

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**KAĞIZMAN CEVİZİNDEN (*Juglans regia* L.) LİPAZIN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Yeşim AYDIN DURSUN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Onur ATAKİŞİ**

**NİSAN-2016  
KARS**

**Bu tez çalışması 2014-FEF-46 numaralı proje ile BAP tarafından desteklenmiştir.**

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**KAĞIZMAN CEVİZİNDEN (*Juglans regia* L.) LİPAZIN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Yeşim AYDIN DURSUN  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Onur ATAKIŞI**

**NİSAN – 2016  
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Yeşim AYDIN DURSUN'un Prof. Dr. Onur ATAKIŞI'nin danışmanlığında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**Kağızman Cevizinden (*Juglans Regia L.*) Lipazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy **birliği** ile kabul edilmiştir.

01/06/2016

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan : Prof. Dr. Ayla ÖZCAN

Üye : Prof. Dr. Onur ATAKIŞI

Üye : Yrd. Doç. Dr. Arife Pınar EKİNCİ



Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ...../...../2016. gün ve ...../.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Özlem GÜRSOY KOL

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmamızdaki amaç Kağızman bölgesinde yetişen Kağızman cevizinin (*Juglans regia* L.) lipaz içeren diğer bitkisel türler ile, substart spesifikliği, optimum pH, optimum sıcaklık, iyonik şiddet, molekül kütlesi gibi özelliklerinin karşılaştırmasının yapılmasıdır.

Bu tez çalışmasına katkıda bulunan başta danışman hocam Prof. Dr. Onur ATAKİŞİ'ye, emeği geçen ve çalışmada bizden yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr Arife Pınar EKİNCİ ve Özlem FAİZ, ultraviyole spektrofotometre ölçümlerinin alınmasında Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Fikret AKDENİZ'e yine çalışmada yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans öğrencisi Yonca YILMAZ ve Soner ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmada benim için maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve zaman ayıran değerli aileme, öncelikle eşim İnan DURSUN, babam Mehmet Rüştü AYDIN, annem Sevgi AYDIN, ablam Zehra AYDIN, kardeşim Ali AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Kars- 2016

Yeşim AYDIN DURSUN

## İÇİNDEKİLER

<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>III</b>
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>V</b>
<b>ÖZET</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>X</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>XI</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>XII</b>

<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ENZİMLER</b>	<b>1</b>
1.1.1. Enzim Aktivite Birimleri	1
1.1.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	2
1.1.3. Michaelis-Menten Denklemi	3
1.1.4. Lineweaver-Burk Grafiği	4
<b>1.2. Lipaz</b>	<b>4</b>
1.2.1. Lipazların Reaksiyonları	5
1.2.2. Lipaz Çeşitleri	6
1.2.3. Lipazların Yapısı	6
1.2.4. Lipaz Kaynakları	7
1.2.5. Lipazın Endüstrideki Uygulamaları	7
<b>1.3. Enzimlerin Saflaştırılması ve Kullanılacak Yöntemler</b>	<b>8</b>
1.3.1. Çöktürme	9
1.3.2. Kromatografik Yöntemler	9
1.3.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografisi	9
1.3.2.2. İyon Değişim Kromatografisi	10
1.3.2.3. Afinite Kromatografisi	11
1.3.2.4. Doğal Elektrophorez	12
1.3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	13

1.4.	Ceviz ve Beslenmedeki Rolü	13
<b>2.</b>	<b>MATERYAL ve METOT</b>	<b>16</b>
2.1	Materyal	16
2.2	Metot	16
2.2.1.	Kullanılan Cihazlar	16
2.2.2.	Kullanılan Kimyasallar	17
2.2.3.	Kullanılan Çözeltiler	17
2.2.3.1.	Protein Tayini İçin Gerekli Çözeltiler	17
2.2.3.2.	Aktivite Tayini İçin Gerekli Çözeltiler	18
2.2.3.3.	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Jel Elektroforezi Çözeltileri	19
2.2.3.4.	Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler	19
2.2.4.	Deneysel Çalışmalar	20
2.2.4.1.	Yağsızlaştırma	20
2.2.4.2.	Ham Ekstarktın Hazırlanması	21
2.2.4.3.	Lipaz Aktivitesinin Tayini	23
2.2.4.4.	Lipaz Enziminin Saflaştırma Basamakları	24
2.2.4.4.1.	Amonyum Sülfatla Çöktürme	24
2.2.4.4.2.	Diyaliz	25
2.2.4.4.3.	Jel Filtrasyon Kromatografisi	25
2.2.4.5.	Protein Tayini	25
2.2.4.6.	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Jel Elektroforezi	26
2.2.4.7.	Kağızman Cevizi Lipazının Biyokimyasal Karakterizasyonu	28
2.2.4.7.1.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	28
2.2.4.7.2.	Optimum pH'ın Belirlenmesi	28
2.2.4.7.3.	İyonik Şiddeti	28
2.2.4.7.4.	$K_m$ ve $V_{maks}$ Değerlerinin Belirlenmesi	29
2.2.4.7.5.	Cevizden Saflaştırılan Lipazın Molekül Kütlesinin Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar	29
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>30</b>
3.1.	Yağın Uzaklaştırılması ve Ham Ekstarktın Elde Edilmesi	30
3.2.	Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	30
3.3.	Saflaştırma Aşamaları	31

3.3.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme	31
3.3.2. Jel Filtrasyon Kromatografisi	31
3.3.3. Kağızman Cevizinden Saflaştırılan Lipazın Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları	33
3.3.3.1. Optimum Sıcaklık İle İlgili Bulgular	33
3.3.3.2. Optimum pH İle İlgili Bulgular	34
3.3.3.3. Optimum İyonik Şiddet İle İlgili Bulgular	34
3.3.3.4. Lipaz Enzimin $K_m$ ve $V_{maks}$ Değerinin Bulunması	35
3.3.3.5. Elektroforez ve Gümüş Nitratla Boyama	37
3.3.3.6. SDS-PAGE İle Molekül Kütlesinin Belirlenmesi	38
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>39</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>42</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>47</b>

## ÖZET

Bu çalışmada Kağızman cevizinden (*Juglans regia* L) lipazın saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Kağızman cevizi için yapılan yağ uzaklaştırma işleminin ardından amonyum sülfatla çöktürme, diyaliz ve jel filtrasyon yöntemleri kullanılarak lipaz yaklaşık olarak 3,53 kat saflaştırıldı. Yapılan her aşama sonrasında Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bu işlemin ardından ise spektrofotometrik olarak aktivite ölçümü yapıldı. Saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH'sının 9,5 ve optimum sıcaklığı 40 °C olarak molekül kütlesi ise yaklaşık olarak 67,6 kDa belirlendi.

Lipaz enzimi için optimum iyonik şiddet 900 mM ve glisin 9,5 tamponu olarak belirlendi. Substrat olarak *p*-nitrofenil oktanoat ve *p*-nitrofenil bütirat kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.  $K_m$  değeri *p*-nitrofenil oktanoat için 0,21 mM, ve *p*-nitrofenil bütirat için 0,0558 mM olmakla beraber  $V_{maks}$  değeri *p*-nitrofenil oktanoat için 1.3 U/mg ve *p*-nitrofenil bütirat için ise 0,46 U/mg olarak ortaya konuldu.

Sonuç olarak Kağızman cevizinden (*Juglans regia* L.) saflaştırılan lipazın optimum pH, optimum sıcaklık, iyonik şiddet, molekül kütlesi gibi parametreleri incelendi. İncelenen bu parametrelerin lipaz içeren diğer bitkisel kökenli türlerden farklı olduğu belirlendi.

**2016, 48 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Kağızman Cevizi, lipaz, saflaştırma ve karakterizasyon



## ABSTRACT

The aim of this study was to purification and characterization of lipase enzyme from Kağızman walnut (*Juglans regia* L). After removal of oil from walnut, approximately 3,53 times purification was performed by precipitation with ammonium sulfate, dialysis and gel filtration techniques. After each step protein analysis was conducted by Lowry method. Then, activity analysis was done spectrophotometrically. The optimum pH and temperature of purified lipase enzyme were obtained as 9,5 and 40 °C, respectively. In addition, molecular mass was calculated about 67,6 kDa.

The ionic strength of lipase enzyme was observed as 9,5 and 900 mM and it was determined as glycine tampon.  $K_m$  and  $V_{max}$  values were calculated by using *p*-nitrophenyl octanoate and *p*-nitrophenyl butyrate as substrates. While  $K_m$  values for *p*-nitrophenyl octanoate and *p*-nitrophenyl butyrate were obtained as 0,21 mM and 0,0558 mM,  $V_{max}$  values for *p*-nitrophenyl octanoate and *p*-nitrophenyl butyrate were calculated as 1,3 U/mg and 0,46 U/mg, respectively.

Consequently, optimum pH, optimum temperature, ionic strength, molecular mass of lipase which was obtained from Kağızman walnut (*Juglans regia* L.). It was determined that these parameters were different from other species with vegetal origin which contain lipase.

**2016, 48 pages**

**Key words:** Kağızman walnut, lipase, purification and characterization.

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

IUB	: Uluslararası Biyokimya Birliği
U	: Uluslararası Birim
$V_0$	: İlk Hız
$V_{max}$	: Maksimum Hız
$K_m$	: Michealis Sabiti
[S]	: Substrat Konsantrasyonu
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
BSA	: Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumine)
TEMED	: Tetrametil Etilen Diamin
$X_e$	: Proteinin Yürüme Mesafesi
$X_{boya}$	: Boyanın Yürüme Mesafesi
$(K_i)$	: Enzim İnhibitör Kompleksi Ayrışma Sabiti

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No	
Şekil 1.1.	Lineweaver-Burk grafiği	4
Şekil 1.2.	Trigliseridlerin gliserol ve yağ asisidine hidrolizi	5
Şekil 1.3	Jel filtrasyon kromatografisi şematik gösterimi	10
Şekil 1.4.	İyon değişim kromatografisi şematik gösterimi	11
Şekil 1.5.	Afinite kromatografisi şematik gösterimi	12
Şekil 2.1.	Cevizde yağsızlaştırma işlemi	21
Şekil 2.2.	Cevizden fosfat tampon ile ham enzimin elde edilmesi	22
Şekil 2.3.	Substrat-Aktivite ilişkisi	23
Şekil 2.4.	Enzim-Aktivite ilişkisi	24
Şekil 3.1.	Standart protein grafiği	30
Şekil 3.2.	Jel filtrasyon sonrasında tüp sayıları ve absorbans değerleri	31
Şekil 3.3.	Tüp sayısı ve aktivite	32
Şekil 3.4.	Optimum Sıcaklık Grafiği	33
Şekil 3.5.	Optimum pH grafiği	34
Şekil 3.6.	İyonik şiddet grafiği	35
Şekil 3.7.	Lipaz için p- nitrofenil oktanat substratı ile Lineweaver-Burk grafiği	35
Şekil 3.8.	Lipaz için p-nitrofenil bütirat substratı ile Lineweaver-Burk grafiği	36
Şekil 3.9.	Lipaz enziminin SDS-PAGE gümüş boyama fotoğrafı	37
Şekil 3.10.	SDS-PAGE sonrası çizilen log Mk-Rf grafiği	38

## TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1.1. Lipazların Endüstri Alanında Uygulamaları	8
Tablo 2.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları	16
Tablo 2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Markaları	17
Tablo 2.3. Lowry Yöntemi İle Protein Tayini	26
Tablo 2.4. SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Bileşenler ve Oranları	27
Tablo 3.1. Cevizden Saflaştırılan Lipaz Enzimine Ait Saflaştırma Tablosu	33

# 1. GİRİŞ

## 1.1. ENZİMLER

Enzimlerin insanlar tarafından kullanımı medeniyetin eski zamanlarına dayanmaktadır. İkel toplumlarda insanlar bilmeyerek de olsa bazı tür yiyecek ve içeceklerin, post ve deri giysilerin üretiminde enzimlerden yararlanmışlardır. [1].

Günümüzde yaklaşık olarak 4000 enzim çeşidi bilinmekte ve bunlardan 200 kadarı ticari amaçlarla kullanılmaktadır. Kullanılan enzim çeşitlerinin birçoğunu mikrobiyal kaynaklı enzimler oluşturmaktadır [2, 3].

Organizmada meydana gelen reaksiyonlar biyolojik katalizörler olarak tanımlanan enzimler tarafından gerçekleştirilir. Substratlar enzimlerin üst kısmında yer alan aktif bölge adı verilen yüzeye bağlanırlar ve enzim-substrat kompleksi oluşur. Her enzim molekülü bir saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne çevirebilmektedir. Her enzimin etkileşebileceği bir ya da birkaç tane substrat vardır ve böylelikle kendilerine özgü substratlarla etkileşirler [4].

### 1.1.1. Enzim Aktivite Birimleri

Enzim aktivite birimi Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından aktivite birimlerinde karşılaştırma yapılabilmesi için “Uluslararası Birim” (U) şeklinde tanımlanmıştır.

**Spesifik Aktivite:** Dakikada 1 mg enzim ile dönüşüme uğrayan substratın  $\mu\text{mol}$  cinsinden miktarı olarak tanımlanır.

**Ünite (U):** Standart koşullar içerisinde 1 dakikada 1  $\mu\text{mol}$  substratı ürüne çeviren enzim miktarı olarak tanımlanır.

**Turnover Sayısı:** 1 dakikada enzim tarafından dönüşüme uğrayan substrat miktarıdır.

**Katal:** 1 saniyede enzim tarafından ürüne dönüştürülen 1 mol substrat miktarı olarak tanımlanır [5].

### 1.1.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, zaman ve reaksiyon ürünleri olarak sıralanabilir.

**pH'in Etkisi:** Enzimlerin kendilerine özgü yüksek aktivite gösterdikleri belirli pH aralıkları vardır ve bu aralığa optimum pH denir [6].

**Sıcaklığın Etkisi:** Enzimler yüksek sıcaklık söz konusu olduğunda denatüre olurlar. Enzimlerin bozulmamaları için hangi sıcaklık aralığında çalıştıkları tespit edilmelidir. Uluslararası Biyokimya Birliği reaksiyon sıcaklığını 25 °C olarak belirleyerek ölçümleri bu sıcaklığa göre yapmaktadır [6].

**Zamanın Etkisi:** Enzimlerin etkisiyle reaksiyon hızında zamanla azalma meydana gelir. Reaksiyon sonucunda meydana gelen ürünlerin birleşmesi ile ters yönde bir reaksiyon meydana gelmesi enzimin aktifliğini yitirmesine ve substratın bitmesine neden olur. Böylelikle reaksiyon hızı azalır [6].

