

## Kestane Tohumundan (*Castanea sativa*) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Bahar BİLGİN SÖKMEN<sup>1\*</sup> Rıdvan İLGÜN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 28049 Giresun, Türkiye

<sup>2</sup>Giresun Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarı, 28049 Giresun, Türkiye

**Öz:** 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 esteraz aktivitesi gösteren homojenizatın % 90'lık (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kesiti elde edildi. Dializden sonra bu kesit sırasıyla hidrosilapatit ve DEAE-selüloz kolonlara uygulanarak lipaz enzimi 186,87 kez saflaştırıldı. SDS-PAGE elektroforezi sonucunda saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu. 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-NFM'a olduğu ve K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerinin sırasıyla 1,017 mM ve 163,874 U olduğu saptandı.

**Anahtar sözcükler:** Kestane (*Castanea sativa*) tohumu, lipaz, karakterizasyon, saflaştırma

Atf yapmak için: Bilgin Sökmen, B. & İlgün, R. (2018). Kestane tohumundan (*Castanea sativa*) lipaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 3(3), 101-106.

### Lipase Purification from the Seeds of chestnut (*Castanea sativa*) and Its Investigation of Some Kinetic Properties

**Abstract:** 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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. The purified enzyme, which showed SDS-PAGE, had a molecular weight of 30 kDa. It was found that the lipase purified from chestnut seeds had an optimum pH value of 9.0 and an optimum temperature of 30 °C. When affinity against various substrates of the enzyme is investigated, lipase affinity was found that have to p-NPM and its K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values were dedected 1.017 mM and 163.874 U, respectively.

**Keywords:** Kestane (*Castanea sativa*) tohumu, lipaz, karakterizasyon, saflaştırma

How to cite: Bilgin Sökmen, B. & İlgün, R. (2018). Lipase purification from the seeds of chestnut (*Castanea sativa*) and its investigation of some kinetic properties. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 3(3), 101-106.

### GİRİŞ

Lipazlar (E.C.3.1.1.3; trigliserol açilhidrolazlar), triaçilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Endüstride ve bilimsel araştırmalarda; hidroliz, esterleşme, trans esterleşme, peptid sentezi gibi reaksiyonları ve bölge seçimli, stereo seçimli mekanizmaları katalizlemekte kullanılırlar (Sharma vd., 2001). 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 (Paiva vd., 2000). Lipaz kullanım alanlarına süt ürünleri, unlu mamüller, içecekler, yiyecek soslari, et ve balık ürünleri, yağlar, kimyasallar ve temizlik ürünlerinde ilave edilmelidir (Şengel, 2007).

Hidrolitik enzimler arasında lipazlar en geniş kullanım alanına sahip enzimlerdir (Ünlü, 2004). Lipazlar kullandıkları substratların çeşitliliği ve ekstrem koşullarda (sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi ortamlarda) kararlı yapılarını koruyabilme sebeplerinden dolayı önemli biyokatalizörler arasındadırlar (Gupta vd., 2004; Hasan vd., 2006).

Bitkisel yağlı tohumlardan lipaz izolasyonu ve saflaştırılması üzerine literatürde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Bilgin Sökmen, 2005; Yeşiloğlu & Başkurt, 2008). Kestane tohumu bileşiminde de, proteinler ve yağlar gibi önemli besin ve bileşenler bulunmaktadır. Kayıngiller familyasında yer alan kestane, botanik sistematğinde Fagales Takımına ait olup, *Castanea Cinsi* ve *Castanea spp.* türü olarak yerini almaktadır (Subaşı, 2004).

Lipazlar birçok bitkisel, hayvansal ve özellikle mikroorganizmalardan saflaştırılmasına rağmen, bugüne kadar kestane tohumlarından saflaştırılmamıştır. Bu çalışmada, Giresun'da yetişen kestane tohumundan (*C. sativa*) lipaz enzimi ilk defa saflaştırılmış ve kinetik özellikleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla kestaneden lipaz enzimi çeşitli yöntemleriyle saflaştırılarak optimum sıcaklık, optimum pH, termal kararlılık, substrat spesifitesi,  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri gibi kinetik özellikleri esteraz aktivitesine göre tayin edilmiştir.

