

Papatyadan (*Matricaria chamomilla* L.) Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi

Bahar BİLGİN SÖKMEN^{1*}, Burçak SARI¹, Tuğba AZAP¹

¹Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 28100, Giresun, TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.02.2018

Kabul Tarihi: 14.03.2018

*Sorumlu Yazar: bahar.sokmen@giresun.edu.tr

Özet

Bu çalışmada, Giresun İli ve çevresinde bol miktarda yetişen papatyadan (*Matricaria chamomilla* L.) lipaz enzimi ilk defa saflaştırıldı ve kinetik özellikleri incelendi. Lipaz esteraz aktivitesi gösteren homojenizatın % 70'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kesiti elde edildi. Dializden sonra bu kesit DEAE-selüloz kolonlara uygulanarak lipaz enzimi 26 kat saflaştırıldı. Saflaştırma işlemlerinde protein miktarı Lowry ve E_{280}/E_{260} Warburg yöntemlerine göre, lipaz esteraz aktivitesi ise Erlanson yöntemine göre tayin edildi. SDS-PAGE elektroforezi ile elde edilen saflaştırılmış enzimin molekül ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu. Optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendi. Papatyadan saflaştırılan lipazın optimum pH'sının 9, optimum sıcaklığının 50 °C olduğu bulundu. Enzimin çeşitli substratlara karşı ilgisi incelendiğinde, lipazın ilgisinin en çok p-nitrofenil palmitatta olduğu ve bu substrata karşı K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 0,2899 mM ve 144,93 Ünite olduğu saptandı. Ayrıca, papatyadan saflaştırılan lipaz enzimi çeşitli taşıyıcılar üzerine adsorpsiyon, kovalent ve iyonik bağlama yöntemleri ile immobilize edildi. İmmobilize edilmiş papatyada lipazın optimum pH, optimum sıcaklık gibi kinetik özellikleri de incelendi.

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

Lipase Enzymes Purification from the Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and Its Immobilization on Various Supports

Abstract

In this study, lipase enzyme was firstly purified from chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) which is abundant in Giresun (Turkey) and surroundings and the kinetic properties of the enzyme were investigated. 70 % of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction of lipase esterase activity homogenate was obtained. After dialysis, this fraction was applied to DEAE-cellulose column, and lipase was purified 26 times. In the purification process, the protein amount was determined by using Lowry and E_{280}/E_{260} Warburg methods while lipase esterase activity was assayed with Erlanson's method. It was found that the purified enzyme, which obtained with SDS-PAGE electroforesis, had a molecular weight of 30 kDa. The optimum pH and temperature values were determined. It was found that the lipase purified from chamomile had an optimum pH value of 9 and an optimum temperature of 50 °C. When the affinity against different substrates of the enzyme was examined, the highest value was determined in p-nitrophenyl palmitate, with respectively K_m and V_{max} values being 0.2899 mM and 144.93 Units. Also, the lipase enzyme purified from chamomile was immobilized on various carriers by adsorption, covalent and ionic binding methods. The kinetic properties of the immobilized chamomile lipase such as optimum pH, optimum temperature were also studied.

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

1. Giriş

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolazlar, E.C. 3.1.1.3), yağ-su ara yüzeyinde triacilgliserollerin hidrolizini katalizleyerek di- ve monoacilgliserollere ve gliserole dönüştürme (Veeraragavan ve ark.1990, Mogensen ve ark., 2005); susuz ortamda ise ester bağlarını sentezleme özelliğine sahip enzimlerdir (Kim ve ark., 1996). Hidroliz, çeşitli esterleşme reaksiyonları, lipid sentezleri (Hong ve ark., 1988), biyotransformasyon, organik sentezler gibi çeşitli reaksiyonları katalizleyen ve yağ kimyası, deterjan, gıda, deri, kağıt, kozmetik, farmasötik, mandıracılık gibi biyoteknoloji ve endüstri alanlarında çok fazla kullanılan lipaz enzimi, memelilerin pankreas ve bağırsaklarından, mantarlardan (Fuciños ve ark., 2005, Sağıroğlu ve ark., 1993) mikroorganizmalardan, hayvansal ve bitkisel kaynaklardan farklı metodlarla saflaştırılmıştır (Taipa ve ark., 1992, Fuciños ve ark. 2005).