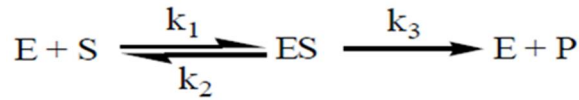
**Reaksiyon Ürünlerinin Enzim Aktivitesine Etkisi:** Reaksiyon ürünlerinde meydana gelen artış reaksiyon hızında azalmaya neden olur. Bunun sebebi ise meydana gelen ürünün enzime substrattan daha fazla tutunmasından kaynaklanmaktadır [7].

**Enzim Konsantrasyonunun Etkisi:** Reaksiyonun hızı substrat miktarı ile doğru orantılı olarak değişir. Enzim konsantrasyonu arttırıldığında reaksiyon hızında da buna bağlı olarak artış görülür [7].

**Substrat Konsantrasyonunun Etkisi:** Düşük substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızında azalma görülürken konsantrasyon artışı ile reaksiyon hızında da artış görülür. Yüksek konsantrasyonda zaman geçtikçe reaksiyon hızı sabitlenir [8].

### 1.1.3. Michaelis-Menten Denklemi

Michaelis-Menten reaksiyon olarak basit bir reaksiyon mekanizması ile denkleme açıklama getirmiştir. Bir tek substrat molekülünü içeren denklem [4].



**S:** Substrat

**E:** Enzim

**ES:** Enzim substrat

**P:** Ürün

**k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, k<sub>3</sub>:** Hız sabitleri

Michaelis-Menten denklemi ise; Reaksiyondaki hız artış ya da azalışının substratın konsantrasyonu ile nasıl değişkenlik gösterdiğini açıklamaktadır. Denklem ise aşağıdaki gösterilmiştir [4].

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

**V<sub>0</sub>** = ilk hız

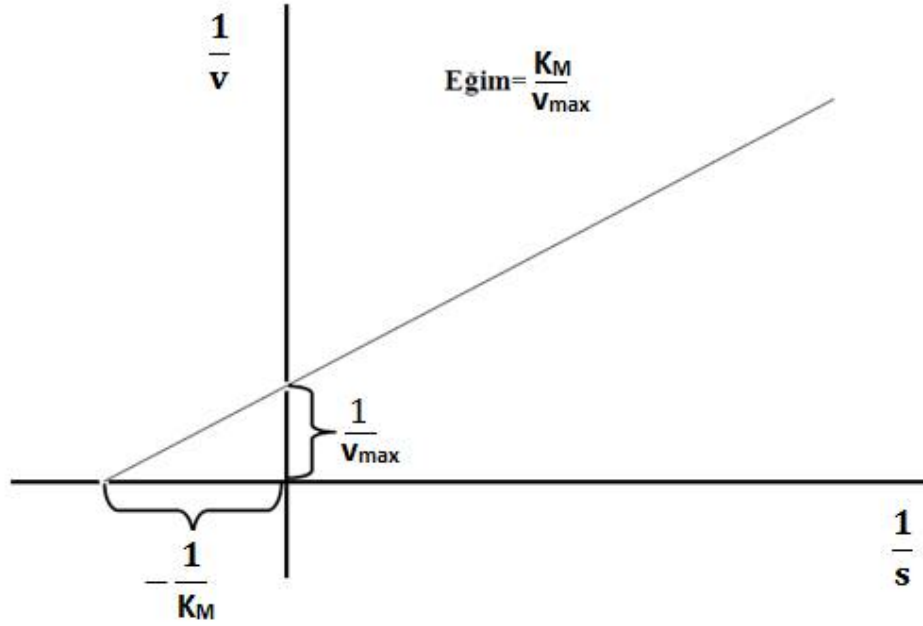
**K<sub>m</sub>** = Michealis Menten sabiti = (k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub>) / k<sub>1</sub>

**V<sub>maks</sub>** = maksimum hız

**[S]** = substrat konsantrasyonu

#### 1.1.4. Lineweaver–Burk Grafiği

Lineweaver-Burk grafiği ile sabit olan substratın en az 5 farklı konsantrasyonunun kullanılması ile  $1/V-1/S$  grafikleri çizilir (Şekil 1.1). Bu grafiğin kesişim noktaları göz önüne alınarak grafik hakkında yorum yapılır [9].

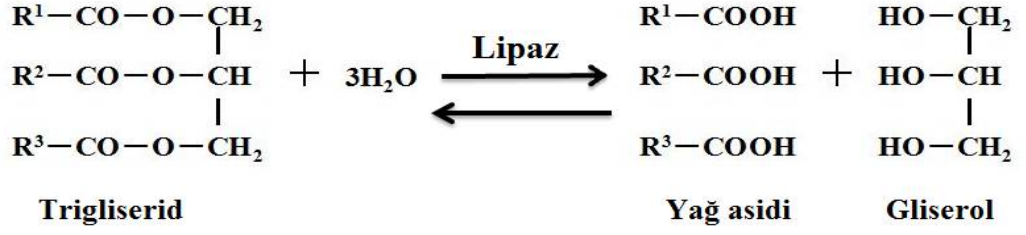


Şekil 1.1. Lineweaver-Burk grafiği [9].

#### 1.2. LİPAZ

Lipazlar (E.C.3.1.1.3) triaçilgliserollerin sulu ortamda serbest yağ asitleri ve gliserine kadar parçalanmasını katalizler (Şekil 1.2) [10, 11]. Lipazlar için yapılan enzim sıralaması öncelikle hidroazlar (E.C.3.), ester bağlarını koparanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) en son olarak da triaçilgliserol lipazlardır [11].





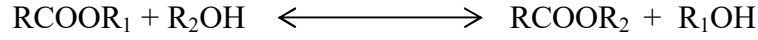
Şekil 1.2. Trigliseridlerin gliserol ve yağ asidine hidrolizi [12].

### 1.2.1. Lipazların Reaksiyonları

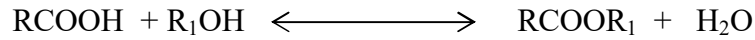
Lipazlar tarafından katalize uğrayan reaksiyonlar sentez ve hidroliz reaksiyonları olmak üzere iki kısma ayrılır. Sentez reaksiyonları ise kendi arasında alkoliz, esterifikasyon, interesterifikasyon, asidoliz ve aminoliz olarak ayrılmaktadır [13].

#### 1) Sentez

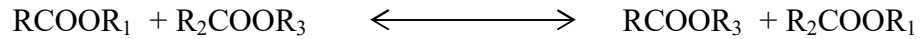
- Alkoliz



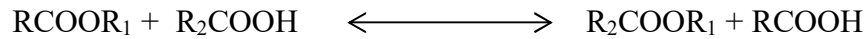
- Esterifikasyon



- İnteresterifikasyon

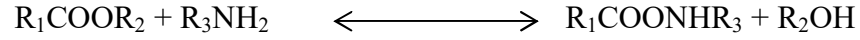


- Asidoliz

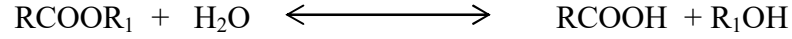


-

- **Aminoliziz**



## 2.) **Hidroiz**



### 1.2.2. Lipaz Çeşitleri

**Spesifik Olmayan Lipazlar:** Bu grup içerisinde yer alan lipazlar, triaçilgliserollerin her konumunda açıl gruplarını koparabilir. Reaksiyon durduğunda gliserin ve yağ asidi meydana gelirken bunun yanı sıra ara ürün olarak da mono ve di-açilgliseridler oluşur [14].

**Bağlarına (1-3) Spesifik Lipazlar:** Bu grupta yer alan lipazlar 1-3 pozisyonlarından spesifik olup reaksiyon durduğunda yağ asidi ve bunun yanı sıra 2-monoaçilgliserol ve 1,2 (2,3)- diaçilgliserol meydana gelir. Yani 1-3 bağlarına spesifik olan lipazlar trigliseridleri serbest yağ asitleri ve gliserine ayırır [15].

**Yağ Asidi Spesifik Lipazlar:** İstenilen amaç doğrultusunda triaçilgliserol elde edebilmek için yağ asidi spesifik lipazların iç esterleşme reaksiyonlarında kullanılması gerekmektedir [16].

### 1.2.3. Lipazların Yapısı

Üç boyutlu yapıya sahip lipazlar farklı kaynaklardan da saflaştırılmış olsa yapı bakımından birbirlerine benzerlik göstermektedir. Lipazların yapılarında  $\beta$ - bandı olduğu ve  $\alpha/\beta$  hidrolaz yapısına sahip proteinlerin ise yapısına birbirlerine paralel olan  $\beta$

kıvrımlarının  $\alpha$  yapıları ile ayrıldığı gözlemlenmiştir [17]. Lipazların aktif bölgesi  $\beta$  ve  $\alpha$  bandı arasında yer almakta ve bu bölgede üçlü gruplar bulunmaktadır [18].

#### 1.2.4. Lipaz Kaynakları

Lipazlar bitki ve hayvan dokularından ekstraksiyonla ya da mikro organizmalar ve funguslardan fermentasyonla üretilir. C ve N kaynaklarının türü ve derişimi; pH, sıcaklık, metal iyonları ve çözünmüş oksijen derişimi lipaz üretiminde önemlidir [19].

#### 1.2.5. Lipazın Endüstrideki Uygulamaları

Lipazlar gıda, kozmetik, farmasötiklerin sentezi, kâğıt imalatı ve deterjan gibi birçok endüstriyel kullanım alanına sahiptir.

- **Gıda Endüstrisinde Lipazlar:** Gıda endüstrisinde lipitlerde farklılığa yol açarak trigliserollerde bulunan yağ asidi zincirlerinin konumundaki değişime neden olan ve lipidlerin özelliklerinin değişmesini sağlayan lipazlar kullanılır [20].
- **Kozmetik Endüstrisinde Lipazlar:** Kozmetik endüstrisinde kişisel bakım ürünlerinin, kokulu bileşiklerin üretiminde yararlanılan lipazlardır [21].
- **Organik Sentezlerde Lipazlar:** Organik sentezlerde kullanılan lipazlardır. Sentetik kimyada substrat farklılıkları göz önüne alınmalıdır [22].
- **Kağıt Endüstrisinde Lipazlar:** Lipazın bir diğer uygulama alanı da kağıt endüstrisinde üretilen kağıt hamurundan katranın ayrılmasında kullanılmasıdır [23].

- **Deterjan Endüstrisinde Lipazlar:** Lipaz ilk kez 1913 yılında çamaşır deterjanının daha güçlü bir şekilde etki göstermesi için kullanılmıştır. 1994 yılında ise ilk ticari rekombinant lipaz olan *Lipolase* piyasaya sunulmuştur. Lipazlar ticari anlamda çamaşırhaneler ve evlerdeki bulaşık makinalarında deterjanlara kimyasal bağları parçalaması amacıyla ilave edilir. Yılda 13 milyar ton deterjan içerisine 1000 ton lipaz ilave edilmektedir [23, 24]. Tablo 1.1’de lipazların endüstri alanındaki kullanım alanları verilmiştir.

**Tablo 1.1.** Lipazların endüstri alanında uygulamaları [25].

Endüstriyel alan	Görevi	Ürün veya Uygulama alanı
Un içeren yiyecek	Tatlandırıcı	Raf ömrünü arttırma
Deterjan	Yağ Hidrolizi	Yağ lekelerinin çıkarılması
İçecekler	Aroma arttırıcı	İçecekler
Sağlıklı yiyecekler	Transesterifikasyon	Sağlıklı yiyecekler
Balık ve et	Tatlandırıcı	Et ve balık ürünlerinde; yağın uzaklaştırılması
Kimyasal	Sentez, enantiyoseçicilik	Kiral inşa edici bloklar
Kozmetik	Sentez	Emülgatörler, nemlendiriciler
Kağıt	Hidroliz	Kağıt niteliğinin arttırılması
Gıda paketlenme	Kaliteyi arttırma	Paketleme
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon, hidroliz	Kako yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol, mono-gliseridler
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
İlaç	Transesterifikasyon, hidroliz	Özel yağlar, sindirim yardımcısı
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi, Peyniri olgunlaştırmada, tereyağının değişimi	Süt, peynir, tereyağının aroma maddelerinin gelişmesi

### 1.3. Enzimlerin Saflaştırılması ve Kullanılacak Yöntemler

Saflaştırma enzimlerin daha verimli bir şekilde kullanılmasına olanak sağlayan bir basamaktır. Genel olarak enzimlerin saflaştırılmasında çöktürme, elektroforetik ve kromatografik yöntemler kullanılır. Büyüklük ve kütle incelemesinde jel kromatografisinden, yük göz önüne alındığında iyon kromatografisi veya izoelektrik

fokuslama, biyolojik aktivite için afinite, polarite için revers faz, membran ve hidrofobik etkileşim kromatografilerinden yararlanır. Kolon kromatografi yöntemlerinin çalışma prensipleri aynıdır. İlk adımda kolonun doldurulması için sabit faz adı verilen katı gözenekli bir dolgu maddesi seçilirken daha sonraki adımda hazırlanan karışım kolona ilave edilir ve ardından hazırlanan tampon çözelti eklenir. Hazırlanan bu tamponla kolon yıkanır ve bu kısım ise hareketli faz kısmını oluşturur. Kolondan önce kolonda tutunmayan enzimler daha sonra adsorbe olanlar kolonu terk eder [26, 27, 28].

