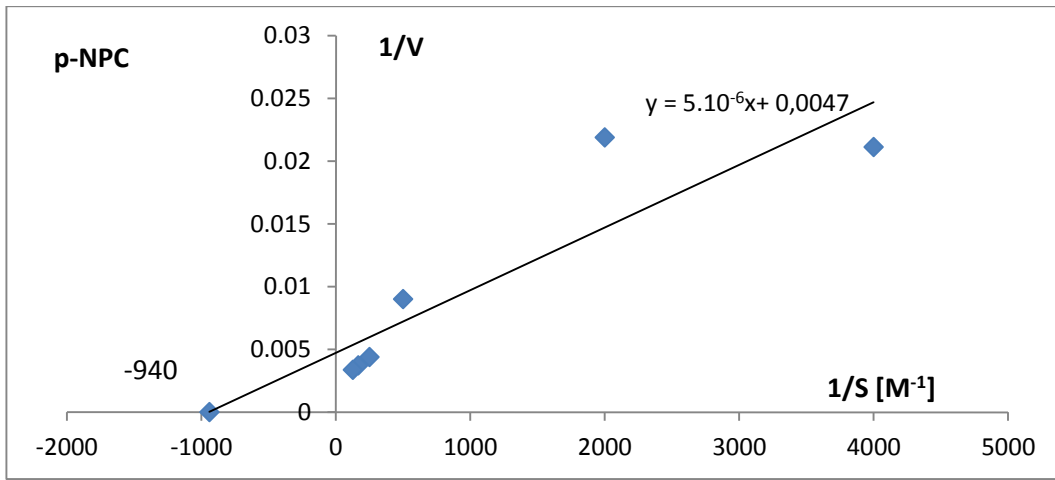
Lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk denkleminde yararlanılarak hesaplandı. Lipazın substrat olarak en fazla ilgisinin p-nitrofenil asetada olduğu görüldü (Şekil 3.9).



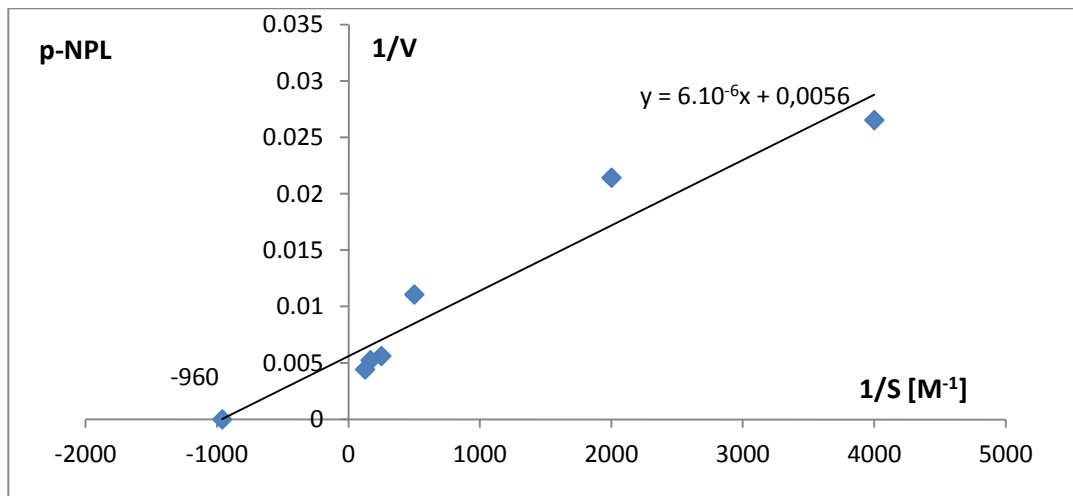
Şekil 3.9 p-Nitrofenil Asetat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



