

Araştırma Makalesi

Antep Fıstığı (*Pistacia vera*) Tohumundan Lipaz Enziminin Safılaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi*

Duygu MERCAN ÜLKÜ¹, Müge GİDİŞ^{2*}, Metin BÜLBÜL²

¹Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı

²Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

*Sorumlu yazar: muge.gidis@dpu.edu.tr

Geliş Tarihi: 08.03.2019

Düzeltilme Geliş Tarihi: 16.07.2019

Kabul Tarihi: 16.07.2019

Özet

Hücrel yapılar için önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Son yıllarda lipazlar ile katı ve sıvı yağların enzimatik modifikasyonu giderek önem kazanmıştır. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan lipazlar genellikle mikroorganizma ve son zamanlarda da yağlı bitki tohumlarından elde edilmektedir. Kolay bulunabilmeleri, katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları gibi avantajları bulunan bitkisel kaynaklı lipazlar gıda, deterjan ve ilaç endüstrilerinde kullanılabilir. Yağların hidrolizlenme yeteneklerinden dolayı lipazlar evlerde deterjan ürünlerinde temizleme etkilerini arttırabilmek amacı ile katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada bol yağlı bir bitki tohumu olan Antep fıstığı tercih edilmiş ve safılaştırma işlemleri sonucunda enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Yağsızlaştırma işlemi sonucunda amonyum sülfat çöktürmesinde %30 doyumlukta ilk çökeltme gözlemlenmiş ve en yüksek enzim aktivitesi %50 ve %60 doyumlukta 5 ml NaOH eklendiğinde olmuştur. Kinetik özellikleri belirlenen Antep fıstığı bitki tohumu lipazının stabil ve optimum sıcaklık ve pH değerleri tespit edilip deterjan endüstrisinde kullanılan diğer lipaz enzimleri kinetik özellikleri ile karşılaştırılıp yorumlanmıştır. Antep fıstığı lipaz enzimi kinetik özelliklerinin deterjan endüstrisinde kullanımı uygun bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Antep fıstığı, lipaz enzimi, deterjan endüstrisi, kinetik özellikler.

Lipase Enzymatic Purification and Determination of Kinetic Properties of Antep Peanut (*Pistacia vera*) Seeds

Abstract

Enzymes play important metabolic functions for cellular structures and they are in our daily life and economical life for various purposes. In recent years, the enzymatic modification of lipases and fats and oils has become increasingly important. Lipases used in almost every field of industry are usually obtained from microorganism and recently from oil seeds. Plant-derived lipases can be used in food, detergent and pharmaceutical industries, with advantages such as their easy availability, their high catalytic activity and their inability to form unwanted by-products. Due to the hydrolytic ability of oils, lipases are used as additives with the purpose of increasing cleaning effects in detergent products in households. In this study, Antep peanut, which is an abundant fatty plant seed, was preferred and enzyme activities were determined as a result of the purification process. The first precipitation of ammonium sulfate precipitation at 30% saturation was observed as a result of degreasing process and the highest enzyme activity was when 5 ml NaOH was added at 50% and 60% saturation. The stability and optimum temperature and pH values of Antep peanut plant seed lipase with determined kinetic properties were

determined and compared with the kinetic properties of other lipase enzymes used in the detergent industry. The use of Antep peanut lipase enzyme kinetics in the detergent industry has been found suitable.

Key words: Antep peanut (*Pistacia vera*), lipase enzyme, detergent industry, kinetic properties.

Giriş

Enzimler canlı hücrede meydana gelen metabolizma reaksiyonlarını hızlandıran ve düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Sökmen, 2005). Yaşamsal olayların tümü enzim gerektirir. Besin öğeleri vücutta enzimlerin yardımı ile kullanılarak ve biyolojik ve kimyasal tepkimeler sonucunda vücut yapısına dönüştürülür (Seren, 2013). Enzimler hakkındaki bilgi çok eskilere dayanmaktadır. Maya anlamına gelen enzim terimi ilk kez Künhe tarafından kullanılmıştır (Aehle, 2007). İnsanlar yıllardır bilmeden de olsa günlük yaşamlarında enzim reaksiyonlarından faydalanmıştır (Hammamchi, 2014). Enzimlerin mikrobiyal yolla üretimleri yakın geçmişte büyük önem taşımaktadır. İlk kez 1897’de Buncher adlı araştırmacı yaşayan hücreden aktif enzim ayrılabilirliği göstermiş ve maya hücrelerinden enzimleri izole etmiştir (Casida, 1986). Son yıllarda sanayi dalında da uygulama alanı bulunan enzimler günümüzde yeni kullanım alanlarının ortaya çıkması ile birlikte giderek önem kazanmaktadır (Casida, 1986; Telefoncu, 1997). Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59’u proteazlar, %28’ini karbonhidrazlar, %3’ünü lipazlar oluşturmaktadır (Wiseman, 1995).