### **1.3.1. Çöktürme**

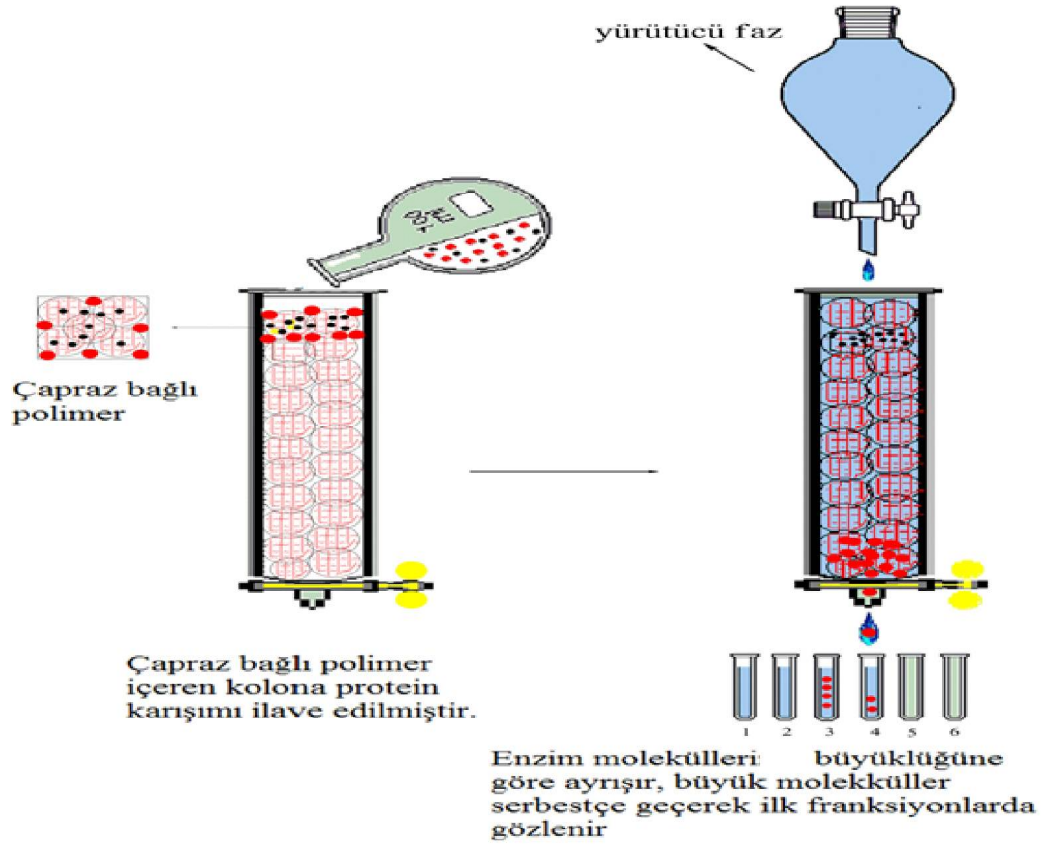
Saflaştırmanın ilk basamağında kullanılan bir yöntemdir. Saflaştırmada kullanılan çöktürme yöntemi büyük ölçüde amonyum sülfat kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Çöktürme işlemi proteinlerin çözünürlüklerinden yararlanılarak yapılmaktadır [19].

### **1.3.2. Kromatografik Yöntemler**

Kromatografi, sabit faz ile taşıyıcı faz arasında, şekil, çözünürlük, büyüklük gibi özellikleri göz önüne alınarak madde karışımlarını ayrılmasıdır [19]. Saflaştırma için kullanılacak kromatografik yöntemleri jel filtrasyon, iyon değişim ve afinite komatografisi olarak sınıflandırılabilir.

#### **1.3.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografisi**

Proteinlerin molekül büyüklüğüne göre ayrılmasını sağlayan bu yöntem elek kromatografisi olarak da bilinmektedir. Proteinler, polisakkaritler gibi moleküllerin saflaştırılması aşamasında yararlanan yöntemdir. Jelin meydana getirdiği gözeneklere bağlı olarak moleküllerin engellenmesi esasına dayanır (Şekil 1.3). Moleküllerin kolonda kalması molekül büyüklüğü ile ters orantılıdır [29].

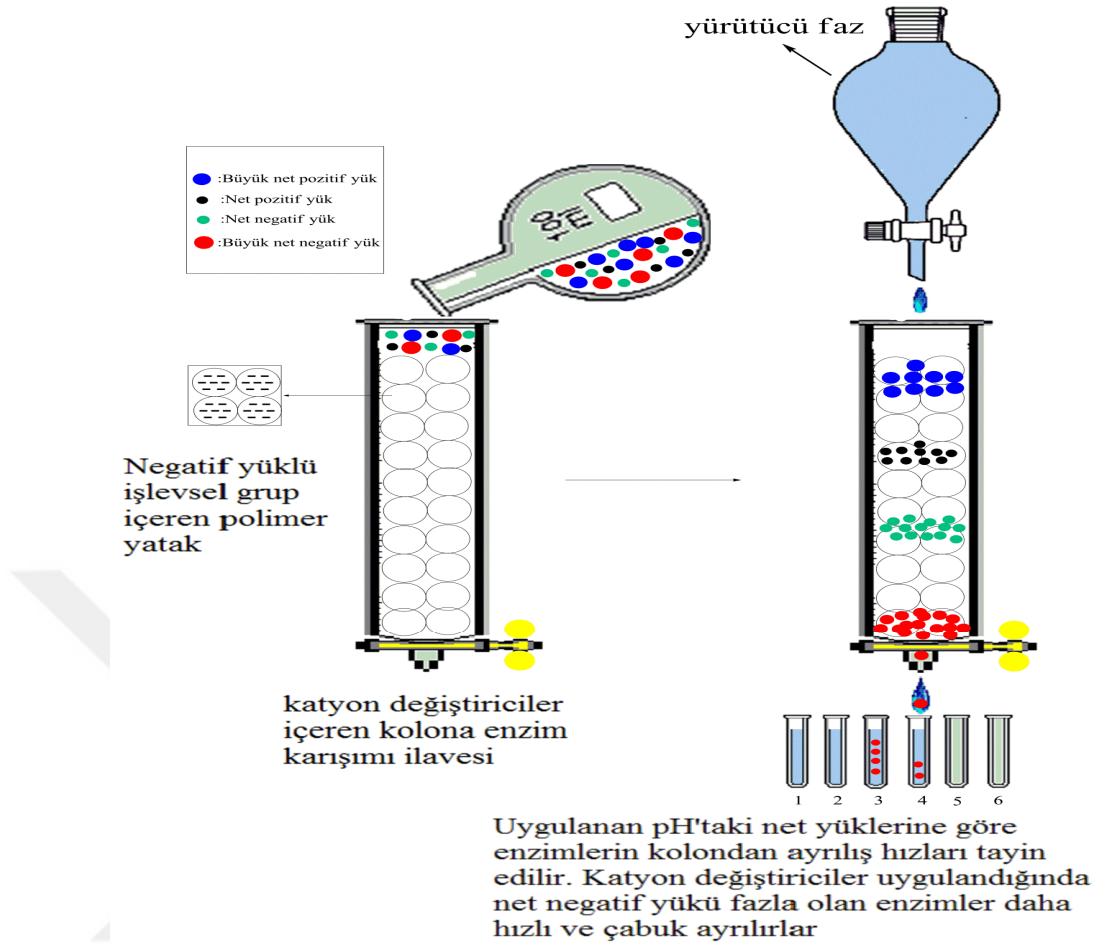


Şekil 1. 3. Jel filtrasyon kromatografisi şematik gösterimi [30].

### 1.3.2.2. İyon Değişim Kromatografisi

Elektrostatik çekim esaslı olan bu yöntemde iyon değiştiriciler kovalent bağlı yüklü gruplar ve stabil olmayan karşı iyonlar olmak üzere ikiye ayrılır [31].

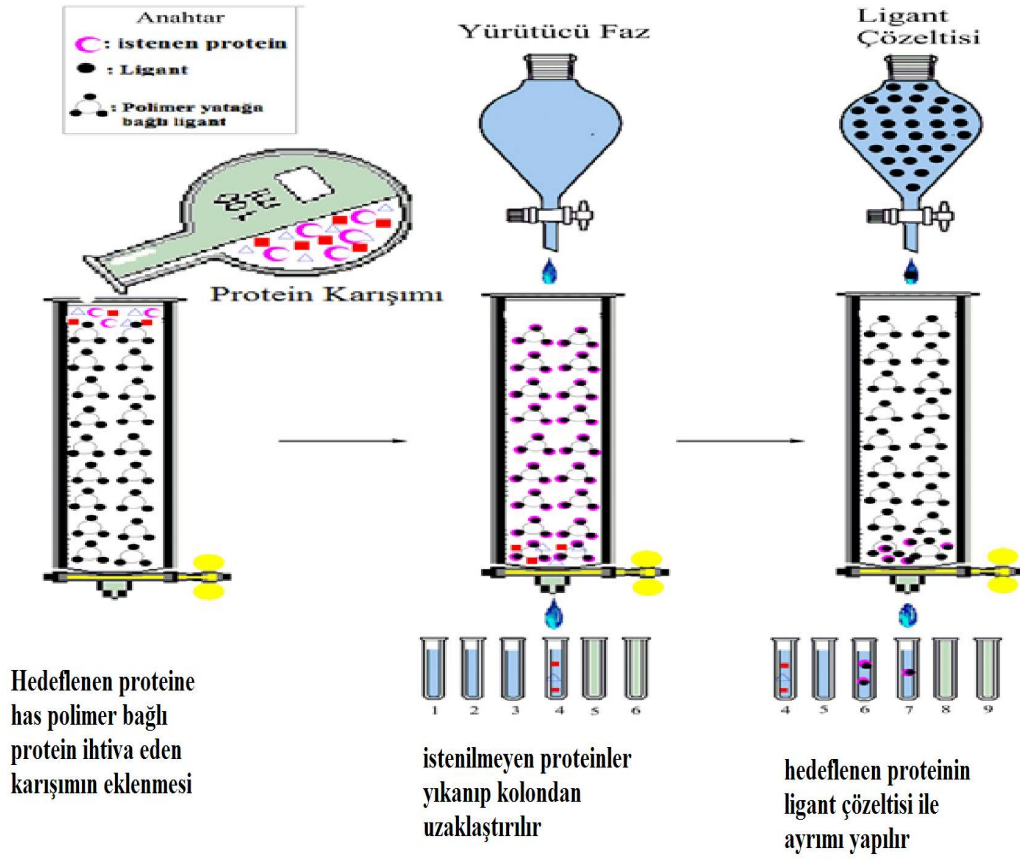
İyon değiştiricide dolgu olarak kullanılacak madde pozitif olan gruplar ile bağlı ise anyon, negatif yüklü gruplar bağlı ise katyon değişim kromatografisi olarak adlandırılır (Şekil 1.4). Alüminyum silikatlar, sentetik reçineler gibi dolgu maddeleri mekanik kararlılık, biyolojik maddelere karşı davranışlarını belirlemeyi sağlar. İlk kullanılan iyon değiştiricileri Sephadex, Sepharose ve Sephacel olarak sıralayabilir [32].



Şekil 1.4. İyon değişim kromatografisi şematik gösterimi [30].

### 1.3.2.3. Afinite Kromatografisi

Proteinin bir moleküle bağlanma spesifikliğinden yararlanılarak yapılan kromatografi yöntemiştir. İstenilen proteinler liganda bağlı iken istenmeyen proteinler yıkama işlemi yapılarak kolondan ayrılır ve bu işlemin ardından serbest ligand içeren çözeltili yardımıyla istenilen proteinler kolondan ayrılırlar (Şekil 1.5). Bu şekilde saf halde istenilen protein elde edilmiş olur [30].



Şekil 1.5. Afinite kromatografisi şematik gösterimi [30].

#### 1.3.2.4. Doğal Elektroforez

Elektroforez belirli bir yüke sahip proteinlerin elektrik alanında ayrılması esasına dayanan önemli bir saflaştırma yöntemidir. Belirli olan hızlarda çözünmüş olan moleküllerin sahip oldukları elektrik yüklerinin kütlelerine oranlanmasıyla elektriksel alanda hareket etme prensibine dayanır. Proteinler, amino asitler ve nükleik asitler yapılarında iyonize olan gruplar barındırdığından elektrik yüküne sahip olan katyonlar ve anyonlar bir pH çözeltisi içinde bulunurlar. Yüklü olan bu partiküller elektrik alanın yapmış olduğu etki ile sahip oldukları net yüklere bağlı olarak katoda ve anoda doğru hareket ederler [33].



### 1.3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofözezi (SDS-PAGE) yaygın olarak kullanılan ve protein karışımlarını özellikleri bakımından incelenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu teknikte proteinlerin en iyi şekilde jel içerisinde koşturulması için ve daha iyi bir ayırımın gerçekleştirilebilmesi için proteinler arasında var olan elektriksel yük farkının ortamdaki uzaklaştırılması aynı zamanda proteinlerin bozunması ve lineer halde olması gerekir. Proteinlerin bozunması işlemi ve elektriksel yükün ortamdaki uzaklaştırılması işlemi 2-merkaptöetanol, üre, SDS ve ısı ile denatüre işlemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir [34].

### 1.4. Ceviz ve Beslenmedeki Rolü

Geçmiş zamanlardan itibaren bilinen ve üretimi süren meyve çeşidi olarak bilinir. Ağaç üzerinde yetişen ceviz yeşil kabuk, sert kabuk ve iç meyvesinden meydana gelir. Toplamda dünyada 18 tür ceviz bulunur.

Bitkisel olarak cevizin özellikleri,

- Yaprak bakımından bileşik yaprak türündendir.
- Toplamda üç çeşit tomurcuk yapısı bulunur.
- Rüzgâr vasıtasıyla döllenme gerçekleşir.
- Meyveler senelik sürgünlerle meydana gelir [35].

Ceviz büyük oranda doymamış yağ asidi içermektedir. İçeriğinde folik asit, B6 vitamini ve çinko, demir, magnezyum, fosfor, demir içermektedir. Ceviz aynı zamanda linoleik ve linolenik asit bakımından zengindir [35].

Ceviz ağacı hızlı bir şekilde büyür ve 25-30 metre yüksekliğine ulaşabilir. Fazla uzayan cevizlerin budanması ve ilaçlanması zorlaşacağı için meyve için yetiştirilen ağaçların fazla uzamaması gereklidir.

Cevizdeki kökler ise, kazık kök olup derinlere kadar iner. Aynı zamanda bolca kılcal köke sahip olan ceviz yaklaşık 2 veya 4 metre derinliklere kadar inebilir.

Cevizdeki dallar ise zeytin yeşiline benzeyen bir renge sahiptir ve orta kısmında yumuşak bir öz içeren sürgünler bulunmaktadır.

Cevizde dallanma 1-2 metre üst kısımda olur. Yaklaşık olarak 5-6 metre civarında bir genişleme meydana gelebilir. İlk yıllarında daha düzgün bir yapıya ve daha açık renge sahip olan gövde yıllar geçtikçe koyulaşmaya başlar ve gövde yüzeyinde uzun bir şekilde çatlaklıklar meydana gelir.

Koyu renge sahip olan gözler, dalların uç kısmında bulunmaktadır. Toplamda üç göz bulunur. Bu gözler boyunlu, düğme ve nokta olmak üzere üç çeşit olup nokta göz her zaman bulunmayabilir.

Sayı olarak 5 ile 13 arasında arasın da değişen yaprakçık bir sap üzerinde yer alır ve buda yaprak olarak adlandırılır. Boyutları 6 ile 12cm arasında değişir. Parlak ve yeşil renge sahiptir. Dişi ve erkek çiçekler aynı ağaç üzerinde aynı yerde bulunmazlar [36].

Cevizin çevreyle ilgili özellikleri iklim ve toprak başlığı altında aşağıdaki gibi açıklanmıştır [37].