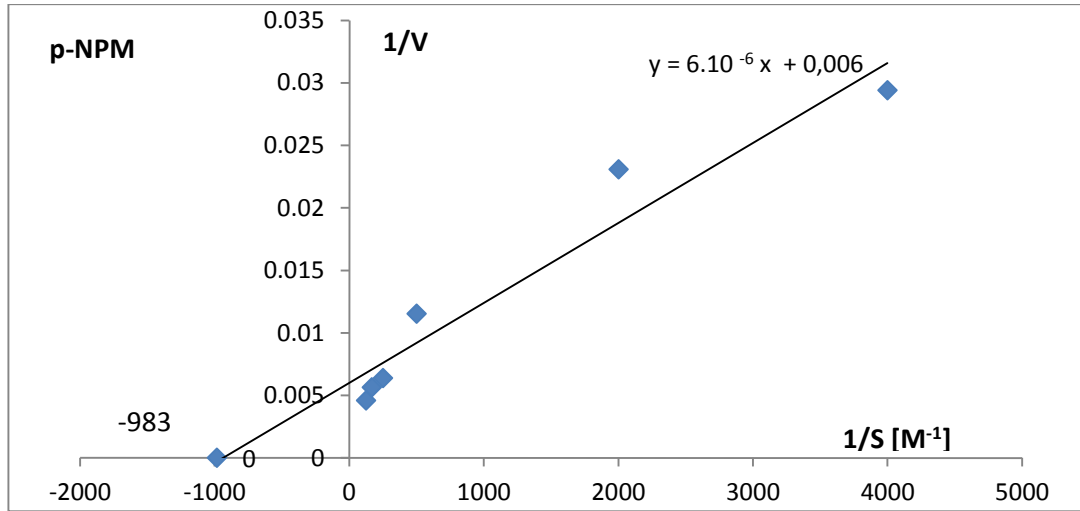
Şekil 3.10 p-Nitrofenil Bütirat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



Şekil 3.11 p-Nitrofenil Kaprat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



Şekil 3.12 p-Nitrofenil Laurat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi



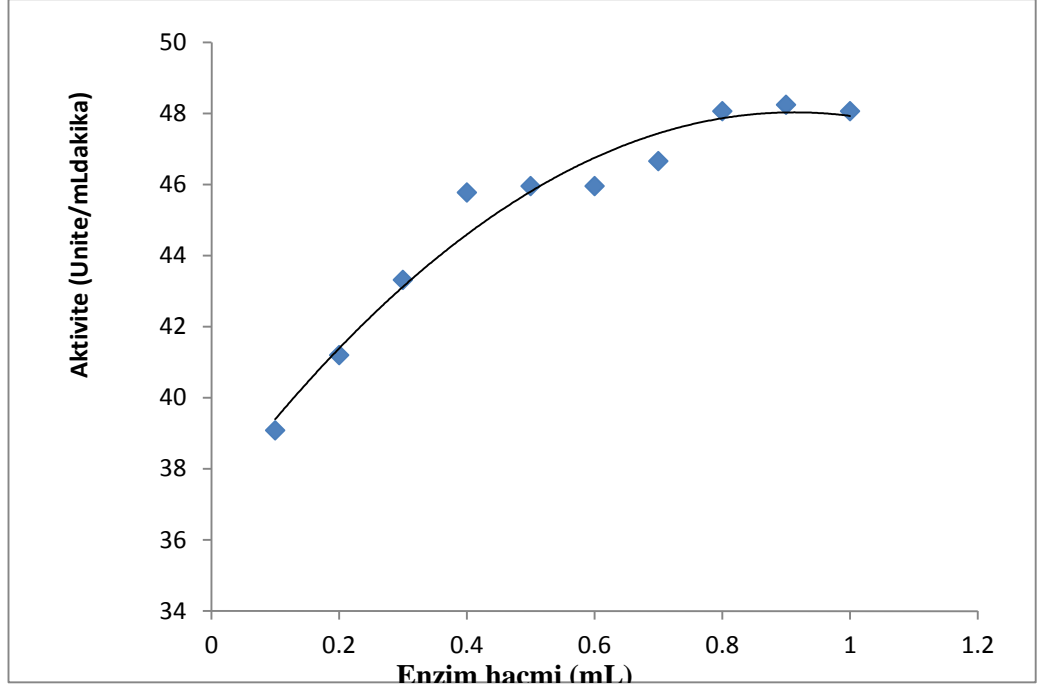
Şekil 3.12 p-Nitrofenil Miristad Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi

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

Substrat	K_m	K_m (mM)	V_{max} (U)	V_{max} / K_m
p-NPA	0,001579	1,579	526,31	333,3186
p-NPB	0,001176	1,176	285,71	242,9507
p-NPC	0,001064	1,064	212,76	199,9624
p-NPL	0,001042	1,042	178,57	171,3724
p-NPM	0,001017	1,017	166,66	163,8741