Lipazlar (Triaçilgliserol açıl hidrolaz, E.C.3.1.1.3) esterazlara dahil olup, tüm canlılar arasında geniş bir dağılım göstermektedir. Lipazlar suda çözülebilir substratları hidrolizlemelerine rağmen suda çözünmez lipid substratlarına karşı daha yüksek enzim aktivitesi göstermektedirler (Veeraragavan ve ark., 1990). Lipazlar, özellikle su-yağ fazı arasındaki iç yüzeyde substrata karşı katalitik etki göstererek, trigliseridleri; digliserid, monogliserid, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlemektedirler. Su ile karışmayan organik çözücülerde lipid substratlarının esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarında katalizlemektedir (Tocher ve Sargent, 1984; Gjellesvik ve ark., 1991). Lipazlar mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlardan elde edilirler (Jisheng ve ark., 2006; Yapaşan, 2008). Lipazlar üzerinde yapılan çalışmalar çok eskilere dayanmaktadır; 1846 yılında ilk kez pankreasta lipaz aktivitesi ve 1871’de bitkisel tohumlarda lipaz varlığının kanıtlanmıştır (Fogarty ve Kelly, 1990). Lipazların bitkilerdeki regülasyonu, lokalizasyonları ve tam olarak fizyolojik rolleri halen açık değildir (Sökmen, 2005; Patil, 2011). Son yıllarda bitkisel

lipazlar lipidlerin biyotransformasyonu için biyokatalizör olarak kullanıldığı için büyük önem taşımaktadır. Farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen lipazlara örnek olarak, buğday tohumu (Kapranchikov ve ark., 2004), badem tohumu (Başkurt, 2005), fındık tohumu (Kılıç, 2003), kayısı çekirdeği tohumu (Sökmen, 2005), pamuk (Akbulut, 2014) verilebilir. Bitkisel lipazlar substrat seçiciliği göstermektedirler. Hint yağı bitkisinin lipazının trisnoleine, palmye yağı lipazının trikoprin veya trilavrine karşı ilgisi fazladır (Fogarty ve Kelly, 1990). Bitki tohumlarının yanı sıra ağaçların değişik türlerinden de lipaz izole etmenin mümkün olabileceğini Teksas’dan Kuzey Kaliforniya’ya kadar yetişen *Sapiun sebiferum*’den (Çin Donyağı ağacı) elde edilen lipaz enzimi ile kanıtlanmıştır (Gao ve ark., 2008).

Ülkemiz Antep fıstığı üretimi bakımından önemli yere sahiptir (Pala ve ark., 1994). Antep fıstığı (*P. vera*) sakızağacıgiller familyasından kabuklu bir meyve türüdür. Yağlı ve ince kabuklu olan bu meyve ağaçta yetişir (MEGEP, 2010). Lezzetli bir meyve olan Antep fıstığı sert kabukludur ve sert kabuklu meyvelerin streoller, vitaminler, mineraller, yağ asitleri, fenolik bileşikler dahil olmak üzere sahip olduğu besin bileşenleri antioksidan ve antiproliferatif özellikleri onu daha etkin hale getirmektedir (Tsantili ve ark., 2011). Antep fıstığının yağ bileşenleri ortalamaları, % 14,63 doymuş yağ asitlerinden, % 85,39 doymamış yağ asitlerinden meydana geldiği bilinmektedir (Pala ve ark., 1994). Ortalama enerji düzeyi 625 kcal/100 g olarak bulunmuştur (Pala ve ark., 1994). Antep fıstığının 100 gramında; 500 mg Fosfor, 1020 mg Potasyum, 136 mg Kalsiyum, 5 mg E vitamini ve 7 mg C vitamini mevcuttur. Genel itibari ile yağlı bir tohum bitkisi olan Antep fıstığı yağ oranı %55 civarındadır (Yavuz, 2011).

Varlığı uzun zamandır bilinen ve çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin başında kuşkusuz lipaz enzimi gelmektedir. Uzun yıllardır mikrobiyal, fungal ve hayvansal kaynaklı lipaz enzimleri saflaştırılmaktadır. Son yıllarda deterjan endüstrisinde kullanılmak üzere bitkisel kaynaklı lipaz enzimleri saflaştırılmakta ve kullanım alanlarını belirlemek için kinetik özellikleri belirlenerek enzimlerin özgünlüğü ortaya koyulmaktadır. Her enzimin farklı etkileri ve görevleri olabileceği gibi özellikleri belirlenen enzimler kullanım amacına göre sınıflandırılmaktadır. Bitkisel kaynaklı lipaz enzimleri

literatürde incelendiğinde genellikle yağlı tohumlardan saflaşılabilmektedir. Antep fıstığı bitkisi genel itibari ile %55 civarında yağlı bir tohum olmasından dolayı bu çalışma için oldukça uygun bir bitkidir. Bu çalışmadaki amaç Antep fıstığı bitki tohumundan lipaz enzimi saflaştırarak, enzim aktivitesi ve kinetik özelliklerini belirlenmesi ile endüstriyel alanda kullanılabilirliğini tespit etmek ve sonrasındaki araştırmalara referans oluşturmaktır.