## MATERYAL ve METOD

**Ham Ekstrenin Hazırlanması, Amonyum Sülfat Çöktürmesi, Dializ, Hidroksil Apatit ve Dietilaminoetil (DEAE)-Selüloz Kolon Kromatografileri:** Ham ekstre hazırlamak için Blender yardımıyla parçalanmış kestane 1:7 (w/v) oranında 60 mM fosfat tamponu (pH= 7,0) içinde +4 °C'de manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırıldıktan sonra, ağzı kapatılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün homojenizat iki kat bezden süzüldü. 0 °C'de 18000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım alındı. Bu işlemlerin sonucunda Kestane tohumu ham ekstresi elde edildi. Ham ekstrede lipaz esteraz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı.

Kestane tohumu lipazı için uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu saptamak üzere % 10-90 konsantrasyon aralığında çöktürme yapıldı. Amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla +4 °C'de dializ edildi. Hidroksil apatit kolonuna 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. DEAE-selüloz kolonuna hidroksilapatit kolonundan elde edilen 100 mM'lık fraksiyon eluatu uygulandı. Kolondan sırasıyla yaklaşık 200 mL 0,5 mM fosfat tamponunda çözülmüş 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM ve 100 mM NaCl gradienti uygulandı.

**Lipaz Esteraz Aktivitesi ve Protein Tayini:** Lipaz enzimi esteraz ve hidrolaz olmak üzere iki farklı aktiviteye sahiptir. Çalışmamızda Kestane tohumu lipaz esteraz aktivitesi, substrat olarak p-nitrofenil asetat (p-NFA) kullanılarak spektrofotometrik olarak yapıldı (Erlanson, 1970). Bir deney tüpüne substrat ve enzim çözeltilerinden 0,5'er mL alınıp 0,5 mL 0,5 M Tris-HCl tamponu ilave (pH=7,4) edildi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip spektrofotometrede, 400 nm'de, absorbans ölçüldü. Bu absorbans değerinin p-nitrofenol regresyon denkleminin uygulanmasıyla enzim tarafından, oda sıcaklığında, 1 dakikada açığa çıkarılan p-nitrofenol miktarı  $\mu\text{mol/dakika}$  olarak belirlendi.

Kestane tohumundan lipaz saflaştırılmasının tüm adımlarında, protein miktarı tayin edildi (Lowry, vd., 1951). Hidroksiapatit ve DEAE-selüloz kolon kromatografileri ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktar tayinlerinde ise  $E_{280}/E_{260}$  yöntemi kullanıldı (Warburg & Christian, 1941).

**Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü:** Kestane lipazı, DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra yığıma jeli % 3, ayırma jeli ise % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970). Enzimin molekül ağırlığı standart proteinlerin molekül ağırlıkları yardımıyla grafikten hesaplandı.

**Kinetik Özelliklerin İncelenmesi:** Kestane tohumundan elde edilen lipazın esteraz aktivitesine göre kinetik özelliklerini, sıcaklık ve pH etkisini incelemek için DEAE-selüloz kolonundan elde edilen fraksiyonlar kullanıldı.

**Esteraz Aktivitesi Üzerine pH etkisi ve pH Stabilitesinin İncelenmesi:** Kestane tohumu lipazının optimum pH'sını belirlemek amacıyla 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -NaOH tamponu kullanıldı. Tüm denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Denemeler 3 kez yapılarak ortalamaları alındı. Değişik pH değerlerinde elde edilen esteraz aktivitesi optimum pH eğrisi çizildi.

Lipaz enziminin pH stabilite özelliğini belirlemek amacıyla; enzimin pH= 4,0-12,0 aralığında, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakika süreyle inkübasyonu sonrası koruduğu esteraz aktivitesi değerleri, 100 mM p-nitrofenil asetat substratı kullanılarak tayin edildi. Her bir pH'daki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürüldü. Zamana karşı % korunan aktivite grafiği çizildi.

**Optimum Sıcaklık ve Termal Stabilitenin İncelenmesi:** Enzim çözeltilerinden 3'er mL alınarak 10-70°C arasında, sıcaklık her defasında 10 °C arttırılarak, su banyosunda 30 dakika süre ile tutuldu. Oda sıcaklığına getirilen çözeltilerde lipaz aktivitesi tayin edildi. Denemeler 3 kez tekrarlanarak % aktivite değerleri hesaplandı.