**İklim:** Yazları ve ilkbahar aylarında yeterli sıcaklık alarak büyüme olgunlaşma gerçekleşir. Bu sıcaklık yaklaşık olarak 25 °C ile 30 °C arasında değişir. Kış ayında ise yeterli soğuklama ihtiyacını karşılar. Ceviz -20'den daha düşük sıcaklıklarda dayanıksız olsa da -40 °C'ye kadar dayanıklı türlere de sahiptir. Ceviz yetiştiriciliğinde yağışın düzenli olması önemlidir çünkü çiçeklenme döneminde meydana gelen rüzgâr ve aşırı yağmur döllenme ve tozlanmayı olumsuz etkiler [37].

**Toprak:** Toprağın yaklaşık olarak 2 veya 4 metre kadar derinine inebilen köklere sahip olan ceviz toprak derinliğin az olması durumunda sorun doğurabilmektedir. Sağlıklı bir ceviz yetiştiriciliği için toprak derinliğinin en az 2 metre civarında olması gerekir ve aynı zamanda toprak yüzeyinin geçirgen olmasına da özen gösterilmelidir. Bu özelliklerin yanı sıra ceviz yetiştiriciliğinde pH'da önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden

pH'nın 6-7 arası olmasına özen gösterilip aynı zamanda da toprağın su tutma oranına ve tuz oranına dikkat edilmesi gerekir [37].

Cevizde bulunan ve doymamış yağ sınıfında yer alan linoleik ve alfa-linolenik yağ asitleri insan sağlığı için önem taşımaktadır. Bu asitlerden linoleik asitin linolenik asite oranı ise 4:1 olup bu mükemmel denge olarak adlandırılmaktadır.

Atardamarlarda iltihaplanmayı, kanda pıhtılaşmayı engeller ve aynı zamanda kolestrolü düşmesini sağlayarak kalp sağlığını korur. Bu işlevlerinin yanında egzama hastalığına iyi gelir ve yaraları iyileştirir. Cevizdeki besin değeri bir hayli yüksek olduğundan beyin için oldukça önemlidir [35].

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak Kağızman yöresinde yetişen ekim-kasım aylarında hasat edilen kabuklu ceviz kullanıldı.

### 2.2. Metot

#### 2.2.1.Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar, üretici firmaları ile beraber Tablo 2.1’de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları.

<b>Kullanılan Cihaz Adı</b>	<b>Marka Adı</b>
Soğutmalı santrifüj	Hermle Z 323 K (Germany)
Spektrofotometre	Beckman Coulter
pH Metre	Thermo Scientific Orion Star A211
Elektroforez	BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	Fisons Whirlimixer
Hassas terazi	Gec avery
Jel filtrasyon kolonu	Sigma
Otomatik pipet	Eppendorf
Çalkalayıcı	Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	Chilten Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	Nüve
Kar makinesi	Scotsman AF-20
Buz dolabı	Arçelik
Güç kaynağı	1-Bio Rad Power Pac 3000 2- Apparatus Corporation EC/35

### 2.2.2. Kullanılan Kimyasallar

Kağızman cevizinden (*Juglans regia* L.) lipazın saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışması sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** Çalışmada kullanılan kimyasallar ve markaları.

Firma Adı	Kimyasal Adı
Sigma	Aseton, Asetonitril, p-Nitrofenil bütirat, p-Nitrofenil oktanoat, Tris-Base, Amonyum sülfat, Sodyum dodesil sülfat, TEMED, Sodyum hidroksit, N,N bis akrilamid, Sığır serum albümini (BSA), Sefhadeks G-100, Diyaliz Torbası, Sodyum asetat, Asetik asit, Sodyum tiyosülfat, Glutaraldehit, Gliserin, Formaldehit, Amonyum Persülfat, $\beta$ -merkaptotanol, Bromtimol, Hidroklorik asit.
Fermentas	Protein marker
Daymn	Gümüş nitrat
Merck	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Na-K, $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , $\text{NaH}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Etanol
Fluka	Folin reaktifi

### 2.2.3. Kullanılan Çözeltiler

#### 2.2.3.1. Protein Tayini İçin Gerekli Çözeltiler

**1. Lowry A çözeltisi (0,1 N NaOH ,% 2 (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ):** 0,4 g NaOH ve 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saf su içerisinde çözülüp, hacim 100 mL tamamlandıktan sonra çözelti  $+4^\circ\text{C}$  'de saklandı.

- 2. Lowry B çözeltisi (% 1'lik  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ):** 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  saf suda çözülüp, hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve  $+4^\circ\text{C}$  'de saklandı.
- 3. Lowry C çözeltisi (% 2 Na-K çözeltisi):** 2 g Na-K tartarat saf su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 100 mL olacak şekilde tamamlandı ve  $+4^\circ\text{C}$  'de saklandı.
- 4. Lowry D çözeltisi:** Eşit miktarda Lowry B ve Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- 5. Lowry E çözeltisi:** 0,5 mL Lowry D ve 25 mL Lowry A karıştırılması ile hazırlandı.
- 6. Sığır serum Albumin çözeltisi (1 mg/mL):** 5 mg sığır serum albümin saf suda çözülüp hacmi 5 mL olacak şekilde tamamlandı ve  $+4^\circ\text{C}$  'de saklandı.
- 7. 0,1 N NaOH içinde % 0,1 (w/w) SDS çözeltisi:** 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf suda çözülerek hacmi 100 mL olacak şekilde tamamlandı  $+4^\circ\text{C}$  'de saklandı.
- 8. Folin reaktifi (v/v):** 1mL folin reaktifi 1 mL saf su içerisinde çözüldü.

#### 2.2.3.2. Aktivite Tayini İçin Gerekli Çözeltiler

- 1. Fosfat tamponu (pH:7):** 50 mM, 100 mL fosfat tamponu için  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 'dan 0,680 g , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'dan 0,427 g alınıp 100 mL su içerisinde çözüldü.
- 2. pNPO substrat (p-Nitrofenil oktanoat (kaprilat)):** 2,4  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil oktanat (Ma:265.30g/mol, d:1.095g/mL) alınıp, 1mL asetonitril içerisinde çözülerek substrat hazırlandı.
- 3. pNPB (p-Nitrofenil Bütirat):** 1,8  $\mu\text{L}$  p-nitrofenil bütirat (Ma: 209,20 g/mol, d:1,19g/mL) alınıp, 1 mL asetonitrilde çözüldü.

### 2.2.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Jel Elektrofözezi Çözeltileri

- 1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH=8,8):** 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=8,8'e ayarlanıp, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH=6,8):** 12,114 g (0,1 mol) Tris, 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH=6,8'e ayarlanıp, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 3. Numune tamponu:** 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 3 mL %10'luk SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkaptöetanol ilave edildi.
- 4. Yürütme tamponu:** 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin, 50 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %10'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 mL'ye tamamlandı.
- 5. Amonyum persülfat çözeltisi (% 10'luk):** 1 g Amonyum persülfat 9 g saf suda çözüldü.
- 6. SDS çözeltisinin (% 10'luk) çözeltisi:** 1 g sodyum dodesil sülfat 9 g saf suda çözüldü.
- 7. Akrilamid(%30) Bisakrilamid (%0,8) çözeltisi:** 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid 34,6 mL saf su içerisine eklenerek çözüldü.

### 2.2.3.4. Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler

- 1. Tespit çözeltisi:** 60 mL saf su, 30 mL %96'lik etanol, 10 mL asetik asit ilave edilmesi ile hazırlandı.

**2. Redüksiyon çözeltisi:** 4,8 g sodyum asetat, 45 mL etanol ve 80 mL saf su ilave edilip, asetik asit eklenerek 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 mL glutraldehit ilave edilip pH 6'ya getirildikten sonra hacim saf su eklenerek 150 mL'ye tamamlandı.

**3. Boyama çözeltisi:** 100 mg gümüş nitrat, 100 mL saf su içerisinde çözülerek üzerine 30 µL formaldehit ilave edildi.

**4. Yıkama çözeltisi 1:** 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su içerisinde çözülerek 120 µL formaldehit ilave edildi.

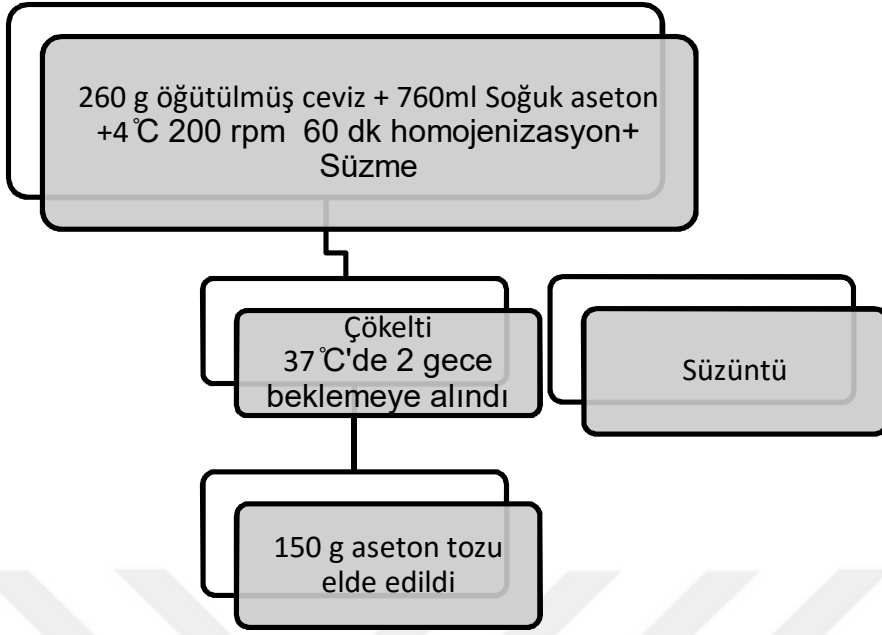
**5. Yıkama çözeltisi 2:** 1 mL gliserin ve 250 mL'lik %5'lik asetik asit karıştırılması ile hazırlandı.

## **2.2.4. Deneysel Çalışmalar**

### **2.2.4.1. Yağsızlaştırma**

Kabuklarından ayrılan cevizler öğütücü değirmen (IKA A11 Basic) yardımı ile homojen hale getirildi ve 37°C' de kurumaya bırakıldı. Bir sonraki aşamada aseton kullanılarak yağsızlaştırma işlemi yapıldı ve yağsızlaştırılan ceviz lipaz elde etmek için saklandı (Şekil 2.1) Bu işlem aktiviteye en az zarar verecek en uygun çözelti olan asetonla +4°C' de gerçekleştirildi [38].