Materyal ve Yöntem

Antep fıstığından enzim eldesi için ilk aşama olarak kabuklarından ayrılmış ve öğütülmüştür. Aseton kullanılarak öğütülmüş olan Antep fıstığı yağlarından uzaklaştırılmıştır. Yağsızlaştırma işlemi, soğuk bir ortamda 4°C'de 45 dakika buz banyosunda karıştırıcı ile karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem yağdan iyice arınması amacı ile 2 kere tekrarlanmıştır. Filtre kâğıdından geçirilen homojenatın katı kısmı alınmış, petri kaplarına eşit bölünmüş ve etüvde asetonu uzaklaştırmak amacı ile 1 saat kadar bekletilmiştir. Yağı ve asetonu uzaklaştırılan homojenat üzerine 1:6 oranında 0,1 M fosfat tamponu (pH: 7,0) ilave edilerek 12 saat boyunca karıştırıcıda karıştırılmıştır. Tülbent bezinden süzülen süpernatant aktivite tayininde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

Lipazın aktivitesini tayini için, sodyumdesikat'dan 2 ml, %10'luk gum arabic'den 10 ml ve 0,05 M tris tamponun'dan 4 ml karıştırılmıştır. Sıcaklık 37°C sabitlenerek pH 7'ye ayarlanmıştır. Karışımın üzerine 1 ml enzim ilave edilerek 5 dakika boyunca karıştırılıp pH düşüşü izlenmiştir. Sonrasında 0,01 M NaOH karışıma yavaş yavaş eklenerek pH 7'ye ayarlanmıştır. Harcanan NaOH miktarı mililitre (ml) cinsinden hesaplanarak, Antep fıstığı bitkisinin enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

Kolona aktarılacak üzere, 3 g hidroksiapatit, 0,1M ve pH'ı 7,0 olan fosfat tamponu hazırlanmıştır ve kolona aktarılmıştır. Jel hazırlanması için 2 g Sephadex G-100 100 ml, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde yarım saat karıştırılarak jel oluşturulmuştur. Dekantasyon işleminden sonra oluşan jel kolona yavaş yavaş aktarılmıştır. Kolonun dengelenmesi ve jel içerisinde boşuk oranını azaltmak için kolondan tampon geçirilmiştir. Hidroksiapatitten geçirilen homojenat kolona yüklenmiştir. Kolondan geçen enzimler tüplere toplanmıştır.

SDS PAGE çalışması için %12'lik ayırıştırma jeli üzerine %3,75'lik yığma jeli ilave edilerek numuneler kuyuya yüklenmiştir. Daha sonra numuneler 100 Volt'da ve ortalama 150 dakika yürütülmüştür. Boyama işlemi için hazırlanan %0,1 Coomassie

Brilliant Blue R250 çözeltisi ve %10 metanol ve %7'lik asetik asit kullanılarak elde edilen renksizlendirme çözeltisi yıkama işleminde kullanılmıştır. Jel tamamen temizleninceye kadar yıkama işlemi devam etmiştir.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerlerini tespit etmek için pH'sı 4,4 ile 6,4 arası değişen 0,1M'lık sodyum asetat, pH'ı 6,8 ile 9,2 arası değişen 1 M'lık sodyum dihidrojen fosfat, pH'ı 9,6 ile 11,2 arası değişen, 1M'lık sodyum bikarbonat ve pH'ı 11,6 ile 13,2 olan disodyum hidrojen fosfat tamponlar hazırlanmıştır. Bu tamponlar ile yapılan aktivite tayini sonucunda enzimin en yüksek aktivite gösterdiği aralık tespit edilmiştir.

Enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklığı tespit etmek için 5°C'den başlayarak 5'er derece artacak şekilde 60°C'den kadar sıcaklık aralığında aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık kaydedilmiştir.