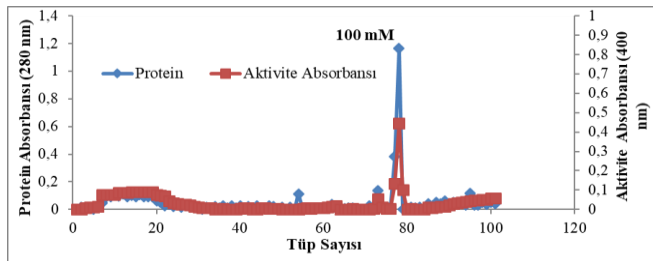
Lipaz enziminin termal stabilite özelliğini belirlemek amacıyla; enzimin 10-70 °C sıcaklıklarda 20-120 dakika süreyle inkübasyonu sonrası koruduğu esteraz aktivitesi değerleri ölçüldü. Her bir sıcaklıktaki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite

değerleri % aktiviteye dönüştürüldü. Zamana karşı % korunan aktivite grafiği çizildi.

**$K_m$  ve  $V_{max}$  Değerlerinin Hesaplanması:** Kestane tohumundan saflaştırılan lipaz enziminin sadece p-NFA'ya ilgisinin fazla olduğu saptandığından bu enzimin p-nitrofenil asetat için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri tayin edildi. Bu amaçla p-NFA, p-nitrofenil bütirat (p-NKB), p-nitrofenil kaprat (p-NFK), p-nitrofenil laurat (p-NFL) ve p-nitrofenil miristat (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 diğ. (1992) ile Winkler ve Stuckman (1979)'ın yöntemleri değiştirilerek tayin edildi (Vonderwulbecke vd., 1992; Winkler & Stuckman; 1979). Deneyler 10 defa tekrarlandı. En küçük kareler yöntemine göre Lineweaver-Burk doğru denkleminde ve grafikten p-NFA için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

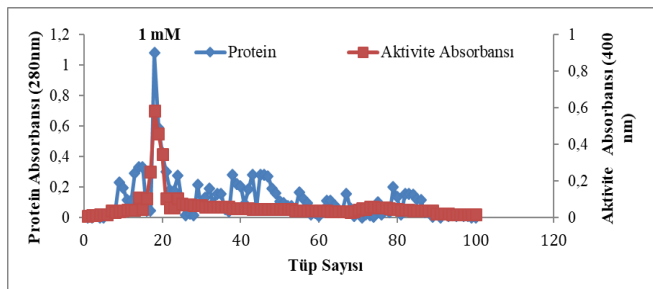
## BULGULAR

Kestane tohumu ham ekstresinde lipazı çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 90 olduğu belirlendi. Hidroksilapatit kolonunda kestane tohumu için yüksek lipaz aktivitesi 100 mM fosfat tamponu ile elde edilen elüatlarda bulundu (Şekil 1). En yüksek lipaz aktivitesi gösteren tüplerdeki elüatlar daha ileri bir saflaştırma için DEAE-selüloz kolonuna tatbik edildi.



**Şekil 1.** Kestane Tohumu Ham Ekstresinin % 90 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği.

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 2).



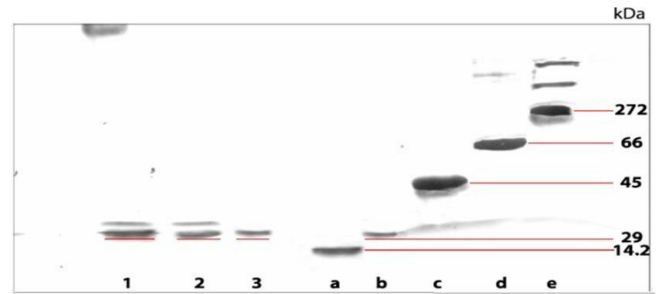
**Şekil 2.** Hidroksilapatit Kolonu 100 mM'lık Elüatının DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği.