Hidrolitik lipazların ticari olarak kullanım alanı deterjanlardır. Toplam lipaz kullanımının %32'si deterjan endüstrisinde gerçekleşmektedir (Rúa ve ark., 1993). Lipaz kullanım alanlarına süt ürünleri, unlu mamüller, içecekler, yiyecek sosları, et ve balık ürünleri, yağlar, kimyasallar ve temizlik ürünlerinde ilave edilmelidir (Mohamed ve ark., 2000). Lipaz enzimleri, hidrolitik enzimler arasında en yaygın kullanım alanına sahip enzimlerdir. Lipazlar, etki ettikleri substratların çeşitliliği ve sıcaklık, pH gibi ekstrem koşullarda kararlı yapılarını koruyabildiklerinden dolayı önemli biyokatalizörler arasında yer alırlar (Sharma ve ark., 2001).

Papatya bitkisi, *Asteraceae (Compositae)* familyasına ait olup, bu familyadaki bitkilerin çoğu otsu, az bir kısmı çalı veya ağaçtır. *Asteracea* ailesindeki bitkilerin halk hekimliğinde kullanılan birçok türü mevcuttur. Bu çalışmada kullanılan papatya (*Matricaria chamomilla*) ülkemizde mayıs papatyası olarak bilinmektedir. Mayıs papatyası çiçeklerinin sahip olduğu uçucu yağın en önemli maddesi kamazulendir ki; bu madde yaygın olarak eczacılıkta, yiyecek, parfüm ve tatlandırıcı (çeşni) sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Arslan, 2012).

Bu çalışmada, Giresun'da yetişen papatya bitkisinden (*Matricaria chamomilla* L.) lipaz enzimi ilk defa saflaştırılmış, çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmiş ve kinetik özellikleri incelendi.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, petrol eteri (40-60 °C), amonyum sülfat, Tris, sığır serum albümini, Folin C ayırıcı, dipotasyum tartarat, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, sodyum asetat, metanol, asetik asit, gliserin, deniz kumu, glutaraldehit, 3-aminopropiltrioksi silan, Coomassie Brilliant Blue R-250, NaCl, H₂SO₄, toluen, aseton, HCl Merck (Darmstadt, Germany); bakır sülfat, dializ kesesi {D-9527 genişliği 43 mm (1,7"), çapı 27 mm (1,1")}, dietil amino etil (DEAE)-selüloz, dimetilsülfoksit (DMSO), p-nitrofenil asetat (p-NFA), p-nitrofenil butirat (p-NFB), p-nitrofenil palmitat (p-NFP), p-nitrofenil kaproat (p-NFK), p-nitrofenil laurat (p-NFL) ve p-nitrofenil miristat (p-NFM), sodyum dodesil sülfat (SDS), glisin, N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED), amonyum persülfat, akrilamid, bisakrilamid, cam boncuk (çapı 212-300µ), alümina, Amberlite IRA-900 Sigma-Aldrich (Germany); p-nitrofenil asetat (p-NPA), Silikajel 60, alumina Fluka firmasından sağlandı.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Hazırlanan ekstrelerin ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi çıkışında elde edilen fraksiyonların saklanması için Arçelik marka Nofrost ve dondurucusu kullanıldı. Absorbans ölçümleri, Shimadzu UV Mini-1240 model UV-VIS Spektrofotometrede okundu. Blender King, pH metre Butech, hassas terazi Sartorius, manyetik karıştırıcı Chiltern Hotplate HS 31, vorteks Velp Scientifica, su banyosu Memmert, sonik su banyosu Selectra, soğutuculu santrifüj Sigma 3K 30, Molekül ağırlığı tayini Bio-Rad Marka elektroforez cihazıyla yapıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Saflaştırma İşlemleri