Jel kromatografisi sonucunda tüplere toplanan numunelerin aktiviteleri ölçülmüş ve en yüksek bulunan numuneler bir araya toplanmıştır. +4°C buzdolabında 15 günlük süre ile günlük olarak aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Jel kromatografisi sonucunda elde edilen numunelerin en yüksek aktivite gösteren örnekleri bir araya getirilip bir enzim havuzu oluşturuldu. pH değerleri 4,8, 5,2 ve 5,6 olan 0,1 M'lık sodyum asetat (NaCH₃COO) ile pH değerleri 6,4 ve 6,8 olan sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄) tamponları enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği stabil pH'ı belirlemek için hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında (25°C) beş gün süreyle kaydedilen enzim aktiviteleri ile enzimin stabil olduğu pH değeri tespit edilmiştir.

Jel kromatografisi işleminden sonra hidrolitik spesifik aktivite değeri en yüksek olan numuneler bir araya toplanmıştır. Lipaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği stabil sıcaklığı tespit etmek için 5°C ile 60°C sıcaklıkları arasında 7 gün optimum pH da aktivite ölçümleri yapılmıştır. En yüksek aktiviteyi veren stabil sıcaklık çalışmaları sonrasında kaydedilmiştir.

Jel kromatografisi işlemi sonunda birbirine yakın yüksek hidrolitik spesifik aktivite gösteren enzimler bir havuzda toplandı. K_m ve V_{max} kinetik sabitlerini bulunmak amacıyla substrat olarak kullanılan trioleinin farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100, 200, 500 µL) ve sabit hacimlerde havuzdaki enzimler kullanılması ile aktivite tayini yapılmıştır. Hız değerleriyle substrat konsantrasyonu arasında çizilen Michaelis-Menten grafiği yardımı ile K_m ve V_{max} değerleri tespit edilmiştir.

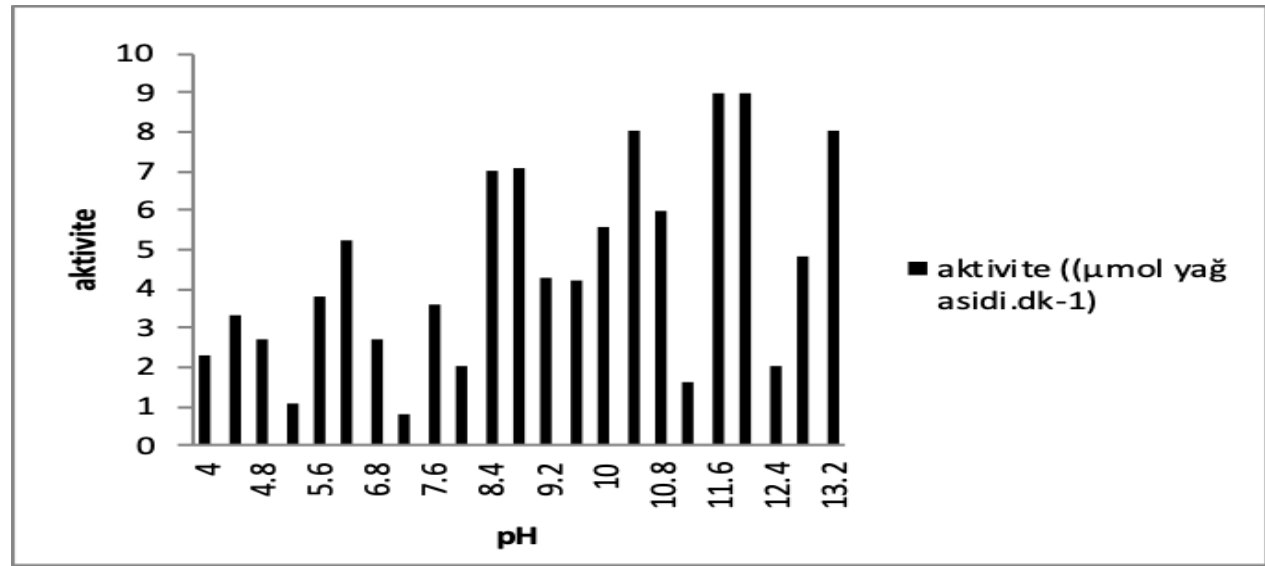
Bulgular ve Tartışma

Çalışmaya 100 gr Antep fıstığı ile başlanmış, yağsızlaştırma ve kurutma işlemlerinden sonra 48 gr kaldığı gözlemlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesinde %30 doygunlukta ilk çökelme gözlemlenmiş ve en yüksek aktivite %50 ve %60 doygunlukta 5 ml NaOH gözlemlenmiştir. Jel kromatografisi işleminden sonra, bu aktivite 8 ml NaOH'a kadar yükselmiştir. Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen enzimler elektroforez de yürütüldüğünde enzimin varlığı gözlemlenmiştir.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerlerini belirlemek amacı ile jel filtrasyon kromatografisinde hidrolitik spesifik aktivitesi yüksek olan enzimlerin bir araya toplanarak oluşturulan enzimleri, farklı pH aralıklarında hazırlanan tamponlarla aktivite değerlerine bakılarak aktivitesi belirlendi. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 11,6 olarak belirlenmiştir (Çizelge 1 ve Şekil 1).