3.1.11. Enzim Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi

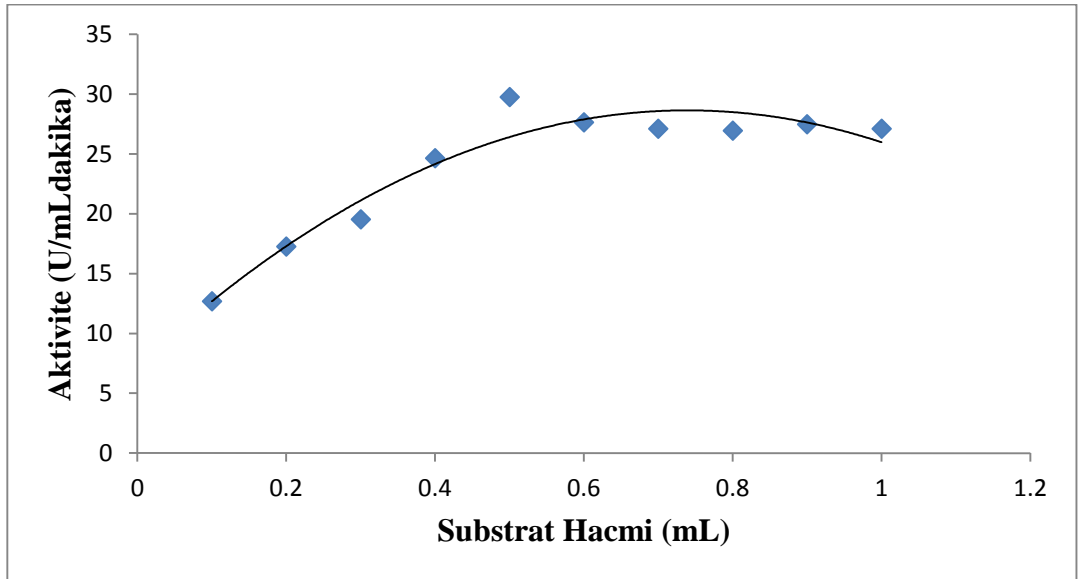
0.1-1.0 mL arasında değişen hacimlerde alınan enzim çözeltileriyle lipaz esteraz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Enzim hacminin artması ile lipaz aktivitesinin arttığı görüldü. Ancak 0.5 mL enzim hacminde aktivite belli bir değerde dengelendiği yinede enzim hacminin artması ile aktivitenin çok fazla artış göstermediği saptandı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Enzim konsantrasyonunun lipaz esteraz aktivitesine etkisi

3.1.12. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesine Etkisi

Farklı miktarda p-nitrofenil asetat substratına karşı lipazın esteraz aktiviteleri ölçüldü. En yüksek aktivitenin 0.5 mL substrat ile olduğu bulunduğundan çalışmamızda 0.5 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 kestane bitkisinden saflaştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, kestane lipazı ilk kez saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

Bitki tohumlarındaki yağların uzaklaştırılmasında çözücü olarak, hekzan (43,136), aseton (43) kloroform (92), petrol eteri, izopropil alkol (137) gibi çözücüler kullanılmıştır. Çalışmamızda kestanedeki yağı uzaklaştırmak için farklı çözücüler kullanılarak kestanedeki yağı en yüksek oranda ekstrakte eden çözücünün petrol eteri olduğu bulunmuştur.

Enzimlerin çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasında, farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere göre çalışmalarda saflaştırma oranları da değişmektedir. Yapılan çalışmalarda lipaz, palm meyvasındaki bir bakteriden 1250 kat (138), pirinç kepeğinden 7.6 kat (139), ayçiçek tohumundan 603 kat (101), *Aspergillus niger*'den 50 kat (140), süttten izole edilen *Serratia marcescens*'ten 20.88 kat (141) ve *Pseudomonas sp.*'den 37 kat (142) olarak saflaştırılmıştır. Çalışmamızda kestane lipazı 186.87 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; *Jatropha curcas* L. tohum lipazının molekül ağırlığının 21.6 (143), *Mucor*

hiemalis f. hiemalis lipazının 49 kDa (144), pirinç kepeğinin 9.4 kDa (43), palm meyvasının 32 kDa (138), ayçiçek tohum lipazının 22 kDa (101), *Brassica napus* L. bitkisinin ise 55 kDa (139) molekül ağırlığında oldukları bulunmuştur.