Kestane tohumlarından lipazın saflaştırılma adımları ve bu adımlardaki aktivite ve saflaştırma kat sayıları Tablo 1'de gösterildi. Çalışmamızda kestane tohumu ham ekstresi hazırlama, amonyum sülfat kesiti, hidroksilapatit ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi evrelerinde lipaz aktivitesi, esteraz aktivitesi olarak tayin edildi. Kestane tohumlarından lipaz enzimi DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonucu 186,87 kez saflaştırıldı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Kestane Tohumlarından Lipazın Saflaştırılma Adımlarının 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
%60 Amonyum Sülfat Kesiti	501	12507	13,49	1,03
Dializat	158	4817	30,49	1,14
Hidroksilapatit Kolon Kromatografisi	38	9200	242,11	9,05
DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi	14	69958	4997	186,87

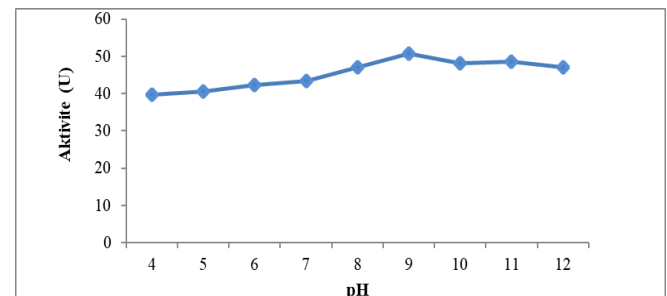
**SDS-PAGE Elektroforezi:** Saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE uygulanarak tek protein bandı içerdiği saptandı. Molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart proteinler ile çizilen eğriden lipazın molekül ağırlığının 30 kDa olduğu saptandı. (Şekil 3.).



**Şekil 3.** SDS-PAGE jel elektroforezi.

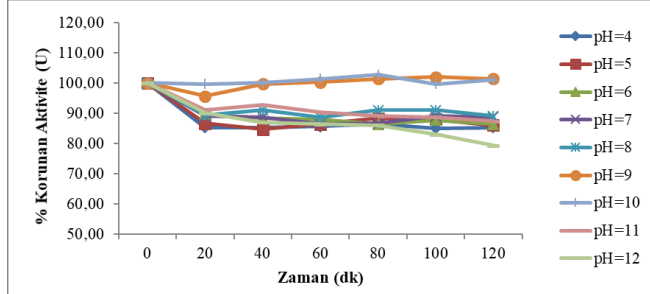
1. Ham ekstre, 2. Hidroksi apatit eluatı, 3. DEAE-selüloz enzim çözeltisi, a. Bovine milk laktalbumin (Mr = 14.2 kDa), b. Karbonik anhidraz (Mr = 29 kDa), c. Albumin (Mr = 45 kDa), d. Serum albumin (Mr = 66 kDa monomer, Mr=132 kDa dimer), e. Fasülyeden elde edilen üreaz (Mr= 272 kDa trimer, 545 kDa heksamer).

**Lipaz Esteraz Aktivitesine pH'nın Etkisi ve pH Stabilitesi:** Farklı pH'larda (pH=4-12) lipaz aktivitesinin 400 nm'de, 100 mM p-NFA substratı kullanılarak esteraz aktivitesi incelenmesi sonucunda kestane tohumu lipazının en yüksek aktiviteyi pH=9'da gösterdiği, pH=10'dan sonra aktivitenin azaldığı görüldü (Şekil 4).



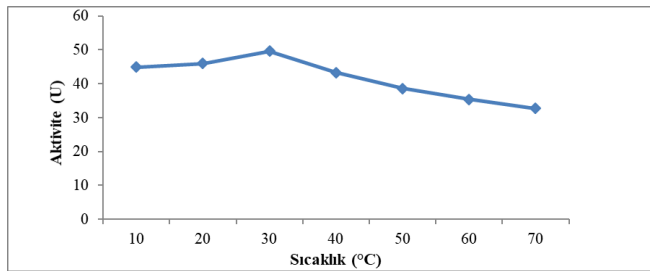
**Şekil 4.** Lipaz esteraz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

Esteraz aktivitesinin pH'a bağımlı stabilitesini belirlemek amacıyla 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 5).



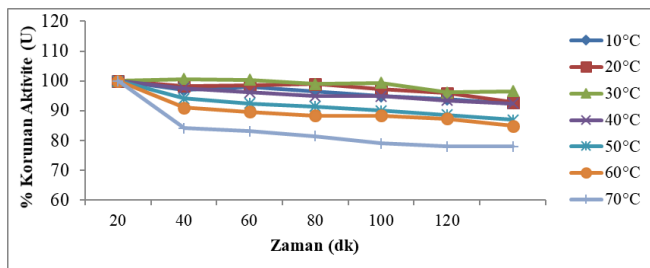
Şekil 5. Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH Stabilitesi.