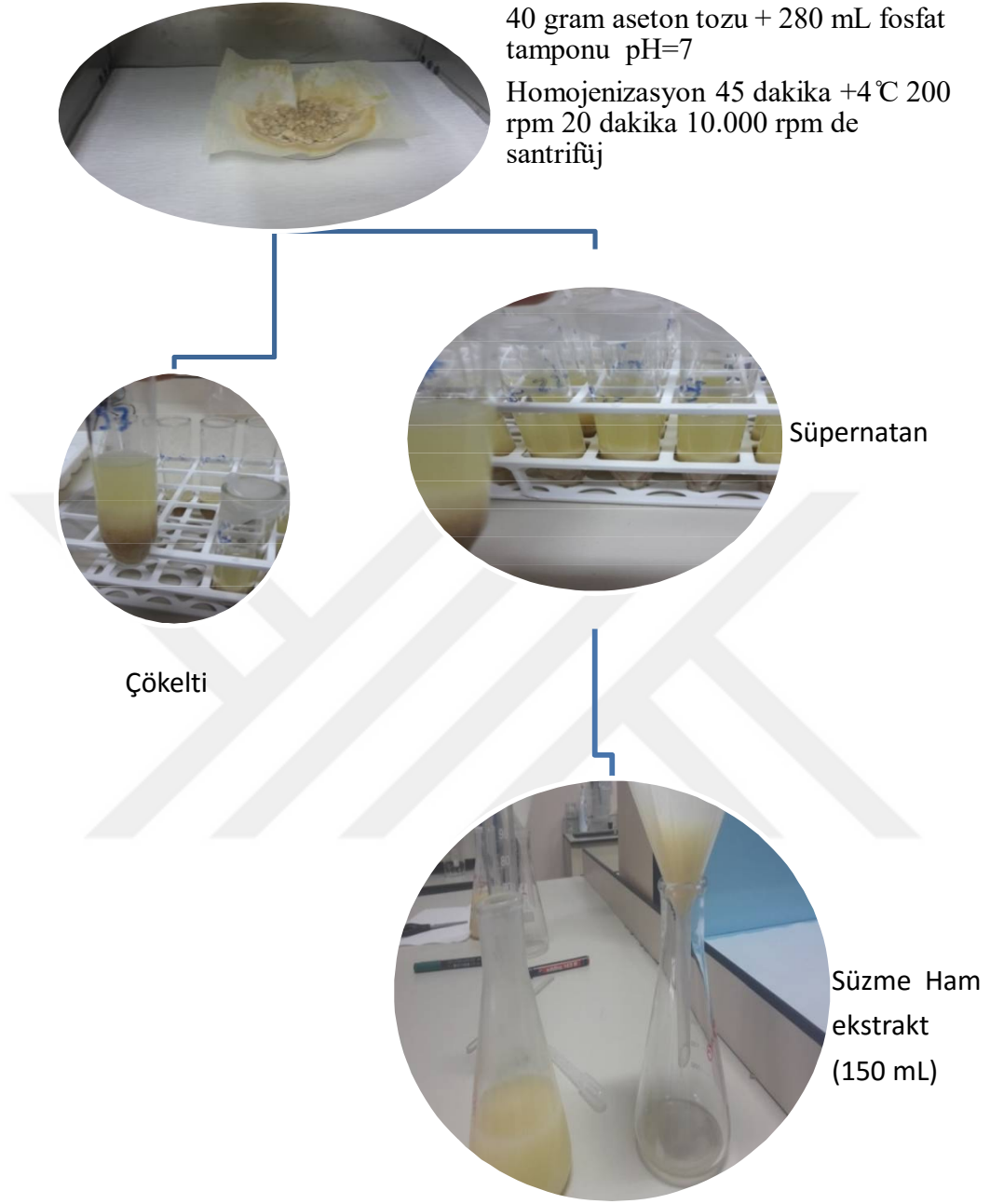




Şekil 2.1. Cevizde yağsızlaştırma işlemi

#### 2.2.4.2. Ham Ekstraktın Hazırlanması

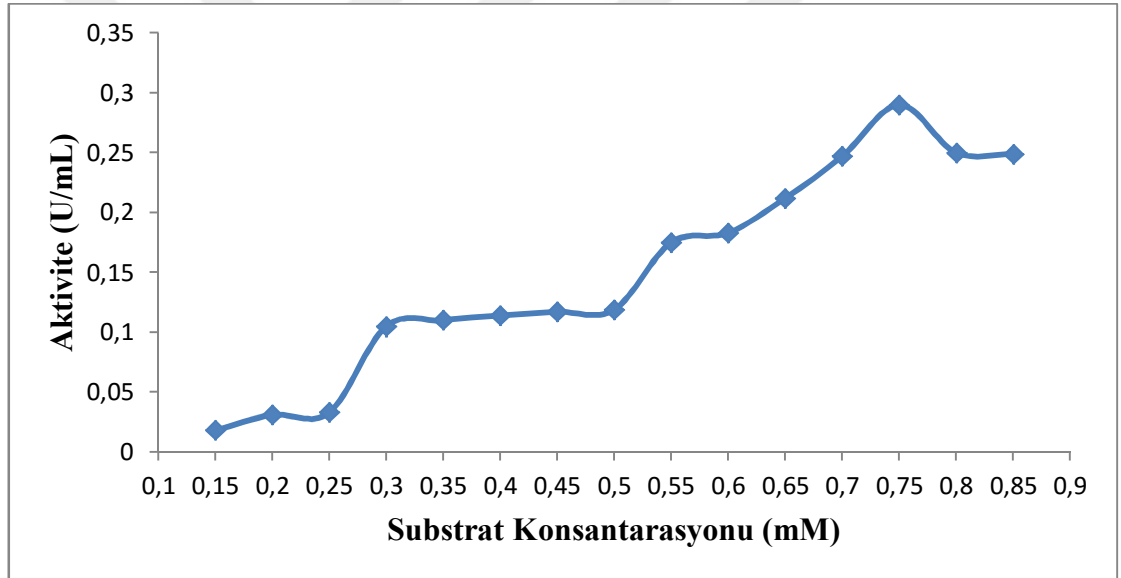
Yağsızlaştırma işleminin ardından asetonun uzaklaştırılması için 37°C'de 1 gece bekletilen öğütülmüş cevizden 40 gram alınarak 7 katı fosfat tamponun ilavesiyle +4°C'de 200 rpm 50 dk su banyosunda karıştırıldı. Bu işlemin ardından +4°C'de 10.000 rpm de 25 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınarak süzme işlemi yapıldı ve daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı (Şekil 2.2).



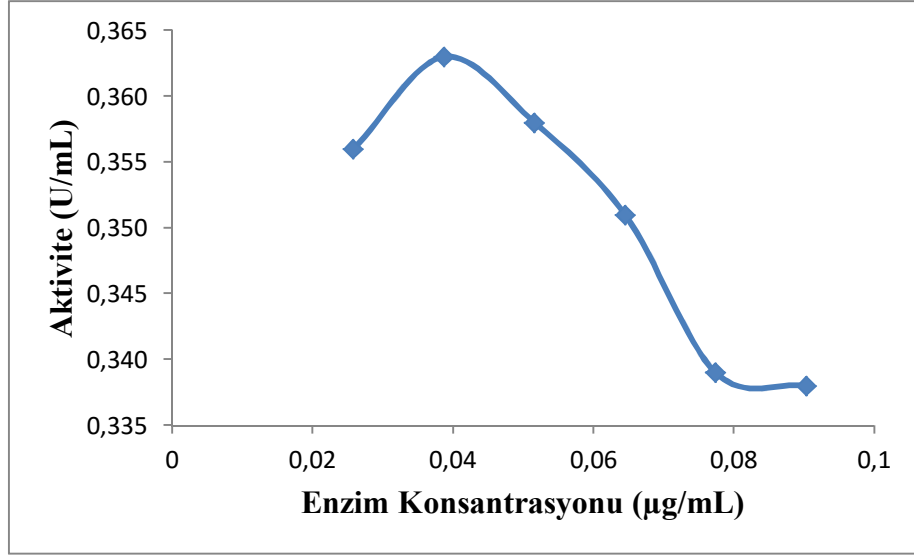
**Şekil 2.2.** Cevizden fosfat tamponu ile ham enzimin elde edilmesi

### 2.2.4.3. Lipaz Aktivitesinin Tayini

Lipaz aktivitesi *p*-nitrofenil oktanoat substratı kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Asetonitril içerisinde substratın 10 mM'lık konsantrasyonluk çözeltisi, pH'sı 7,0 olan 50 mM'lık fosfat tamponu eklenmesi ile substrat karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden 985 $\mu$ L alınarak üzerine 15 $\mu$ L enzim ilave edildi ve 405 nm'de okundu. Bu değerler belirlenirken ön çalışma yapıldı ve enzim aktivitesinin en yüksek olduğu enzim ve substrat konsantrasyonu denemeler sonucunda bulundu (Şekil 2.3-4). Denemeler sonucundaki en uygun grafik aşağıda verilmiştir. Enzim ünitesi 1 $\mu$ mol *p*-nitrofenol açığa çıkarmak için gerekli olan enzim miktarının oda sıcaklığında belirlenmesidir. Spesifik aktivite ise mg protein başına düşen aktivite olarak belirlendi.



Şekil 2.3. Substrat–Aktivite ilişkisi



Şekil 2.4. Enzim–Aktivite ilişkisi

#### 2.2.4.4. Lipaz Enziminin Saflaştırma Basamakları

Asetonla yağsızlaştırma işlemini izleyerek amonyum sülfatla çöktürme, sonra diyaliz işlemi ve en son jel filtrasyon kolonu ile saflaştırma yapıldı ardından elektroforez işlemi ile saflaştırma tamamlanmış oldu [39].

##### 2.2.4.4.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme

Amonyum sülfatla çöktürme işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde 0 °C’de ham ekstrakta azar azar amonyum sülfat ilavesi ile gerçekleştirildi. Çöktürme işleminde ilave edilen amonyum sülfatın çözünüp çözünmediğine dikkat edildi. Her defasında bir önceki aşamada ilave edilen amonyum sülfatın çözünmesine önem gösterildi. Amonyum sülfatla çöktürme %0-20, %20-40, %40-60, %60-80 ve %80-100 aralıklarında yapıldı. Çöktürme işlemlerinin ardından her basamakta 10.000 rpm de +4 °C’ de 20 dakikalık bir santrifüj işleminin ardından süzüntü kısmı ayrıldı. Çökelek kısmı ise en az hacim olacak şekilde 50mM pH7 fosfat tamponu içerisinde çözüldü. Aktivite ve protein tayini için bir kısmı alındı. Geriye kalan kısmı ise diyaliz işlemine tabi tutuldu.

#### **2.2.4.4.2. Diyaliz**

Protein çözeltisi içerisindeki küçük iyonların uzaklaştırılması amacıyla diyaliz yöntemi kullanıldı. Diyaliz işleminin uygulanacağı numune önceden yıkanarak hazırlanan 25 mm (1.0 in.), MWCO 12,000 Da özelliklerine sahip diyaliz torbasının içine aktarıldı. Aktarım tamamlandıktan sonra her iki ucuda bağlanan diyaliz torbası 50 mM'lık fosfat tamponu içerisine bırakıldı. Daha sonra magnetik karıştırıcı üzerine alınarak +4 °C'de bir gün bekletildi. Bu işlem gerçekleşikten sonra elde edilen diyalizat için aktivite ve protein tayini yapıldı.

#### **2.2.4.4.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi**

Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası lipaz içeren protein çözeltisi fosfat tamponunda (pH 7,0) dengeye getirilmiş olan sephadexs G-100 kolonuna ilave edildi. Protein çıkışı son bulana kadar pH 7,5 50 mM fosfat tamponu geçirildi. Kolondan çıkan elüatlar 1,5 mL'lik fraksiyonlar halinde ayrı ayrı toplandı. Toplanan bu elüatlarda 280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

#### **2.2.4.5. Protein Tayini**

Cevizde protein tayini Lowry yöntemiyle [40], yapıldı ve standart olarak ise sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanabilmesi için BSA çözeltisinden (1mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 µL ilave edildi. BSA'nın son konsantrasyonun 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µg/mL olması sağlandı. Standartlardan ayrı olarak ham ekstraktan, diyaliz sonrası enzimden, kolon sonrası enzimden yaklaşık 15 µL alınarak standart ve örneklerin son hacimleri 500 µL olacak şekilde 0,1 N NaOH içindeki % 0,1 (w/v) SDS ilave edilerek vortekslendi.

Hazırlanan tüplere ayrı ayrı Lowry E çözeltisi eklendikten sonra vortekslenip 10 dakika karanlıkta beklendi.

Saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan folin reaktifinden standartlara ve numuneye 100 µL ilave edildi ve 30 dakikalık bekleme süresinin ardından spektrofotometrede 650 nm’de okuma yapıldı. Kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak protein konsantrasyonu saptandı.

**Tablo 2.3.** Lowry yöntemi ile protein tayini (S: Standart, N: Numune)

	Kör (µL)	S1 (µL)	S2 (µL)	S3 (µL)	S4 (µL)	S5 (µL)	S6 (µL)	S7 (µL)	S8 (µL)	S9 (µL)	S10 (µL)	N (µL)
NaOH /SDS	500	490	480	470	460	450	440	430	420	410	400	485
Numune	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	15
BSA (1mg/mL)	----	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	---
Lowry E	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<b>Vortekslendi ve 10 dakika karanlıkta bekletildi</b>												
Folin/Su (1:1)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Vortekslendi ve 10 dakika karanlıkta bekletildi</b>												

#### 2.2.4.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid (SDS) Jel Elektroforezi

Lipaz enzimi jel fitrasyon kolonundan saflaştırıldıktan ve diyaliz edildikten sonra %3-8 sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile saflaştırılan enzimin saflığına bakıldı. Molekül ağırlığı bilinen proteinler standart olarak kullanıldı [41]. Bu işlem için elektroferez plakaları ilk olarak su sonrasında alkol ile iyice temizlendi. İki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu, ayırma ve yığma jelleri hazırlandı [42].

**Tablo 2.4.** SDS- PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları

	Ayırma jeli (mL)	Yığıma jeli (mL)
<b>Saf su</b>	3,13	2,45
<b>1 M Tris-HCl (pH: 8,8)</b>	5	0,41
<b>akrilamid%30 –bisakrilamid%0,8</b>	4,4	0,4
<b>SDS (%10)</b>	0,2	0,03
<b>TEMED%5'lik</b>	0,13	0,03
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (%10'luk Amonyum persülfat)</b>	0,2	0,1

Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına üst kesimde 0,5 cm oluncaya kadar pipetle dökme işlemi gerçekleştirildi ve jelin donması için beklendi, ayırma jelinin katılaştığını gördükten sonra yığıma jeli hazırlanmaya başlandı. Bu işlemin ardından yığıma jeli üst yüzeye kadar eklendi. Üst kısmına tarak dikkatli bir şekilde yerleştirildikten sonra kuruması için jel bir süre bekletildi. Tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak plakaların elektroforez tankına yerleştirilmesi sağlandı. Yürütme tamponu elektroforez tankının alt ve üst kısmına konuldu. Her birinde 20 µg protein olacak şekilde numuneler hazırlandı. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu eklendi. Kaynar su banyosuna konularak 15 dakika beklendi. Soğutulan numuneler, pipet yardımıyla elektroforeze uygulandı. Kapağı kapatılan tankın alt kısmına (+) anot, üst kısmına (-) katot yerleştirildi. İlk olarak 30 dakika 80 voltta bekletildi ve daha sonra akım 120 volta getirilerek 1,5 saat oda sıcaklığında yürütülmesi sağlandı. Cam plakalar arasındaki jel akım kesildikten sonra dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Elektroforez işleminin sona ermesinin ardından cam plaklardan çıkartılan jel 30 dk karıştırıcıda tespit çözeltisinde ardından redüksiyon çözeltisinde karıştırıcıda 30 dk bekletildi. Jel 3 kez saf su ile iyi bir şekilde yıkandı. Bu işlem sonrasında 20 dk gümüş nitrat çözeltisiyle karıştırıcı üzerinde boyama işlemi gerçekleştirildi. Boya kısa bir süre önce hazırlanıp karanlık ortamda bekletildi. Çözeltisiyle kısa ve hızlıca yıkayıp siyah rengini alan sıvı döküldü. Bantların görülmesinin ardından jel karıştırıcının üstünde 1 mL gliserin ve 250 mL %5'lik asetik asitten oluşan çözeltiyle iyi bir şekilde yıkandı [42].

#### **2.2.4.7. Kağızman Cevizi Lipazının Biyokimyasal Karakterizasyonu**

Lipaz enzimin karakterizasyonunu tespit etmek amacıyla optimum sıcaklık ve pH, İyonik şiddet,  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin belirlenmesi, alt bitrimlerinin molekül kütlesi tayin edildi.

##### **2.2.4.7.1. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi**

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için 30-80 °C aralığındaki sıcaklıklarda ölçümler yapıldı. İstenilen sıcaklıklar, su banyosu kullanılarak ayarlandı. En yüksek aktivitenin hangi sıcaklıkta olduğu tespit edildi.

##### **2.2.4.7.2. Optimum pH'ın Belirlenmesi**

Optimum pH aralığının belirlenmesi pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0, pH 7,0, fosfat tamponu, pH 7,5, pH 8,0, pH 8,5 tris-HCl tamponu ve pH 9,0, pH 9,5, pH 10, pH 10,5 Glisin-NaOH tamponları kullanılıp enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülerek optimum pH aralığı belirlendi.

##### **2.2.4.7.3. İyonik Şiddet**

Belirlenen optimum pH, sıcaklık ve substrat ile iyonik şiddet tespit edildi. Optimum pH gösteren tamponun farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanarak iyonik şiddet belirlendi.



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

Optimum pH'sı, sıcaklığı belirlenen enzimin farklı substrat konantrasyonları hazırlanarak enzim aktiviteleri 405 nm'de ölçüldü. Lineweaver burk grafiği çizilerek grafikten elde edilen denklem ile  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

#### 2.2.4.7.5. Cevizden Saflaştırılan Lipaz Molekül Kütlesinin Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar

Molekül kütlesinin belirlenmesi Laemmli'nin kullanmış olduğu teknik ile yapıldı [41]. Standart olarak 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 kDa'luk proteinlerden yararlandı. Lipaz enziminin elektroforez işleminin ardından  $R_f$  değerinin hesaplanmasıyla logMk- $R_f$  grafiği çizildi. Daha sonra ise bu değer antilogaritması alınarak molekül kütlesi belirlendi. Aşağıdaki formül kullanılarak  $R_f$  hesaplaması yapıldı.