Papatya (*Matricaria chamomilla*) bitkisi bir blender yardımıyla parçalanıp yağının uzaklaştırılması amacıyla petrol eteri (40-60 °C) ile sokslet ekstraksiyonu yapıldı. Yağı uzaklaştırılmış papatya, ham ekstre hazırlamak üzere 1:7 (w/v) oranında 60 mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile +4 °C'de manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırıldıktan sonra, bir gece bekletildi. Ertesi

gün homojenizat iki kat bezden süzüldü. 0 °C'de 18000 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım alındı. Bu işlemlerin sonucunda papatya ham ekstresi elde edildi. Ham ekstrede lipaz esteraz aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapıldı. Papatya ham ekstresinin uygun amonyum sülfat konsantrasyonunu saptamak üzere % 10-90 arasında çöktürme yapıldı. Amonyum sülfatı uzaklaştırmak amacıyla +4 °C'de, 100 mM fosfat tamponu (pH=7,0) ile dializ işlemi yapıldı ve DEAE-selüloz kolonuna uygulandı. Kolondan 0,5 mM fosfat tamponunda çözülmüş 10-500 mM NaCl gradienti uygulandı. Fraksiyonların spektrofotometrede 280 nm'de absorbansları okunarak elüsyon grafiği çizildi. Ayrıca, elüsyonlardaki lipaz aktivitesi tayin edilerek aktivite değerleri de aynı grafikte gösterildi. Çözelti uygun hacimlere bölünerek, daha sonra kinetik özellikleri incelemede kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

2.2.2. Protein Miktar Tayini

Papatya bitkisinden lipazın saflaştırılması sırasında, ham ekstre ve % 70'lik amonyum sülfat fraksiyonunun elde edilmesi evrelerinde, protein miktarı Lowry yöntemine göre tayin edildi (Lowry ve ark., 1951). DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardaki protein miktar tayinlerinde ise E₂₈₀/E₂₆₀ Warburg yöntemi kullanıldı (Warburg ve Christian, 1941).

2.2.3. Lipaz Esteraz Aktivite Tayini

Lipaz esteraz aktivitesi, Erlanson'a göre substrat olarak p-NFA kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi (Erlanson, 1970). Bir deney tüpüne substrat ve enzim çözeltilerinden 0,5'er ml konarak, 0,5 ml 500 mM Tris-HCl tamponu ilave (pH=7,4) edildi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkube edildi ve 400 nm'de absorbansı okundu. Bu absorpsiyon değerinin p-nitrofenol regresyon denkleminde uygulanmasıyla enzim tarafından, oda sıcaklığında, 1 dakikada açığa çıkarılan p-nitrofenol miktarı µmol/dakika olarak belirlendi. Bir ünite enzim aktivitesi; 1 dakikada açığa çıkan p-nitrofenol'ün miktarıdır (µmol/dakika).

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

Papatya bitkisi lipazının DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi, Laemmli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970).

2.2.5. Esteraz Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Papatya bitkisinden elde edilen lipazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla enzimin pH = 4-12 aralığında gösterdiği esteraz aktivitesi ölçüldü. pH = 4-5 aralığında asetat tamponu, pH = 6-8 aralığında fosfat tamponu, pH = 9-10 aralığında glisin-NaOH tamponu, pH = 11-12 aralığında ise Na₂HPO₄-NaOH tamponu kullanıldı. Tüm denemeler oda sıcaklığında ve 3 kez gerçekleştirildi.

Enzim çözeltisi 10-70 °C arasında, sıcaklık her defasında 10 °C artırılarak, su banyosunda 30 dakika süre ile tutuldu. Oda sıcaklığına getirilen çözeltilerde lipaz aktivitesi tayinleri yapıldı. Denemeler 4 kez tekrarlanarak ortalamaları alındı ve % aktivite değerleri hesaplandı.

2.2.6. Papatya Lipazının K_m ve V_{max} Değerleri

Papatya bitkisinden saflaştırılan lipaz enziminin sadece p-nitrofenil asetata ilgisinin fazla olduğu saptandığından bu enzimin p-nitrofenil asetat için K_m ve V_{max} değerleri tayin edildi. Bu amaçla p-NFA, p-NFB, p-NFP, p-NFK, p-NFL ve p-NFM'in 0,25 mM, 0,5 mM, 2,0 mM, 4,0 mM, 6,0 mM ve 8,0 mM'lık izopropil alkoldeki çözeltileri hazırlandı. Enzim aktivitesi Vonderwulbecke ve arkadaşları (1992) ile Winkler ve Stuckman (1979)'ın yöntemleri değiştirilerek tayin edildi (Vorderwulbwecke ve ark., 1992; Winkler and Stuckmann, 1979). Deneyler 3 kez tekrarlandı. En küçük kareler yöntemine göre Lineweaver–Burk doğru denkleminde ve grafikten p-nitrofenil asetat için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