**Lipaz Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi:** Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi 10-70 °C arasında p-NFA substratı kullanılarak incelendiğinde, en yüksek aktivitenin 30°C'de olduğu bulundu. Sıcaklığın daha da artmasıyla aktivitenin azaldığı saptandı (Şekil 6).



Şekil 6. Lipaz esteraz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

**Lipaz Esteraz Aktivitesinin Termal Stabilitesi:** Lipazın sıcaklığa bağımlı stabilitesini belirlemek amacıyla 10-70°C arasındaki sıcaklıklarda 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 7).



Şekil 7. p-Nitrofenil asetatın sıcaklık stabilitesi.

**Lipazın Farklı Substratlara Göre  $K_m$  ve  $V_{max}$  Değerleri:** Lipaz enziminin farklı substratları için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk denkleminin

yararlanılarak hesaplandı (Tablo 2). Tablo 2'deki değerlerden anlaşılacağı üzere lipazın substrat olarak en fazla ilgisinin p-NFM'a olduğu görüldü.

**Tablo 2.** Kestane tohumu lipazının farklı substratları için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri.

Substrat	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U)
p-NPA	1,579	526,31
p-NPB	1,176	285,71
p-NPC	1,064	212,76
p-NPL	1,042	178,57
p-NPM	1,017	166,66

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstrinin çeşitli alanlarında (Margarin, süt ve yağ endüstrisi, deterjan ve gıda endüstrisi, ilaç ve saf kimyasalların sentezi, kağıt imalatı, kozmetik endüstrisi, eczacılık ve tekstil gibi) kullanıma sahip olan lipazların, çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırıldığı ve bazı kinetik özelliklerinin incelendiği bildirilmektedir. Lipazın kestane tohumundan saflaştırılması ile ilgili literatürlerde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, kestane tohumu lipazı ilk kez saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

Enzimlerin çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasında, farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere göre çalışmalarda saflaştırma oranları da değişmektedir. Yapılan çalışmalarda lipaz, pirinç kepeğinden 7,6 kat (Bhardwaj vd., 2001), ayçiçek tohumundan 603 kat (Beisson vd., 1997), *Aspergillus niger*'den 50 kat (Namboodiri & Chattopadhyay, 2000) süttten izole edilen *Serratia marcescens*'ten 20,88 kat (Abdou, 2003) saflaştırılmıştır. Çalışmamızda kestane tohumu lipazı 186,87 kat saflaştırılmıştır.

Lipazın saflaştırılması evrelerinde, ham ekstre ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi çıkışlı enzim örneklerinde yapılan SDS-PAGE sonucunda, ham ekstreten birden fazla protein bandı içerdiği, DEAE-selüloz kolon kromatografisi sonucu elde edilen lipaz enziminin ise 30 kDa molekül ağırlığına sahip tek bir protein bandı içerdiği görüldü. Bitki lipazları ile ilgili yapılan çalışmalarda, lipazların molekül ağırlıklarının nispeten küçük olduğu, örneğin; *Jatropha curcas* L. tohum lipazının molekül ağırlığının 21,6 (Staubmann vd., 1999) pirinç kepeğinin 9,4 kDa (Prabhu vd., 1999), ayçiçek tohum lipazının 22 kDa (Beisson vd., 1997), olduğu bildirilmektedir.

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi ve dayanıklılığı üzerine yaptığımız çalışmalar sonucunda kestane tohumu lipazının optimum pH'sının 9,0 olduğu saptandı. 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.

Bitkisel kaynaklı yağlı tohumların lipaz aktivitesine etki eden pH değerleri üzerine yapılan çalışmalarda, kestane tohum lipazının optimum pH'sı 8-9, ayçiçek tohum lipazının optimum pH'sı 8-9 (Beisson vd., 1997), pirinç kepeği lipazının optimum pH'sı 7-7,5 (Prabhu vd., 1999), *Umbellularia californica* tohumlarından saflaştırılan lipazın optimum pH'sı 8,5 olarak (Haas vd., 2001) bulunmuştur. Kestane tohumu lipazının pH stabilitesi incelendiğinde enzim stabilitesinin pH 9'da en yüksek olduğu görülmektedir. Saflaştırılan enzimin optimum pH değeri ve dayanıklılığında 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 (Haas vd., 2001). Kestane tohumundan saflaştırılan lipazın 25°C (Bilgin Sökmen, 2005), palm yağı (*Elaeis guineensis*)'ndan saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığının 30°C, acı bakladan saflaştırılan lipazın ise 25°C olduğu bildirilmiştir (Sanz & Olais, 1990). Ayrıca literatürde enzimin 70°C sıcaklığa karşı bile stabil olduğu bulunmuştur (Dharmstithi & Ammaranond, 1997). 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, ülkemizde yetişen ve yurt dışına ihraç edilen kestane tohumlarından lipaz enziminin saflaştırılıp çeşitli endüstri alanlarında kullanılabileceği kanısındayız.