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi ve dayanıklılığı üzerine yaptığımız çalışmalar sonucunda kestane lipazının optimum pH'sının 9.0 olduğu görüldü. Enzimin pH dayanıklılığı incelendiğinde ise; pH= 4-12 aralığında enzimin 20 ile 120 dakika inkübe edilmesinden sonra, lipazın en yüksek aktivite değerlerinin pH=9-10 arasında olduğu görüldü (Şekil 3.1.6). Bu sonuca göre, lipazın bazik alanlarda yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Bitkisel kaynaklı yağlı tohumların lipaz aktivitesine etki eden pH değerleri üzerine yapılan çalışmalarda, kayısı tohum lipazının optimum pH'sı 8-9 (10), ayçiçek tohum lipazının optimum pH'sı 8-9 (101), pirinç kepeği lipazının optimum pH'sı 7-7.5 (43), hint yağı bitki tohumundan elde edilen lipazın optimum pH'sı 4.2 (103,145,147), *Umbellularia californica* tohumlarından saflaştırılan lipazın optimum pH'sı 8.5 olarak (146) bulunmuştur. Ayrıca, Amerikan fıstığı, ayçiçek, hıyar, pamuk, fındık, domates tohumu ve mısırdan elde edilen lipazların optimum pH değerleri de 9.0 olarak bulunmuştur. Kestane lipazının pH stabilitesi incelendiğinde pH 9'da enzimin dayanıklılığının en yüksek olduğu görülmektedir. Saflaştırılan enzimin optimum pH değerinin ve dayanıklılığının pH=9 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 (43,138,146). Kestane tohumundan saflaştırılan lipazın 25°C (10), palm yağı (*Elaeis guineensis*)'nden saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığının 30°C (147), acı bakladan saflaştırılan lipazın ise 25°C olduğu verilmiştir (148), *Trichosporon asteroide*'ten saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığının 60°C olduğu ve enzimin 70°C'deki sıcaklığa karşı stabil olduğu bulunmuştur (149). *Aeromonas sobria* LP004'den saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığının 45°C olduğu ve 40°C'den daha yüksek sıcaklıklarda enzimin kararlılığını kaybettiği görülmüştür

(150). Kestane lipazının sıcaklık stabilitesi incelendiğinde enzimin 10-70°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 söylenebilir. Uygun enzim konsantrasyonu, substrat ve reaksiyon sürelerinin tayininde bulduğumuz değerler, enzim aktivitesinin uygun reaksiyon şartlarında yapıldığını göstermektedir.

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

- Kestanedeki lipaz, esteraz aktivitesine göre 186.87 kat saflaştırıldı.
- Kestanedeki saflaştırılan lipazın, SDS-PAGE elektroforezi sonucunda molekül ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu.
- Lipaz enziminin p-nitrofenil asetat substratına göre optimum sıcaklık değerinin 30°C, optimum pH değerinin 9.0 olduğu bulundu.
- Lipaz esteraz aktivitesi için uygun reaksiyon süresi ise 5 dakika olarak belirlendi.
- Lipaz enziminin en çok ilgi gösterdiği p-nitrofenil miristat substratına karşı K_m ve V_{max} değerlerinin, sırasıyla 1,017 mM ve 163,8741 U olduğu bulundu.
- Lipaz esteraz aktivitesinin uygun enzim ve substrat konsantrasyonunun 0.5 olduğu belirlendi.

Elde edilen sonuçlardan, ülkemizde yetişen ve yurt dışına ihraç edilen kestane tohumlarından lipaz enziminin saflaştırılıp çeşitli endüstri alanlarında kullanılabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Khrevioğlu, İ. Ö. ve Keha, E. E. 2009. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, İstanbul.
2. Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.
3. Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. 2001. Research review paper: Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627-662.
4. Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata F.X. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 187-204.
5. 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.
6. Şengel, B., 2007. Deterjan katkı maddesi olarak mikrobiyal kaynaklı lipaz üretim koşulları. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, pp. 174, Ankara.
7. Ünlü, A. E., 2004. *Candida rugosa* lipazının özellikleri ve enantiyoseçimliliğinin artırılması. Seminer. Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
8. Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbial Biotechnology* 64: 763-781.