Çizelge 1. Antep Fıstığı lipazının optimum pH değerleri

pH	Aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi. dk}^{-1}$)	pH	Aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi. dk}^{-1}$)	pH	Aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi. dk}^{-1}$)	pH	Aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi. dk}^{-1}$)
4	2.3	6.8	2.7	9.2	4.3	11.6	9
4.4	3.3	7.2	0.8	9.6	4.2	12	9
4.8	2.7	7.6	3.6	10	5.6	12.4	2
5.2	1.1	8	2	10.4	8	12.8	4.8
5.6	3.8	8.4	7	10.8	6	13.2	8
6.4	5.2	8.8	7.1	11.2	1.6		



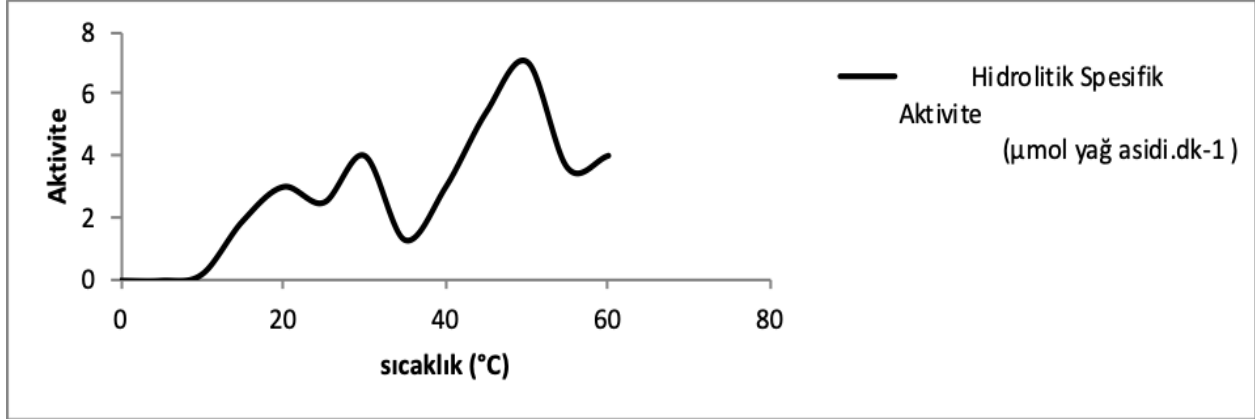
Şekil 1. Antep Fıstığı bitki tohumunun lipazının optimum pH'sı.

Çizelge 2. Antep Fıstığı tohumu lipazının optimum sıcaklık değerleri

Sıcaklık (°C)	Hidrolitik spesifik aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi. dk}^{-1}$)	Sıcaklık (°C)	Hidrolitik spesifik aktivite ($\mu\text{mol yağ asidi. dk}^{-1}$)
0	0	30	4
5	0	35	1.3
10	0.2	40	3
15	1.9	45	5.4
20	3	50	7
25	2.5	55	3.6
30	4	60	4

Antep fıstığı tohumu enzim saflaştırması sonrasında, kolondan toplanan enzim aktivitesi en yüksek olan örneklerde 0-60°C aralığında pH 7,0'da

lipaz aktivitesi ölçüldü. Bu ölçümlerin sonunda en yüksek hidrolitik spesifik aktivite sıcaklığı 50°C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2 ve Şekil 2).



Şekil 2. Sıcaklığın Antep fıstığı bitkisi lipazına etkisi.

Antep fıstığı ile yapılan enzim aktivite tayini çalışmasında Sephadex G-100 kolonundan geçen eluatlar arasında en yüksek aktivite gösteren örnekler bir araya toplanarak 4°C'de ortalama iki hafta boyunca optimum sıcaklık ve optimum pH'da depolama kararlılığı için aktivite tayini yapıldı. En yüksek depo kararlılığı birinci günde gözlemlenmiş ve sonraki günlerde düşüş gözlemlenmiştir (Çizelge 3 ve Şekil 3).