## TEŞEKKÜR

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

## KAYNAKLAR

- Abdou, M. A. (2003).** Purification and partial characterization of psychrotrophiz *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, **86**(1), 127-132. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73591-7
- Beisson, F., Gardies, A.M., Teissere, M., Ferte, N. & Noat, G. (1997).** An esterase neo synthesized in post-germinated sunflower seeds is related to a new family of lipolytic enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **35**(10), 761-765.
- Bhardwaj, K., Raju, A. & Rajasekharan, R. (2001).** Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. a new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*, **127**(4), 1728-1738. doi: 10.1104/pp.010604
- Bilgin Sökmen, B. (2005).** *Kayısı (Armeniaca vulgaris Lam.) tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi.* Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 137s.
- Dharmstithi, S. & Ammaranond, P. (1997).** Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **26**(2), 111-116. doi: 10.1111/j.1470-8744.1997.tb00455.x.
- Erlanson, C. (1970).** p-Nitrophenylacetate as a substrate for a carboxyl-ester hydrolase in pancreatic juice and intestinal content. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **5**(5), 333-336.
- Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. (2004).** Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbial Biotechnology*, **64**(6), 763-781. doi: 10.1007/s00253-004-1568-8.
- 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. doi: 10.1007/s11746-001-0390-0.
- Hasan, F., Aamer, A.S. & Hameed, A. (2006).** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**(2), 235-251. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680-685. doi: 10.1038/227680a0.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**(1), 265-275.

- Namboodiri, V.M.H. & Chattopadhyay, A. (2000).** Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids*, **35**(5), 495-502.
- Paiva, A.L., Balcao, V.M. ve Malcata, F.X. (2000).** Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**(3-5), 187-204. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00206-4.
- 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**(6), 1083-1089. doi: 10.1021/bp990122z.
- Sanz, L.C. & Olais, J.M. (1990).** Characterization of lupin seed lipase. *Food Chemistry*, **37**(3), 221-228. doi: 10.1016/0308-8146(90)90139-U.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001).** Research Review Paper: Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, **19**(8), 627-662. doi: 10.1016/S0734-9750(01)00086-6.
- 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. doi: 10.1016/S0168-1656(99)00151-0.
- Subaşı, B. (2004).** *Kestane Sektör Profili*, İstanbul Ticaret Odası Etüt ve Araştırma Şubesi, İstanbul.
- Şengel, B. (2007).** *Deterjan katkı maddesi olarak mikrobiyal kaynaklı lipaz üretim koşulları*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 174s.
- Ünlü, A.E. (2004).** *Candida Rugosa Lipazının özellikleri ve enantiyo seçimliliğinin artırılması*. Seminer. Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.
- Vorderwulbecke, T., Kieslich, K. & Erdmann, H. (1992).** Comparison of lipases by different assays. *Enzyme and Microbial Technology*, **14**(8), 631-639. doi: 10.1016/0141-0229(92)90038-P.
- Yeşiloğlu, Y. & Başkurt, L. (2008).** Partial purification and characterization of almond seed lipase. *Preparative Biochemistry Biotechnology*, **38**(4), 397-410. Doi: 10.1080/10826060802325592.
- Warburg, O. & Christian, W. (1941).** Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase. *Biochemische Zeitschrift*, **310**(6), 384-421.
- Winkler, U. K. & Stuckmann, M. (1979).** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, **138**(3), 663-670. doi: 0021-9193/79/06-0663/08\$02.00/0.

**Received date:** 18.04.2018

**Accepted date:** 12.06.2018

**\*Corresponding author's:**

Bahar BİLGİN SÖKMEN

Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Kimya Bölümü, 28049/Giresun, Türkiye

**E-mail:** bahar.sokmen@giresun.edu.tr

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3904-8178>