9. Hasan, F., Aamer, A.S., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251.
10. 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.
11. Yeşiloğlu, Y., Başkurt, L., 2008. Partial purification and characterization of almond seed lipase. *Preparative Biochemistry Biotechnology* 38: 397-410.
12. Telefoncu, A. 1997. *Enzimoloji*. pp. 193-243-353-383, Tübitak Yayınları, Aydın.
13. Kuzu, S.B. 2008. Kitinaz üreten bacillus izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 82, Adana.
14. Güner, S. 2007. *Biyokimya I*. Kradeniz Teknik Üniversitesi, Kitap Satış Bürosu, Trabzon.
15. Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. 2002. *İnsan Biokimyası*. Palme Yayıncılık.
16. 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.
17. Aehle, W., 2004. Enzymes in industry production and application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, pp. 484.
18. Tekman, Ş., Öner, N. 1981. *Genel Biyokimya Üçüncü Baskı*. pp. 351-367, Fatih Yayınevi, İstanbul.

19. Can, A., Akev, N. 2008. *Eczacılık Fakültesi Öğrencileri İçin Biokimya Dersleri*. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul.
20. Chaturvedi M., Singh M., Man C.R., Pandey S. 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.
21. Özata, A., Kutlu, M. 2000. *Enzimoloji Ders Notları*. T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
22. Van Beilen, J.B., Li, Z., 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 338-344.
23. Sağiroğlu. A., K., 1999. Enzim Teknolojisi. *Bilim ve Teknik* 383: 74-80.
24. 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.
25. Telefoncu, A., 1986. *Temel ve uygulamalı enzimoloji*. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çeşme, pp. 326, İzmir.
26. 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.
27. <http://biyodoc.com/Enzim-calismasina-etki-eden-faktorler.html> Web adresinden 04 Nisan 2015 tarihinde edinilmiştir.
28. Arpigny, J.L., Jaeger, K.E., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal* 343: 177-183.

29. Yang, D. S., Rhee, J.S. 1992. Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent. *Biotechnoogyl and Bioenergy* 40: 748-752.
30. Telefoncu, A. 1997. *Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskısı, pp. 249-306, Kuşadası-Türkiye.
31. Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S., Gulati, R. 1999. Microbial Lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science* 77: 101-115.
32. Klibanov, A.M. 1990. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Accounts of Chemical Research* 23: 114-120.
33. Hou, C.T. 2002. Industrial uses of lipase. *In Lipid Biotechnology*, 387-397.
34. Dalla Rosa, C., Morandim, M.B., Ninow, J.L., Oliveira, D., Treichel, H., Vladimir O.J. 2008. Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane. *The journal of Supercritical Fluids* 49-53.
35. Öztürk, B. 2001. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Institute of Technology, pp. 106, İzmir.
36. 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.
37. Gandhi, N.N. 1997. Review: Applications of Lipase. *Journal of American Chemist's Society* 74: 621-634.
38. 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 kernel oil with surfactant-coated lipase. *Biomass and Bioenergy* 33 (2): 277-282.

- 39.** Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha, A., 2011. Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overviewl. *Research Journal of Microbiology* 6 (1): 1-24.
- 40.** 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.
- 41.** 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.
- 42.** 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.
- 43.** 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.
- 44.** Dandik, L., Aksoy, H. A., 1996. Applications of nigella sativa seed lipase in oleochemical reactions. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 277-281.
- 45.** Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemistry* 29: 119-131.
- 46.** Vulfson, E. N., 1994. Industrial applications of lipases, In: Wooley, P., Peterson, S. B., editors, *Lipases-their structure biochemistry and applications*, Cambridge University Pres, 271-288.
- 47.** Bornscheuer, U.T., 2000. *Enzymes in lipid modification*, Weinheim: Wiley-VCH, pp. 66.

- 48.** Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U.T. 1998. Biotransformations with lipase. *Biotechnology* 8: 37-192.
- 49.** Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S. 2001. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochemistry* 36 (10): 933-939.
- 50.** 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.
- 51.** Gill, I., Valivety, R. 1997. Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* 15: 401-409.
- 52.** 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.
- 53.** <http://www.hayatisaglik.com/laboratuvar/lipaz-lps-testi-nedir.html> Web adresinden 21 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir.
- 54.** Öztürk, B., 2002. Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. *İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Gıda Mühendisliği Dergisi* 20-23.
- 55.** Tanyol, M., 2011. *Pseudomonas Fluorescens* (NRRL B-2641) Bakterisi Kullanılarak Lipaz Üretimi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, pp. 145.
- 56.** ozkan.balikesir.edu.tr/ads/adsorpsiyon09.pps web adresinden 21 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir. Biyosensörler konusunda Power Point sunusudur.

57. kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok10.ppt web adresinden 21 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir. Biyosensörler konusunda Power Point sunusudur.

58. 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.

59. 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.

60. Irie, Y., T. Matsukura., K. Hata., 1989. European Patent, app. EP 374700.

61. Jaeger, K.E., Reetz, M.T., 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 16 (9): 396-403.

62. Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S., 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 53-58.

63. 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.

64. <http://biyokure.org/biyodizelin-cevreye-etkisi/5482/> Web adresinden 22 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir.

65. 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.

66. 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.
67. 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.
68. Kojima, Y., Shimizu, S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (3): 219-226.
69. 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.
70. Brockerhof, H., Jensen, R. G., 1974. Lipolytic Enzymes, Academic Press, London, pp. 329.
71. 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.
72. Strohfeltd, P., Heugel, C., 1984. Characterization of triglyceride lipase activities in rat skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 121: 87-95.
73. 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.

- 74.** 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.
- 75.** 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.
- 76.** Metin, K., Akpınar, M. A., 2000. Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792 karaciğer lipaz enziminin kinetik özellikleri. *Turkish Journal of Biology* 24: 489-502.
- 77.** 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.
- 78.** Mejdoub, H., Reinbolt, J., Gargouri, Y., 1994. Dromedary pancreatic lipase: Purification and structural properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1213: 119-126.
- 79.** Lee, M. W., Severson, D. L., 1994. Partial purification of diacylglycerol lipase from bovine aorta. *Biochemical Journal* 298: 213-219.
- 80.** Iverius, P. H., Ostlund-Lindqvist, A. M., 1976. Lipoprotein lipase from bovine milk. *The Journal of Biological Chemistry* 251: 7791-7795.
- 81.** <http://tr.wikipedia.org/wiki/Lipaz> web adresinden 26 Mart 2015 tarihinde elde edilmiştir.
- 82.** Zechner, R., 1990. Rapid and simple isolation procedure for lipoprotein lipase from human milk. *Biochimica et Biophysica Acta* 1044: 20-25.
- 83.** 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.

- 84.** Dichek, H. L., Parrott, C., Ronan, R., Brunzell, J. D., Brewer, H. B., Santamarina-Fojo, S., 1993. Functional caharacterization of a chimeric lipase genetically engineered from human lipoprotein lipase and human hepatic lipase. *Journal of Lipid Research* 34: 1393-1401.
- 85.** Stead, D., 1986. Microbial Lipases: their characteristic, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research* 53: 481-505.
- 86.** Hadeball W., 1991. Production of Lipase by *Yarrowia lipolytica* I. Lipases from yeasts (Review). *Acta Biotechnolgy* 11 (2): 159-167.
- 87.** 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.
- 88.** Gill, J., Parish, J.H. 1997. Minireview: Lipases-Enzymes at an Interface. *Biochemical Education* 25 (1): 2-5.
- 89.** Marul, B., 2007. Fabrika Atıklarından İzole Edilen *Bacillus Sp.*'den Aktif ve Kararlı Lipaz Üretim Koşullarının ve Üretilen Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanımının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, pp. 107.
- 90.** 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.
- 91.** 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.

92. Sağıroğlu, A., Arabacı, N. 2005. Sunflower seed lipase: Extraction, purification, and characterization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 35: 41-56.
93. 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.
94. 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.
95. Korneeva, O. S., Popova, T. N., Kaprochikov, V. S., Montana, E. A., 2008. İdentification of Catalytically Active Groups of Wheat (*Triticum aestivum*) Germ Lipase. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44 (4): 349-355.
96. Başkurt L. 2005. Badem (*Amygdalus communis* L.) proteinlerinden lipaz izolasyonu ve özelliklerinin belirlenmesi. *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, pp. 94. Tekirdağ.
97. Yesiloglu, Y., Baskurt, L., 2008. Partial Purification and Characterization of Almond Seed Lipase. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 38 (4): 397.
98. Kılıç, İ. 2003. Batı Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen findık (*Corylus avellana* L.) tohumundan lipaz izolasyonu ve katalitik özelliklerinin belirlenmesi. *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, pp. 67. Tekirdağ.
99. 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.
100. Borgston, B., Brockman, H. L., 1984. Lipases. Amsterdam, Elsevier.