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

$X_e$  = Proteinin yürüme mesafesi

$X_{boya}$  = Boyanın yürüme mesafesi

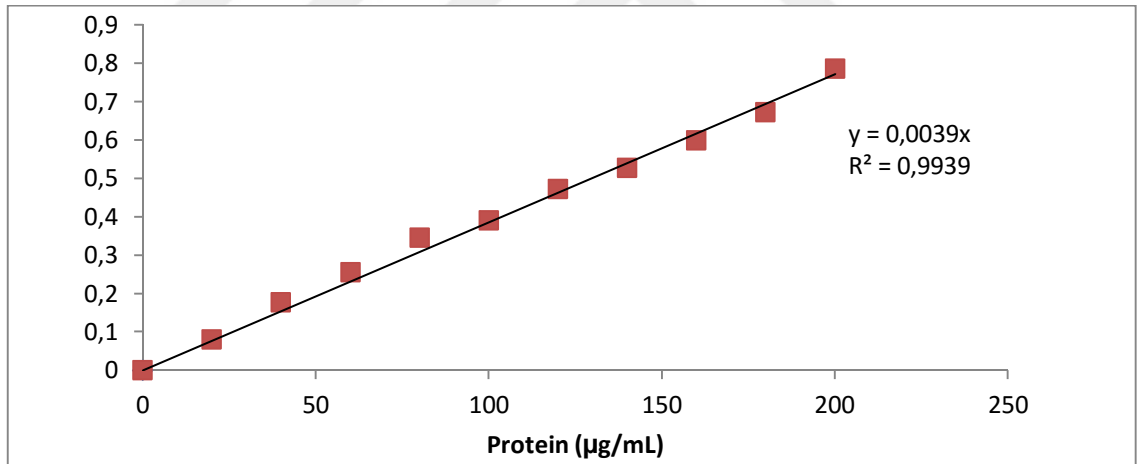
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Yağın Uzaklaştırılması ve Ham Ekstraktın Elde Edilmesi

Cevizden yağın uzaklaştırılması işleminde aktivite kaybının en aza indirilmesi amacıyla asetondan yararlanıldı. Bu işlemin yapılması ile 150 gram aseton tozu elde edildi. Aseton tozunun 40 gramı alınarak 150 mL ham ekstrakt elde edildi.

#### 3.2. Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Standart protein grafiğinin oluşabilmesi için farklı konsantrasyonlarda alınan BSA'nın bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçildi (Şekil 3.1). Böylelikle toplamdaki protein içerikleri hesaplandı.



Şekil 3.1. Standart protein grafiği

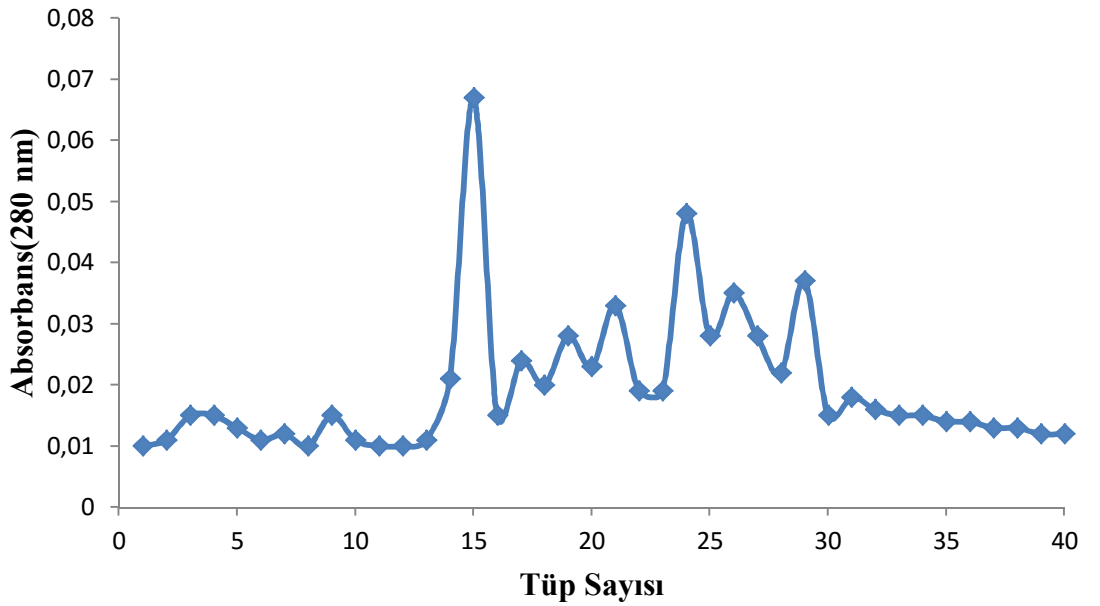
### 3.3. Saflaştırma Aşamaları

#### 3.3.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme

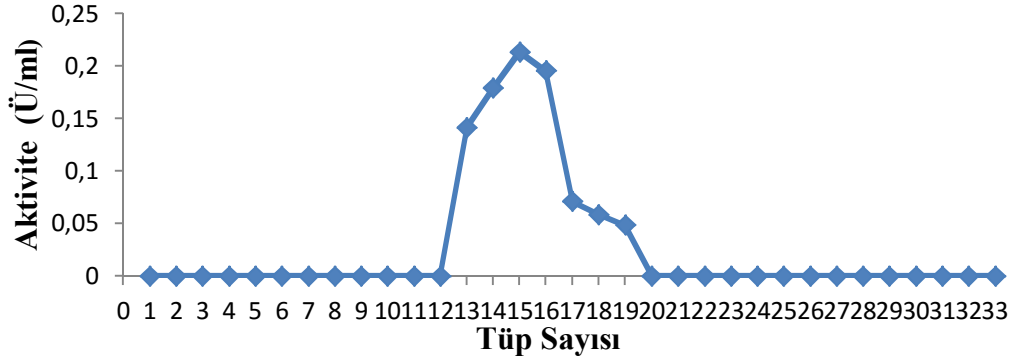
Amonyum sülfatla çöktürme % 0-20, % 20-40, % 40-60, % 60-80 ve % 80-100 aralıklarında yapıldı. Bu çöktürme aşamalarında aktivite ve protein tayini yapıldı ve en yüksek aktivite aralığı % 60-80 aralığı olarak belirlendi. Çöktürme işlemi ardından homojenant en az hacimde tamponda çözüldü ve protein miktarı 1,63 mg/mL aktivite 0,162 U/mL olarak belirlendi. Geriye kalan kısım diyalizlendi. Diyalizlenen süpernant için aktivite ve protein tayini yapıldı ve protein miktarı 1,05 mg/mL, aktivite 0,144 U/mL olarak belirlendi.

#### 3.3.2. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Fraksiyonlar için protein ve aktivite çalışması yapıldı. Protein yoğunluğunun fazla olduğu fraksiyonlarda aynı zamanda aktiviteninde yüksek olduğu gözlemlendi. Protein miktarı 0,71 mg/mL, aktivite 0,214 U/mL olarak belirlendi. Diğer protein olan fraksiyonlarda aktivite görülmemesinin sebebi lipaz dışı olan proteinlerin ortamdan uzaklaştırıldığını göstermektedir (Şekil 3.3)



Şekil 3.2. Jel filtrasyon sonrasında tüp sayıları ve absorbans değerleri



**Şekil 3.3.** Tüp sayısı ve aktivite

**Hacim (mL):** İlk olarak kullanılacak enzimi miktarı ve daha sonra her bir adımda geriye kalan hazırlanan enzim çözeltisi.

**Protein (mg/mL):** Lowry protein tayini sonrası elde edilen protein miktarı.

**Toplam protein (mg):** Hacim x protein miktarı

**Aktivite:**  $\Delta A / \epsilon \cdot t - \Delta A$ : Absorbans farkı  $\epsilon$ : Ekstinksiyon katsayısı (14,8) t: zaman

**Toplam aktivite:** Aktivite x hacim

**Spesifik aktivite:** Toplam aktivite/ toplam protein miktarı

**Saflaştırma katsayısı:** İlk katsayı 1 olarak alınır. 2. Aşamadan son aşamaya kadar Spesifik aktivitenin 2. Değeri/ 1. Değeri

**Verim:** İlk verim 100 alınır ve işleme devam edilir

(Toplam aktivite 2/toplam aktivite 1) x100

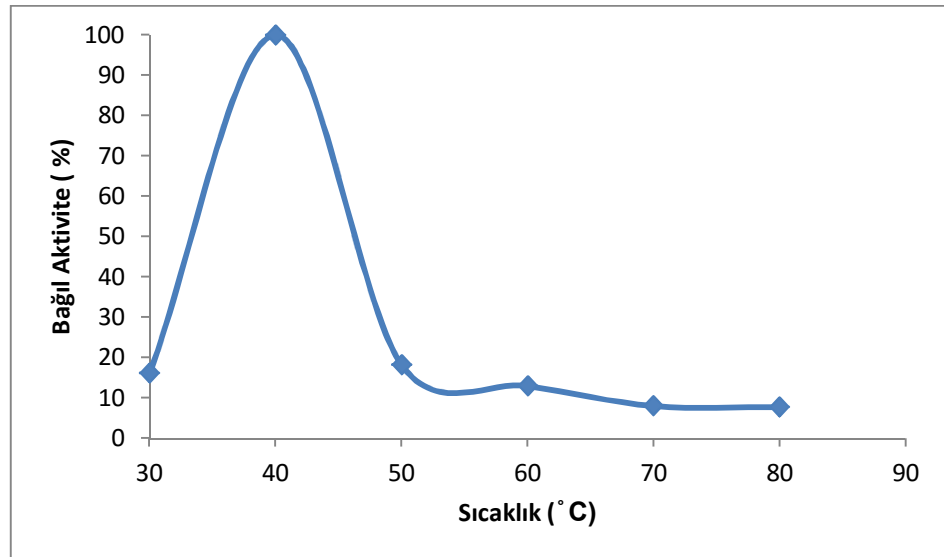
**Tablo 3.1.** Cevizden saflaştırılan lipaz enzimine ait saflaştırma tablosu

	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Homojenat	150	2,58	387	0,221	33,15	0,085	1	100
Amonyum sülfatla çöktürme	42	1,63	68,4	0,162	6,84	0,10	1,17	22
Diyaliz	3	1,05	3,15	0,144	0,432	0,14	1,64	1,30
Sephadex G-100	1,5	0,71	1.065	0,214	0,321	0,30	3,53	0,96

### 3.3.3. Kağızman Cevizden Saflaştırılan Lipazın Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları

#### 3.3.3.1. Optimum Sıcaklık İle İlgili Bulgular

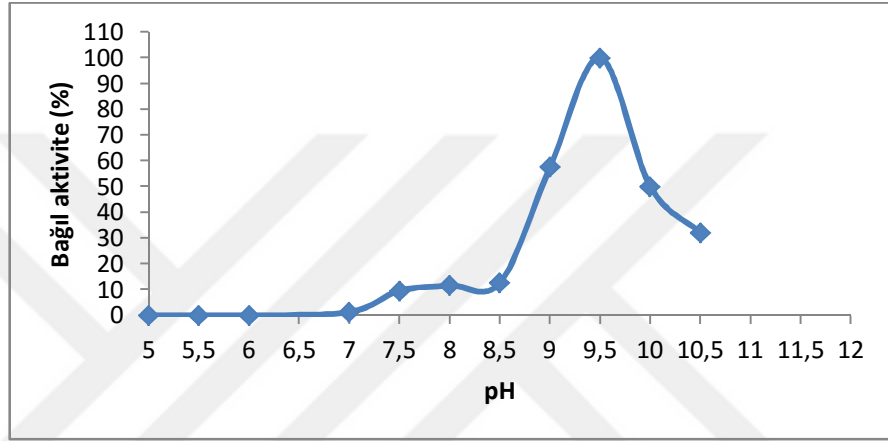
Lipaz enzimine sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla 30-80 °C arasında çalışılmış ve sonuçlar (Şekil 5.8)'de verilmiştir. Optimum sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur (Şekil 3.7).



**Şekil 3.4.** Optimum sıcaklık grafiği

### 3.3.3.2. Optimum pH İle İlgili Bulgular

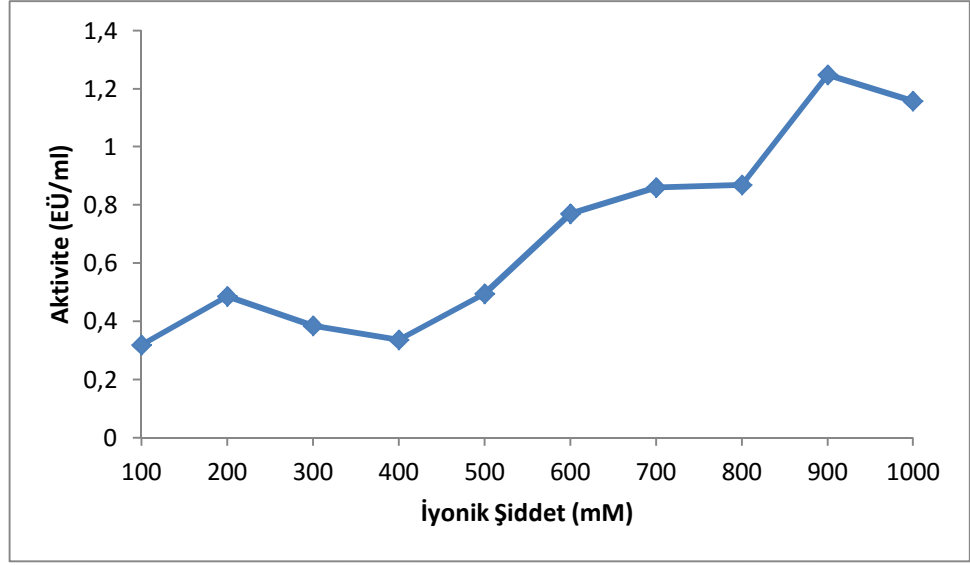
Kağızman cevizden saflaştırılan lipaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği pH aralığını belirlemek için Fosfat tamponu (pH 5,0-7,0), Tris-HCl (pH 7,5-8,5), Glisin-NaOH (pH 9,0-10,5) tamponlarından yararlanıldı. En uygun pH aralığı Glisin NaOH 9,5 tamponunda bulunmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Optimum pH grafiği