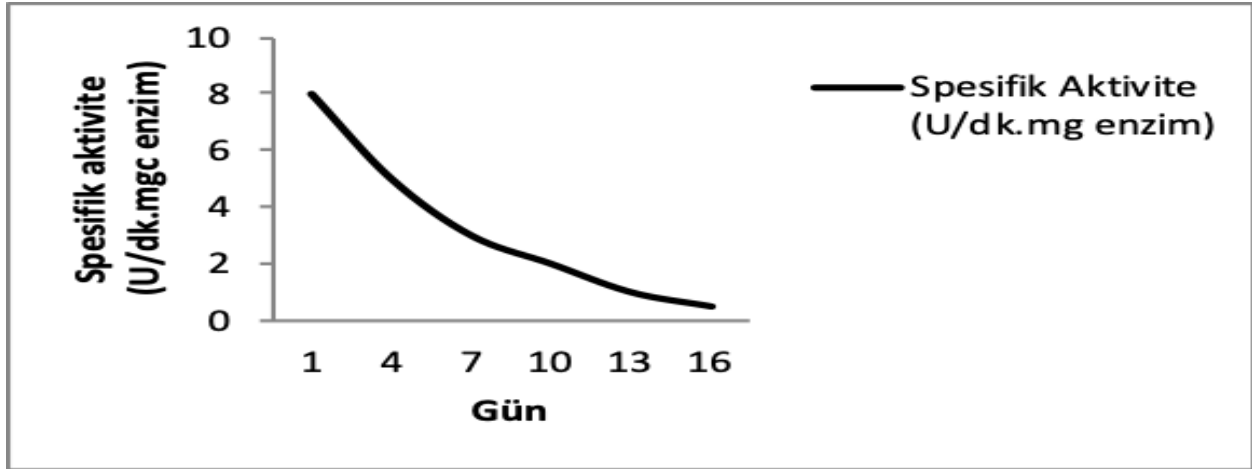
Enzimler yaşamsal olayların var olması için vücutta gereksinim duyulan olmazsa olmaz protein yapılı, özgün yapıda çalışan maddelerdir. Her enzimin etki ettiği substrat farklıdır. Belirli sıcaklık, pH ve zaman gibi parametrelerde aktivitesi belirlenir. Etki ettiği ya da etki edebilme olasılığı olan substratları belirlemek enzimin hangi alanlarda daha verimli olabileceği konusunda bize bilgiler verebilmektedir. Enzimlerin saf olarak eldesi için ilk önce yapılması uygun görülen işlem yağsızlaştırma işlemidir. Yağsızlaştırma işlemlerinde içerdikleri yağ oranı ve diğer elementler göz önüne alındığında tohumlar için farklı maddeler kullanıldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, Antep fıstığı yağsızlaştırma işlemi sırasında aseton kullanılırken kayısı tohumunun yağı uzaklaştırılırken petrol eteri kullanılmıştır (Sökmen, 2005). Petrol eteri içerdiği elementler açısından çabuk alev alan bir maddedir. Ayrıca, kaynama noktası asetona göre nispeten daha düşüktür. Bu işlem sonucunda elde edeceğimiz lipaz enzimi aktivitesi gerçeğe en yakın olarak tespit edilebilmektedir. Ayrıca ayçiçeği (Park ve ark., 2003), yer fıstığı (Hird ve ark., 2000), pamuk tohumu (Akbulut, 2014), lipaz enzimleri saflaştırma çalışmalarında yağsızlaştırma işlemlerinde de bu çalışmada olduğu gibi aseton kullanılmıştır.

Çizelge 3. Antep Fıstığı lipazının depo kararlılığı

Zaman (gün)	Spesifik aktivite (U/dk. mg enzim)
1	8
4	5
7	3
10	2
13	1
16	0.5

Ceviz (Demirkan, 2008), pamuk (Akbulut, 2014) ve çam fıstığı (Kılar, 2015) tohum proteinlerinde amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak hidrolitik spesifik aktivite aralığı tespit edilmiştir. Fakat Antep Fıstığı tohumunda bu yöntem elverişli bulunmayarak hidroksiapatit ve Sephadex G-100 kullanılarak jel filtrasyon yöntemi kullanılmıştır.

Enzimlerin aktivite tayinlerini yapabilmek için belirli bir substrata ihtiyacı vardır. Her enzimin etki ettiği substrat farklıdır. Enzimler yapıları gereği hücre içinde olduğu gibi hücre dışında da aktif yapıda bulunurlar. Saflaştırılan enzimler aktivite tayini için belirli bir substrat kullanılarak ölçülmektedir. Fakat enzim özgünlüğü nedeni ile bu substratlar farklı olabilmektedir. Bitkilerden elde edilen lipaz enziminin aktivite tayinini belirlemek için yapılan çalışmalarda 1999 yılında Piriç kepeği lipazı için en uygun substrat tribütirin olarak kabul edilirken (Prabhu ve ark.,1999), günümüze yakın olan çalışmalarda ceviz ve pamuk tohumları için en uygun substratın triolein olduğu görülmektedir (Demirkan, 2008; Akbulut, 2014). Antep fıstığı bitkisi aktivite tayini için kullanılan substrat ise zeytinyağı olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Antep fıstığı tohumunun lipazının depo kararlılığı.