- 101.** 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.
- 102.** Sagioglu, A., Arabaci, N., 2005. Purification and characterization of lipase from sunflower seed. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 35 (1): 37-51.
- 103.** 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.
- 104.** Jacks, T. J., Yatsu, L. Y., 1974. "Phosphate inhibition of lipase activity in peanuts", *Journal of American Oil Chemist's Society* 51: 112-113.
- 105.** 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.
- 106.** 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.
- 107.** 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.
- 108.** 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.
- 109.** 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.

- 110.** 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.
- 111.** Kubicka, E., Grabska, J., Jedrychowski, L., 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.
- 112.** 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.
- 113.** Kun, O. S. M., 1997. Chemical changes and nutritive values of burukutu (a Nigeria beverage). *Nahrung* 41 (6): 375-377.
- 114.** 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.
- 115.** İsbilir, S. S., Özcan, 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.
- 116.** 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 *pachira aquatica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85 (8): 749-753.
- 117.** 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.

118. Sammaour, R. H., 2005. Purification and partial characterization of an acid lipase in germinating lipidbody linseedlings. *Turkish Journal of Botany* 29 (3): 177-184.
119. 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.
120. Subaşı, B. 2004. Kestane Sektör Profili, İstanbul Ticaret Odası Etüt ve Araştırma Şubesi, İstanbul.
121. Ağaoğlu, Y.S. 1987. Bahçe Bitkileri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No:1009 Ankara.
122. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kestane> web adresinden 28 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir.
123. Gün, A., Aşkın, M.A., Kankaya, A., 2006. Buldan'da ceviz ve kestane yetiştiriciliği üzerine araştırmalar. *Buldan Sempozyumu*, 847-854.
124. www.sifalibitkiler.us/archives/569 web adresinden 20 Şubat 2015 tarihinde edinilmiştir.
125. Milli Eğitim Bakanlığı. 2013. Bahçecilik-Kestane Yetiştiriciliği. Ankara.
126. Türkiye İstatistik Kurumu. 2013. Seçilmiş Göstergelerle Aydın. pp. 151.
127. <http://ayhanuslu2001.tr.gg/KESTANE> web adresinden 29 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir.
128. <http://www.gidabilimi.com/index.php/en/58-haberler/son-haberler/494-te-kestane-baletimini-art> web adresinden 29 Mart 2015 tarihinde edinilmiştir.

- 129.** Belen, İ. 2001. Dünyada ve Türkiye’de odun dışı orman ürünü olarak kestanenin değerlendirilmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 1-61, Trabzon.
- 130.** 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.
- 131.** Warburg, O., Christian, W., 1941. Isolierung und Kristallinsation des Garungsferments Enolase. *Biochemische Zeitschrift* 310: 384-421.
- 132.** 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.
- 133.** Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 134.** Sobek, H., Gorich, H., 1988. Purification and characterization of a heat-stable esterase from the Thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemical Journal* 250: 453-458.
- 135.** 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.
- 136.** Basha, S.M., 1997. Separation of peanut proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 400-402.
- 137.** 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: 755-759.

- 138.** 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.
- 139.** 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.
- 140.** Namboodiri, V. M. H., Chattopadhyay, A., 2000. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids* 35: 495-502.
- 141.** Abdou, M. A., 2003. Purification and partial characterization of psychrotrophiz *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science* 86: 127-132.
- 142.** 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.
- 143.** 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.
- 144.** 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.
- 145.** 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.

- 146.** Haas, M.J., Cichowicz, D.J., Dierov, J.K., 2001. Lipolytic activity of Californica-laurel (*Umbellularia Californica*) seeds. *Journal of American Oil Chemist's* 78 (10): 1067-1071.
- 147.** 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.
- 148.** Sanz, L. C., Olais, J. M., 1990. Characterization of lupin seed lipase. *Food Chemistry* 37: 221-228.
- 149.** Dharmsthiti, S., Ammaranond, P., 1997. Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 26: 111-116.
- 150.** Lotrakul, P., Dharmsthiti, S., 1997. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *Journal of Biotechnology* 54: 113-120.

ÖZGEÇMİŞ

06.02.1985 tarihinde Eskişehir İli'nde doğdu. İlkokul öğrenimini Ziya Gökalp İlkokulu, ortaokul öğrenimini 19 Mayıs Ortaokulu'nda, lise öğrenimini Eskişehir Atatürk Lisesinde tamamladı. 2003 yılında girdiği Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünden 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2015 yılında Açıköğretim Fakültesi İşletme Bölümünden mezun oldu.