### 3.3.3.3. Optimum İyonik Şiddet İle İlgili Bulgular

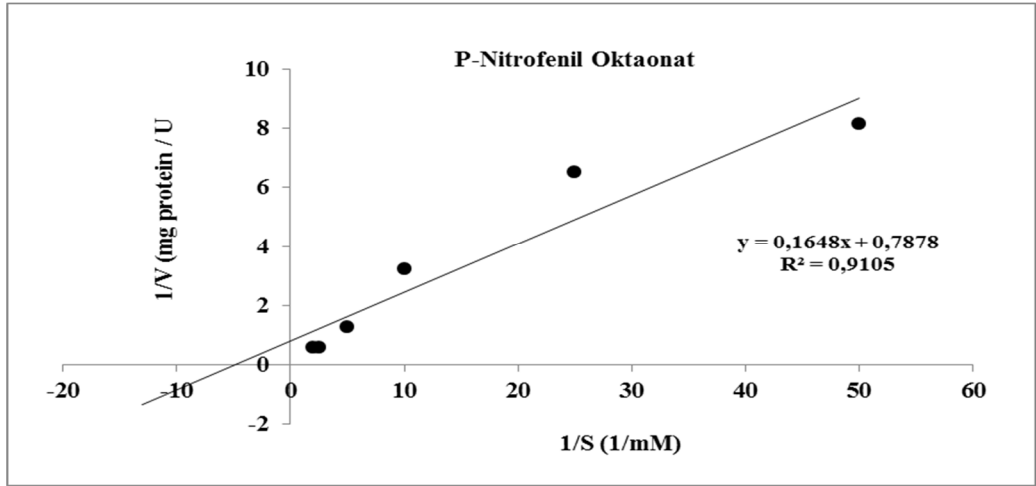
Cevizden saflaştırılan lipaz enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi için optimum pH'da farklı konsantrasyonlarda Glisin-NaOH tamponu ile farklı konsantrasyonlarda aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan bu ölçümler sonucunda aktivite ile konsantrasyon değerlerini içeren grafik çizildi. Yapılan çalışmaların sonucunda ise optimum iyonik şiddetin 900mM, Glisin pH 9,5 tamponu olduğu belirlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.6. İyonik şiddet grafiği

### 3.3.3.4. Lipaz Enziminin $K_m$ ve $V_{maks}$ Değerinin Bulunması

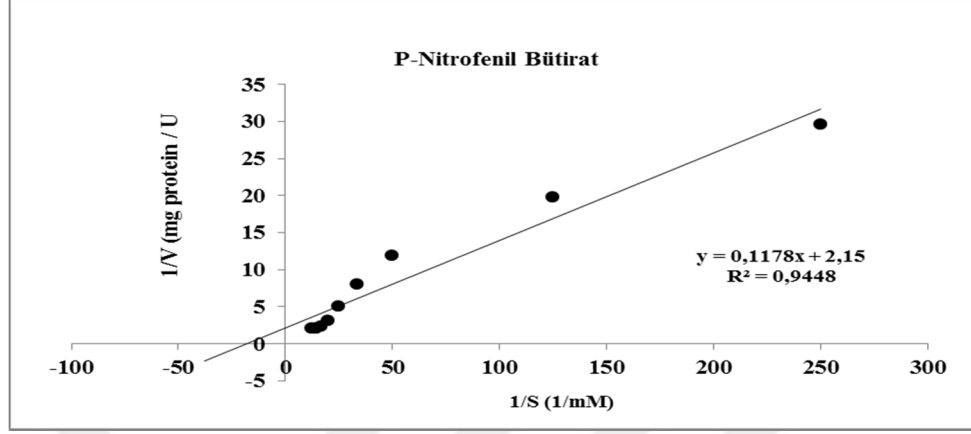
Aktivitenin en yüksek olduğu optimum koşullarda en uygun substrat konsantrasyonuna karar verebilmek için p-nitrofenil oktanoat ve p-nitrofenil bütiratın değişik miktarları alınarak enzimin aktivitesi substratların değişen miktarına göre ortaya konuldu.



Şekil 3.7. Lipaz için p- nitrofenil oktanoat substratı ile Lineweaver-Burk grafiği.

Her substrat için Lineweaver- Burk eğrisi yardımıyla  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.  $K_m$  değeri p-nitrofenil oktanoat için 0,21 mM, ve p-nitrofenil bütirat için 0,0558 mM

olmakla beraber  $V_{maks}$  değeri *p*-nitrofenil oktanoat için 1,3 U/mL ve *p*-nitrofenil bütirat için ise 0,46 U/mL olarak ortaya konuldu (Şekil3.9-3.10).

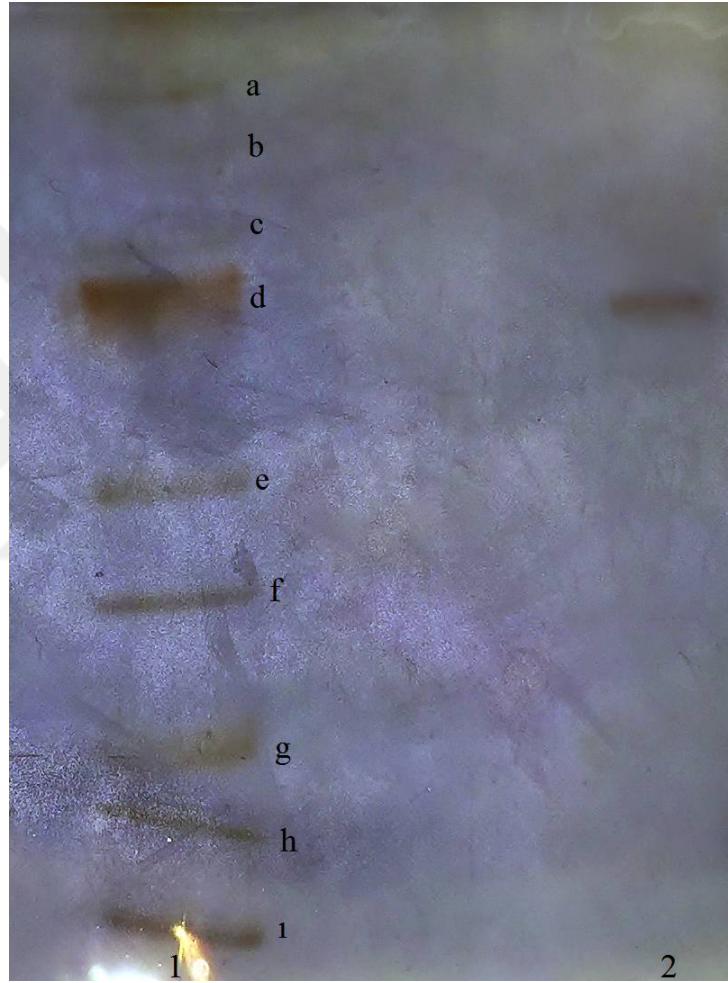


Şekil 3.8. Lipaz için *p*-nitrofenil bütirat substratı ile Lineweaver-Burk grafiği.



### 3.3.3.5. Elektroforez ve Gümüş Nitratla Boyama

Lipaz enzimi jel filtrasyon kolonundan saflaştırılıp, diyaliz edilmesinin ardından %3-8 sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile saflaştırılan enzimin saflığının kontrol edilmesinin ardından molekül ağırlığı belli olan proteinler standart olarak kullanıldı [41].



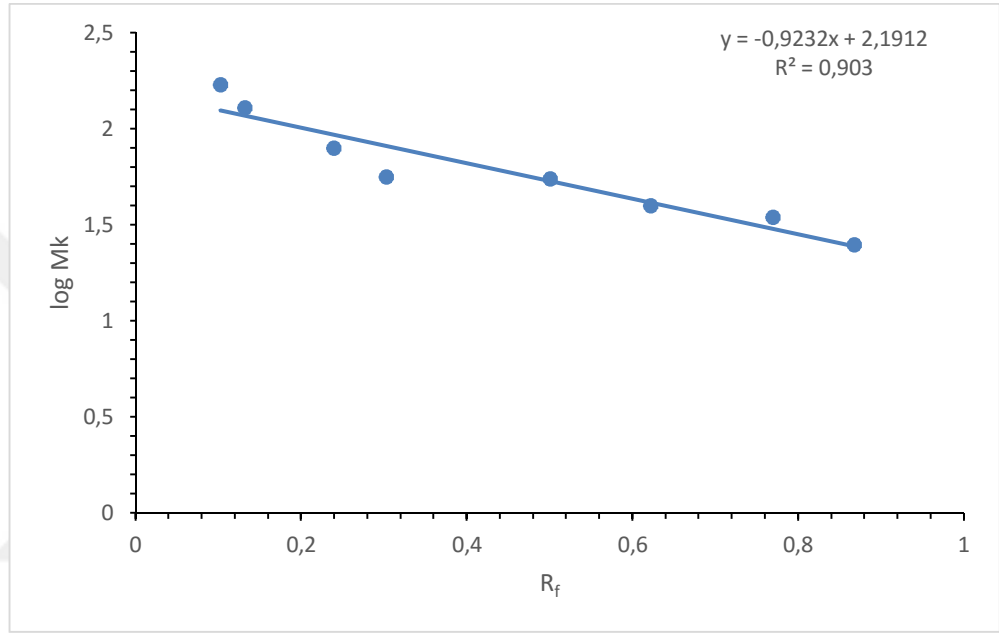
**Şekil 3.9.** Lipaz enziminin SDS-PAGE gümüş boyama fotoğrafı

1. Standartlar; a. (170 kDa), b. (130 kDa), c. (100 kDa), d. (70 kDa), e. (55 kDa), f. (40 kDa), g. (35 kDa), h. (25 kDa), i. (15 kDa)

2: Lipaz enzimi

### 3.3.3.6. SDS-PAGE İle Molekül Kütlesinin Belirlenmesi

Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan enzim SDS-PAGE’de yürütme yapıldıktan sonra standart proteinlerin ve saf enzimin Rf değeri hesaplanarak logMk-Rf değerleri ile grafiği çizildi. Alt biriminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 67,6 kDa tayin edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.10. SDS-PAGE sonrası çizilen log Mk-Rf grafiği

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu çalışmada Kağızman ilinden temin edilen Kağızman cevizinden (*Juglans regia* L.) çöktürme ve kromatografik yöntemler kullanılarak lipaz enzimi saflaştırıldı ve enzimin biyokimyasal özellikleri belirlendi.

Kağızman cevizinden elde edilen 150 mL ham enzimin ön saflaştırma işlemi, amonyum sülfat ile çöktürme yapılmak suretiyle gerçekleştirildi. Çöktürmeden sonra uygulanan santifüjleme işleminden elde edilen protein çözeltilerinin aktivite değerleri ölçülerek, en uygun amonyum sülfat çöktürme aralığı tespit edildi. En yüksek aktivitenin görüldüğü aralıktaki protein çözeltisi önce bir diyaliz membranı yardımıyla diyaliz işlemine tabi tutuldu. Daha sonra diyalizlenen bu çözelti, Sefadeks G-100 dolgu maddesinin yüklendiği jel filtrasyon kolonuna alınarak fosfat tampon çözeltisi (pH = 7) ile yıkandı ve elde edilen eluatlar 1,5 mL'lik Eppendorf tüplerinde toplandı. Ham enzim kaynağında enzimin spesifik aktivitesi 0,085 U/mg protein iken, bu değer amonyum sülfat ile çöktürme sonrası 0,10 U/mg protein, diyaliz sonrası 0,14 U/mg protein, jel filtrasyon kolonu Sefadeks G-100 sonrası 0,30 U/mg protein olarak elde edildi (Tablo 3.1). Bu sonuçlar göz önüne alındığında enzim % 0,96 verimle 3,53 kat saflaştırıldı. Daha önceki çalışmalardan lipaz enziminin, badem tohumundan 5,4 kat [43], *Debaryomyces hansenii* mikroorganizmasından 1,39 kat [44], oranında saflaştırılarak elde edildiği bilinmektedir. Bu çalışmada elde edilen değer, bu iki değer arasında yer aldığı göz önüne alındığında, farklı kaynaklardan saflaştırılan lipazın saflaştırma katsayısının aynı olmadığı, türe göre farklılık gösterdiği söylenebilir.

Yapılan kromatografik saflaştırma işleminin ardından en yüksek aktivite değerini ortaya koyan enzim fraksiyonu, elektroforeze tabi tutuldu. Hazırlanan % 3-8 SDS-PAGE elektroforezine enzim eluatı ilave edildi ve gümüş nitratla boyamanın ardından saflaştırıldı. Enzim eluatının eklenmesi sonucu gözlemlenen band, lipazın varlığını göstermektedir. Molekül ağırlıkları 11-92 kDa aralığında değişen lipazlar tek zincirli polipeptitlerden oluşmaktadır [45, 46, 47]. Kağızman cevizinden (*Juglans regia* L.) saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı SDS-PAGE sonrası çizilen logMk-Rf grafiğinden

hesaplanarak 67,6 kDa olarak bulundu (Şekil 3.10). Lipaz, daha önceki çalışmalarda 20 kDa molekül ağırlığı düzeyinde fındıktan [48], 92 kDa molekül ağırlığı düzeyinde *Pseudomonas gessardi* suşundan [49], 49 kDa molekül ağırlığı düzeyinde *Mucor hiemalis* f.Hiemalis'ten [50] saflaştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçla birlikte değerlendirildiğinde, farklı biyolojü kaynaklarından saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlelerinin farklı değerlerde olabileceği sonucu çıkarılabilir.

Bu çalışmada elde edilen lipazın aktivitesinin optimizasyon çalışmasından en uygun pH değerinin 9,5 olduğu bulundu (Şekil 3.5). Lipaz aktivitesinin belirlendiği pH çalışmalarında; yine ceviz ile yapılan bir başka çalışmada optimum pH 9,0 [51], pirinç tohumuyla yapılan çalışmada 11,0 [52], yulaf ile yapılan çalışmada 9,0 [53], Hindistan cevizi ile yapılan bir diğer çalışmada 8,5 [54] değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar lipaz enziminin çok geniş bir pH (8,5-11) aralığında etki ettiğini göstermektedir.

Ceviz ile yapılan optimum pH çalışmasıyla kıyaslama yapıldığında her iki ceviz türünde bazik pH'da en yüksek aktivite gösterdiği kaydedildi.

Elde edilen lipaz enziminin en yüksek aktiviteyi 40°C'de gösterdiği bulundu (Şekil 3.4). Fransız fıstığı ile yapılan çalışmada optimum sıcaklığın 40°C [55], acı bakla tohumu ile yapılan bir çalışmada 45°C [56], kolza tohumu ile yapılan çalışmada ise 37°C [57] olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuç, Fransız fıstığından elde edilen sonuçla uyum göstermekle beraber, genel olarak acı bakla tohumu ve kolza tohumu ile yapılan çalışmalardaki değerler arasında yer aldığı sonucu söylenebilir.