Lipaz aktivitesini sıcaklık, pH gibi stabil ve optimum koşullarda etkileyen birçok parametre bulunmaktadır. Antep fıstığı lipazı bu etkilere belirli ve değişik sıcaklık ve pH değerlerine maruz bırakılarak ölçümler yapılmıştır. Bu çalışmada Antep fıstığı tohumu lipazının optimum pH değeri 11,6 olarak tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda elde edilen optimum pH değerleri ise; kolza tohumunda 9 (Hoppe ve Theimeri, 1996), hint yağı tohumunda 4,2 (Fuchs ve ark., 1996), pirinç kepeğinde 11 (Bhardwaj ve ark., 2001), buğday ve ceviz tohumunda 8 (Kapranichkov ve ark., 2004; Demirkan, 2008), pamuk tohumunda 10,8 (Akbulut, 2014) ve çam fıstığında 4,8 (Kılar, 2015) olarak bulunmuştur. Çam fıstığı lipazları optimum pH değerleri asidikken, pamuk ve Antep fıstığının optimum pH değerlerinin bazik olduğu gözlemlenmiştir.

Bitkisel kaynaklardan saflaştırılan lipaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklar her bitki için farklılık göstermektedir. Bhardwaj ve ark. (2001), yapmış oldukları çalışmada pirinç kepeği lipazının optimum sıcaklık derecesi 80°C tespit etmişken bu çalışmada Antep fıstığı lipazının optimum sıcaklık derecesi 50°C olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bitki lipazlarının optimum sıcaklık dereceleri ise cevizde 70°C (Demirkan, 2008), pamuk tohumunda 60°C (Akbulut, 2014), çam fıstığı tohumunda bu çalışmada olduğu gibi 50°C olduğu görülmüştür (Kılar, 2015). Araştırma yapılan bitkiler arasında en düşük sıcaklık ise palm yağı 30°C olarak bilinmektedir (Abigor ve ark., 1985).

Antep fıstığı tohumu lipazının stabil pH'ını belirlemek için 0,1 M'da pH'ı 4,8, 5,2 ve 5,6 sodyum asetat ile 6,4 ve 6,8 olan sodyumdihidrojenfosfat tamponları hazırlanıp beş gün boyunca optimum

sıcaklıktaki aktivitelerine bakılarak stabil pH'ının 5.6 olduğu görülmüştür. Pamuk tohumunda stabil pH 10 olarak bildirilmiştir (Akbulut, 2014).

Sonuç ve Öneriler

Lipazlar ilaç, kozmetik, gıda ve deterjan endüstrisinde uzun yıllardır kullanılan enzimlerdir. Yağların hidrolizlenme yeteneklerinden dolayı lipazlar, çeşitli endüstri alanlarında ve evlerde kullanılan deterjan ürünlerinde temizleme etkilerini arttırmak amacıyla katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Lipazlar, proteaz içeren deterjanların yıkama kapasitesini arttırarak trigliseritleri yağ asidi ve gliserole hidrolizleyerek yağlı yiyeceklerin lekelerinin ve kumaşlardaki sebumun çıkarılmasını sağlamaktadır. Deterjan endüstrisinde kullanılabilinecek lipazlar düşük substrat spesifitesine sahip olmakla birlikte yüksek pH (10-11) ve yüksek sıcaklıklara (30°C ve 60°C) dirençlidirler. NOVO/Nordisk firmasının Lipolase TM ürününü 1988 yılında piyasaya sürmesi ile lipazların deterjan endüstrisinde kullanımında yeni bir sayfa açılmıştır. Antep fıstığı bitkisi lipazının kinetik özellikleri diğer lipaz kaynakları ve deterjan endüstrisinde kullanılabilinecek enzim modelleri ile karşılaştırıldığında, yüksek pH ve yüksek sıcaklıklarda yüksek aktivite gösterebilme yeteneğinden dolayı deterjan endüstrisinde kullanılabilirliği gözlemlenmiştir. İzolasyonu gerçekleştirilen Antep fıstığı lipazının birçok kinetik özelliği belirlenmiş ve Antep fıstığı tohumunun lipaz kaynağı olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır. Bu çalışmada Antep fıstığı tohumu lipazının saflaştırma ve karakterizasyon prosedürü oluşturulmuştur. Antep fıstığı lipazının, kinetik özellikleri açısından incelendiğinde sanayi ve

endüstriyel uygulamalar açısından uygun bir enzim olduğu ve sonraki çalışmalarda bu alanlarda kullanılabileceği tespit edilmiştir.

‡: Bu makale Duygu MERCAN ÜLKÜ'nün yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Kaynaklar

- Abigor, D.R., Opute, I.F., Opoku, A.R., Osagie, A.U. 1985. Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(7): 599-606.
- Aehle, W. 2007. *Enzymes in Industry*. Wiley-VCH Verlag GmbH ve Co. KGaA, Weinheim, pp. 489.
- Akbulut, N. 2014. Pamuk Tohumundan (*Gossypium hirsutum* L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Kütahya.
- Başkurt, L. 2005. Badem (*Amygdalus communis* L.) Proteinlerinden Lipaz İzolasyonu ve Özelliklerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Bhardwaj, K., Raju, A., Rajasekharan, R. 2001. Identification, purification and characterization of a thermally stable from lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*, 127: 1728-1738.
- Casida, L.E. 1986. *Industrial Microbiology*. John Wiley and Sons Ins, New York, pp. 460.
- Demirkan, B. 2008. Ceviz (*Juglans regia* L.) tohumu lipazının saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Fogarty, W.M., Kelly, C.T. 1990. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Elsevier Science Publishers, New York, pp. 270.
- Fuchs, C., Vine, N., Hills, M.J. 1996. Purification and characterization of the acid lipase from the endosperm of castor oil seeds. *Journal of Plant Physiology*, 149(2): 23-29.
- Gao, Y.Y., Chen W.W., Lei, H., Liu, Y., Lin, X., Ruan, R. 2008. Optimization of transesterification conditions for the production of fatty acid methyl ester (FAME) from Chinese tallow kernel oil with surfactant-coated lipase. *Biomass and Bioenergy*, 33(29): 277-282.
- Gjellesvik, D.R., Lombardo, D., Walther B.T. 1991. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): Purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1124(2): 123-124.
- Hammamchi, H. 2014. *Rhodotorula mucilaginosa*'dan Lipaz Enzimi Üretimi ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Hird, H., Pumpery, R., Wilson, P., Sunderland, J., Reece, P. 2000. Identification of peanut and hazelnut allergens by native two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 21(139): 2678-2683.
- Hoppe, A., Theimer, R.R. 1996. Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsion phytochemistry. *Phytochemistry*, 42(4): 973-978.
- Jisheng, M. Z., Zhang, Z., Wang, B., Kong, X., Wang, Y., Cao, S. 2006. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, 45(1): 22-29.
- Kapranchikov, V.S., Zhrebtsov, N.A., Popova, T.N. 2004. Purification and characterization of lipase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Germ. Applied Biochemistry and Microbiolog*, 40(1): 84-88.
- Kılar, G. 2015. Çam Fıstığı Tohumundan (*Pinus pinea* L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Kılıç, İ. 2003. Batı Karadeniz Bölgesinde Yetiştirilen Fındık (*Corylus avellane* L.) Tohumundan Lipaz İzolasyonu ve Katalitik Özelliklerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- MEGEP (Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi), 2010. Antep Fıstığı Yetiştiriciliği, Ankara.
- Pala, M., Açıktur, F., Löker, M., Yıldız, M., Ömeroğlu, S. 1994. Fındık çeşitlerinin bileşimi ve beslenme fizyolojisi açısından değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 20: 1205-1212.
- Park, J.Y., Kim, I.S., Kim, S.Y. 2003. Structure and mucous histochemistry of the intestinal respiratory tract of the mud loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 215-219.
- Patil, J.K., Chopda, M.Z., Mahajan, R.T. 2011. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(8): 971-977.
- Seren, Ş. 2013. *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarından İzole Edilen Lipazın

- Karakterizasyonları. Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Sökmen, B.B. 2005. Kayısı (*Armeniaca vulgaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi.
- Telefoncu, A. 1997. Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskısı, 21-27 Eylül, Kuşadası, s. 249-306.
- Tocher, D.R., Sargent, J.R. 1984. Studies of triacylglycerol, wax ester and sterol ester hydrolases in intestinal caeca of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diet rich in triacylglycerols and wax esters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 77 (3): 561-571.
- Tsantili, E., Konstantinidis, K., Christopoulos, M.V., Roussos, P.A. 2011. Total phenolic and flavoids and total antioxidant capacity in Pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts in relation to cultivars and storage conditions. *Scientia Horticulturae*, 129(4): 649-701.
- Veeraragavan, K., Colpitts, T., Gibbs, B.F. 1990. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1044(1): 26-33.
- Wiseman, A. 1995. Introduction to Principles. In: editor. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. (ed.) Wiseman, A., Ellis Horwood Ltd. T.J. Press, Padstow, Cornwall, UK, 3-8.
- Yapaşan, E. 2008. Partial Purification and Characterization of Lipase Enzyme From a *Pseudomonas* Strain. Master of Science School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology.
- Yavuz, G. 2011. Sert kabuklu meyveler/ Antep fıstığı. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü TEPGE, Bakış, 5: 1303-1346.