Saflaştırılan lipaz için uygun substrat konsantrasyonunu ortaya koymak amacıyla farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Substrat olarak ise *p*-nitrofenil oktanoat ve *p*-nitrofenil butirat kullanıldı. Substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil oktanoat ve *p*-nitrofenil butirat için bulunan verilerle Lineweaver-Burk eğrisi çizildi (Şekil 3.7 ve 3.8), buradan  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri bulundu. Yapılan çalışmada Kağızman cevizinden saflaştırılan lipazın  $K_m$  değeri *p*-nitrofenil oktanoat için 0,21 mM, *p*-nitrofenil butirat için ise 0,0558 mM olarak hesaplandı.  $V_{maks}$  değeri ise *p*-nitrofenil oktanoat için 1,3 U/mL ve *p*-nitrofenil butirat için 0,46 U/mL olarak kaydedildi. Bu

çalışmada kullanılan substratlar içerisinde en küçük  $K_m$  değerine sahip substrat olan *p*-nitrofenil butiratın (0,0558 mM), lipaz enziminin en fazla ilgi gösterdiği substrat olduğu söylenebilir. Ayçiçeği ile yapılan çalışmada ayçiçeği yağına karşı  $K_m$  değeri 1,33 mM,  $V_{maks}$  değeri 555 U/mg [58], acı bakla ile yapılan çalışmada acı bakla yağına karşı  $K_m$  değeri 1,63 mM,  $V_{maks}$  değeri 37,3  $\mu\text{mol mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$  [56], yulaf ile yapılan çalışmada lipazın izo enzimleri (EII ve EIII ) için *p*-nitrofenil palmitat'a karşı  $K_m$  değeri 0,52 ve  $V_{maks}$ , 0,38 mM [53], barbados yemişi ile yapılan çalışmada ise zeytin yağına karşı  $K_m$  değeri 0,02 mM,  $V_{maks}$  değeri ise 0,24  $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  olarak bildirilmiştir [59]. Bu çalışmada elde edilen  $K_m$  değeri, literatürde verilen değer aralığında, alt sınıra yakın bir konumda elde edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar genellikle hem enzim saflaştırma açısından, hem de aktivite belirlemede kullanılan substratlar açısından doğal kaynaklı olup (örn. ceviz, , acı bakla, ayçiçeği) [51, 56, 58], titrimetrik olarak yapılmıştır. Bu çalışma ise spektrofotometrik olup, yapay substratlar (*p*-nitrofenil oktanoat ve *p*-nitrofenil bütirat) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda Kağızman cevizinden lipaz (*Juglans regia* L.) saflaştırıldı. Saflaştırılan lipazın optimum pH, optimum sıcaklık, iyonik şiddet, molekül kütlesi gibi parametreleri incelendi. İncelenen bu parametrelerin lipaz içeren diğer bitkisel kökenli türlerden farklı olduğu kanaatine varıldı.

## 8. KAYNAK LAR

- [1] Julio Polaina Andrew P.Maccabe “Industrial Enzymes Structure, Function and Applications”, ISBN 978-1- 4020-5376-4, published by springer, Dordrecht, The Netherlands, 2007.
- [2] Godfrey T, West S. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey T, West S, editors. Industrial enzymology. 2nd ed.New York: Stockton Press, pp.1-8, 1996.
- [3] Wilke D.Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and fermentation industry. Appl Microbiol Biotechnol,52:135-45, 1999.
- [4] Harvey, R., Ferrier, D., “Lippincott Görsel anlatımlı Çalışma Kitapları: Biyokimya”, ISBN: 978-605-335-083-5, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2015.
- [5] Telefoncu, A., “Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. Telefoncu, A. (Ed),. Enzimolojinin Prensipleri”, 1986.
- [6] Bayşu, N.”Biyokimya”, Güneş Tıp Kitabevleri, ISBN: 978-975-277-171-0, İstanbul, 2008.
- [7] Seriner, R., “Katalaz Enziminin Hıyardan (Cucimus Sativus) Saflaştırılması” Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniver, Fen Bili Ens, 2010.
- [8] Holme, D.J., Peck H. “Analytical Biochemistry”, ISBN: 0582-29438-X, Prentice Hall, England, p. 259-261, 2005.
- [9] Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum. 637. 2009.
- [10] Singh, A., K., Mukhopadhyay, M., “Overview of Fungal Lipase: A Review”, Appl Biochem and Biotechnol, 166,486–520, 2012.
- [11] İşbakan, N., “Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Safılıkta 1-Fenil-1-Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu”, Ankara Üniv Fen Bil Enst Yüksek Lisans Tezi, 2006.
- [12] Aydogmus Öztürk, F., “Pseudomonas Türlerinde Lipaz Üretim ve Bazı Kültürel Parametrelerin Optimizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniv Fen Bil Enst, Muğla, 2006.
- [13] Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., “Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases”, Biotechnol Adv, 19:627-662, 2001.

- [14] Yılmaz, E., “Farklı Teknikler Kullanılarak Değişik Materyallerine Lipaz İmmobilizasyonu ve Bir Anti-İnflammatör Olan S-Naproksenin Oluşumunda Kullanılması” Doktora Tezi, Selçuk Üniv, Fen Bil Enst, 2010.
- [15] Sökmen, B., B., “Kayısı (*Armeniaca vulgaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara immobilize Edilmesi” Doktora Tezi, İstanbul Üniv, Fen Bil Enst, 2005.
- [16] Aksamoğlu, A., “Lipaz enziminin florisil üzerine immobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bil.Enst 1997.
- [17] Öztürk B. “Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları”, Gıda Mühendisliği Derg, 12:20-23, 2002.
- [18] Jaeger K.E., Ransac S., Koch II.B., Ferrato F. And Dijkstra B.W. “Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*”, FEBS Lett. 332:143-149, 1993.
- [19] Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B. Et al. “Purification Strategies for Microbial Lipases.” J. Microbiol. Meth. 52: 1-18, 2003.
- [20] Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S., “Cocoa Butter Equivalent through Enzymic Interesterification Palm Oil Midfraction”, Proc Biochem, 36: 933-939, 2001.
- [21] Snellman, E. A., Colwell, R. R., “Acinetobacter Lipases: Molecular Biology, Biochemical Properties and Biotechnological Potential”, J. Industrial Microbiol and Biotechnol, 31: 391-400, 2004.
- [22] Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S. “Microbial Lipases: Production and Applications”, Sci Prog. 79: 119-157, 1996.
- [23] Jaeger, K.E., Reetz, M.T., “Microbial Lipases from Versatile Tools for Biotechnology”, Trends in Biotechnol, 16(9): 396-403, 1998.
- [24] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T., 1999, “The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology”, Biotechnol Appl Biochem, 29:119-131.
- [25] Vulfson EN. Industrial applications of lipases. In: Woolley P, Peterson SB, editors. “Lipases—their structure, biochemistry and applications”. Cambridge: Cambridge Univ. Press, pp. 271–88, 1994.

- [26] Hames, D., Hooper, N., “ Bios Hazır Notlar”, ISBN: 0-4153-6778-6, Nobel Yayın Dağıtımı, Ankara, 2005.
- [27] Janson, J.C., Ryden, L., “Protein Purification- Principles, High Resolution Methods, and Applications”, 695 p. Wiley- VCH, New York, 1998.
- [28] Toker, N.Y., “Protein saflaştırılması ile ilgili bazı metodlar”, Vet Fak Dergi, 2, 12., 2000.
- [29] Temizkan, G. Ve Arda, N., “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler” Nobel Tıp Kitapevleri, 2004.
- [30] Nelson, D.L., Cox, M.M., “Biyokimyanın İlkeleri” ISBN:975-8982-18-4, Palme Yayıncılık, Ankara, 2005.
- [31] Boyer, R.F., Modern Experimental Biochemistry, 2 nd Ed, Tl Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., California., pp 75-80, 1993.
- [32] Johnstone, A., Thorpe, R., “Immunochemistry In Practice, Blackwell Scien Publi”, Oxford, pp 9-16, 1982.
- [33] Vesterberg, O.“A short history of electrophoretic methods” Electrophoresis, 14: 1243-1249, 1993.
- [34] Temizkan, G. Ve Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2008.
- [35] <http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-17.pdf> (Erişim tarihi: Nisan 2016).
- [36] [http://megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Ceviz%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi.pdf](http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Ceviz%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi.pdf) (Erişim tarihi: Nisan 2016).
- [37] Budak, Y.“ Ceviz Yetiştiriciliği ” Samsun İl Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun, 2010.
- [38] Hird, H., Pumpery, R., Wilson, P., Sunderland, J. and Reece, P. Identification of peanut and hazelnut allergens by native two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis, 21, 2678-2683,2000.
- [39] Yadav, R.P., Saxena, R.K., Gupta, R., Davidson, S. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*”, Biotechnol. Appl. Biochem., 28, 243-249, 1998.
- [40] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent”, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.



- [41] Laemmli, D.K., “Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4., Nature, 227, 680, 1970.
- [42] Temel, D., “Doğal ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhBMP-7) ve angiogenic (bFGF) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi”, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniv., Fen Bil, Enst., Adana, 2006.
- [43] Yeşillioğlu, Y., Başkurt, L., 2008. “Partial Purification and Characterization of Almond Seed Lipase”, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 38:4, 397-410
- [44] Şükran, B., “Deterjan Katkı Maddesi Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Lipaz Üretim Koşullarının Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bil Enst, 2007.
- [45] Kraulis, P.J., Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. Journal Application Crystallography, 24, 946-950, 1991.
- [46] Lawson, D.M., Brzozowski, A.M., Rety, S., Verma, C. and Dodson, G.G., Probing the nature of substrate binding in *Humicola Lanuginosa* lipase through x-ray crytallograpy and intuivite modelling. Protein Engineering, 7, 543-550, 1994.
- [47] Schmid, R.D. and Verger, R., Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. Angew. Chem. Int. Ed., 37, 1608-1633,1998.
- [48] Kılıç, İ., Sağiroğlu, A., 2012. “Hazelnut Seed Lipase: Extraction, Purification, and Characterization”, 13(1): 15-25.
- [49] Ramani, K., Kennedy, L.J., Ramakrishnan, M. and Sekarana, G., Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. Process Biochemistry, 45, 1683–1691. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.06.023, 2010.
- [50] Hiol, A., Jonzo, M.D., Druet, D. and Comeau, L., Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. Enzyme and Microbial Technology, 25, 80–87. PII: S0141-0229(99)00009-5,1999.
- [51] Demirkan, B., “Ceviz (*Juglans regia* L.) Tohumu Lipazının Saflaştırılması ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniv, Fen Bil Enst, 2008.

- [52] Bhardwaj, K., Raju, A. and Rajasekharan, R., Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran: A new member of the (Phospho) lipase family. *Plant Physiology*, 127, No. 4, 1728 2001.
- [53] Mohamed, M., Mohamed, T. M., Mohamed, S. A. and Fahmy, A. S., Distribution of Lipases in the Gramineae. Partial Purification and Characterization of Esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology*, 73, No. 3, 227, 2000.
- [54] Ejedegba, B. O., Onyeneke, E. C. and Oviasogie, P.O., Characteristics of Lipase Isolated from Coconut (*Cocos nucifera* linn) Seed Under Different Nutrient Treatments. *African Journal of Biotechnology*, 6, No. 6, 723, 2007.
- [55] Polizelli, P. P. Tiera, M. J. and Bonilla-Rodriguez, G. O., 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, No. 8, 749, 2008.
- [56] Borek, S., Ratajczak, W., Ratajczak, L., Ultrastructural and Enzymatic Research on the Role of Sucrose in Mobilization Storage Lipids in Germinating Yellow Lupine Seeds. *Plant Science*, 170, No. 3, 441, 2006.
- [57] Sana, N. K., Hossin, I., Haque, E. M. and Shaha, R. K., Identification, Purification and Characterization of Lipase from Germinating Oil Seeds (*Brassica napus* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, No. 2, 246, 2004.
- [58] Sagiroglu, A. and Arabaci, N., Purification and Characterization of Lipase from Sunflower Seed. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35, No. 1, 37 2005.
- [59] Staubmann, R., Ncube, I., Gübitz, G. M., Steiner, W. and Read, J. S., Esterase and Lipase Activity in *Jatropha curcas* L. seeds. *Journal of Biotechnology*, 75, 117 (1999).

## ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Yeşim AYDIN DURSUN  
Doğum Yeri : IĞDIR/ MERKEZ  
Doğum Tarihi : 22.07.1989  
Lise : İstanbul Bağcılar Süper Lisesi (2003-2007)  
Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü  
2008-2013  
Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı  
2013(Devam Etmektedir)  
Çalıştığı kurum : Özel Orhangazi Temel Lisesi, Halk Eğitim Merkezi ve Akşam  
Sanat Okulu Yurdum Umudum Projesinde Kimya Öğretmeni

### Poster Bildirileri:

1- Kanıcı A, Yıldız Dalgınlı K, Atakişi O, Harmankaya A, Sertçelik M, Şener M, Aydın Y. “Yüksek Doz Metotreksatın Serbest Radikal Oluşumu ve Karaciğer Enzim Aktivitesine Etkisinin Araştırılması” 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran, 2013.

2- Atakişi O, Kanıcı A, Aydın Y, Ersan Y, Şener M, Yıldız Dalgınlı K, Özbek F,E, Kaya M. “Nikotinamidin Antioksidan Etkisinin Araştırılması”. 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran, 2013.

3- Harmankaya A, Özcan A, Yıldız Dalgınlı K, Erdağ D, Aydın Y, Mert B. “Trolox’ un Oksidatif Stres İndeksi ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi”. 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran, 2013.

4- Kanıcı A, Atakişi O, Şener M, Harmankaya A, Aydın Y, Sertçelik M.”Yüksek Doz Mehotreksat’ın Antioksidatif sistem ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkisinin Araştırılması.Kimya ARGE Proje Pazarı.2011

5- Kanıcı A, Yıldız Dalgınlı K, Atakişi O, Kart A, Aydın Y, Gülmez C, Kaya R, Mert B, Atmaca N. “Karaciğer Dokusu Albümin, Total Protein, Glukoz ve Globülin

Düzeylelerine Metotreksatın Etkisinin Araştırılması". IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 11-14 Eylül 2013, Elazığ.

6- Atakişi O, Yıldız Dalgınlı K, Aydın Y, Kanıcı A, Topçu B, Mert B, Gülmez C, Kaya R, Kart A, Atmaca N. "Dietilnitrozamin Toksisitesine Karşı Çörek Otu Yağının Total Oksidan ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi". IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 11-14 Eylül 2013, Elazığ.

7- Kanıcı A, Yıldız Dalgınlı K, Gülmez C, Atakişi O, Atakişi E, Aydın Y, Kaya R, Mert B, Ersan Y. "Karaciğer Dokusunda Fenilhidrazin Toksikasyonuna Karşı Panaks Ginsengin Etkisinin Araştırılması". IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 11-14 Eylül 2013, Elazığ.