2.2.7. Papatya Lipazının İmmobilizasyonu

Papatya lipazı, kovalent, iyonik ve adsorpsiyon yöntemleri ile çeşitli taşıyıcılara immobilize edildi. Reaktif olmayan taşıyıcılar öncelikle çeşitli reaksiyon ve yıkama işlemleri ile aktifleştirildi. Silikajel, deniz kumu ve gözenekli cam, kovalent bağlama; Alümina ve gözenekli olmayan cam boncuk adsorpsiyon; Amberlite IRA-900 ise iyonik bağlama yöntemleri ile enzime immobilize edildi (Yağar, 2000). Kurutulmuş olarak elde edilen immobilize enzimler aseton ile iyice yıkanarak tutuklanmayan veya zayıf tutuklanan enzimler uzaklaştırıldı. Vakumlu desikatörde kurutulduktan sonra derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein tayinleri yapıldı ve enzimin çeşitli taşıyıcılardaki % tutuklanmaları hesaplandı.

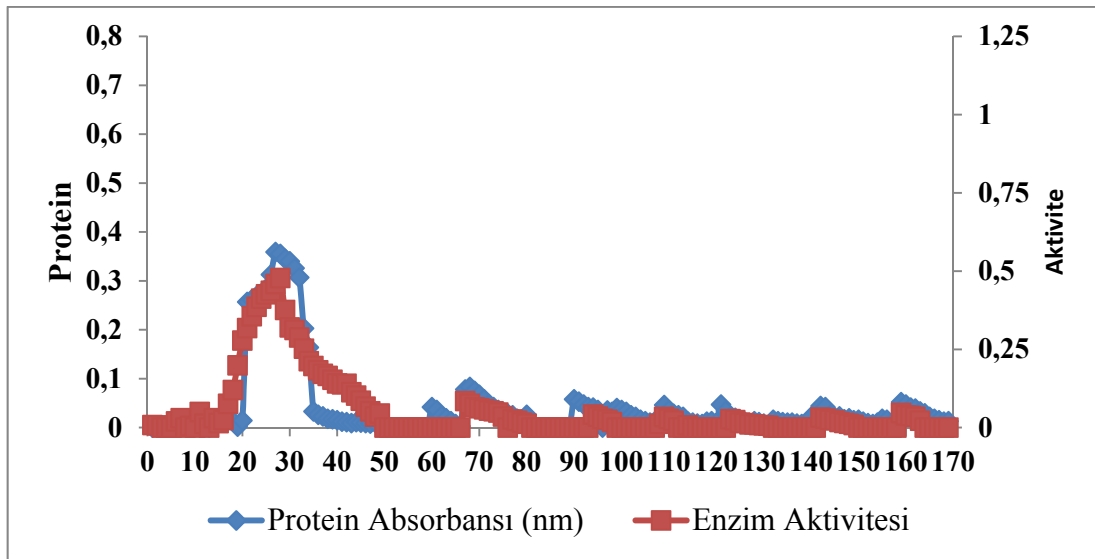
2.2.8. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

İmmobilize lipazın optimum pH'sı serbest enzimdeki tamponlar kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirildi. İmmobilize enzim 10-70 °C arasında, sıcaklık her defasında 10 °C arttırılarak, su banyosunda 30 dakika süre ile tutuldu. Denemeler 10 kez tekrarlanarak ortalamaları alındı ve hem pH hem de sıcaklık için % aktivite değerleri hesaplandı.

3. Bulgular

3.1. Kromatografi ve Saflaştırma Tablosu

Papatya lipazını çöktüren uygun amonyum sülfat konsantrasyonunun % 70 olduğu belirlendi. 100 mM fosfat eluatının DEAE-selüloz kolonuna uygulanması sonucunda lipazın 1 mM NaCl/0,5 M fosfat tamponu ile tek pik şeklinde olduğu gözlemlendi (Şekil 1). Papatya bitkisinden lipazın saflaştırılma evreleri ve bu evrelere ait sonuçlar Tablo 1'de gösterildi. Papatya bitkisinden lipaz enzimi DEAE- selüloz kolon kromatografisi sonucu 26 kat saflaştırıldı (Tablo 1).



Şekil 1. Papatya Ham Ekstresinin % 70 Amonyum Sülfat Fraksiyonunun DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi Elüsyon Grafiği

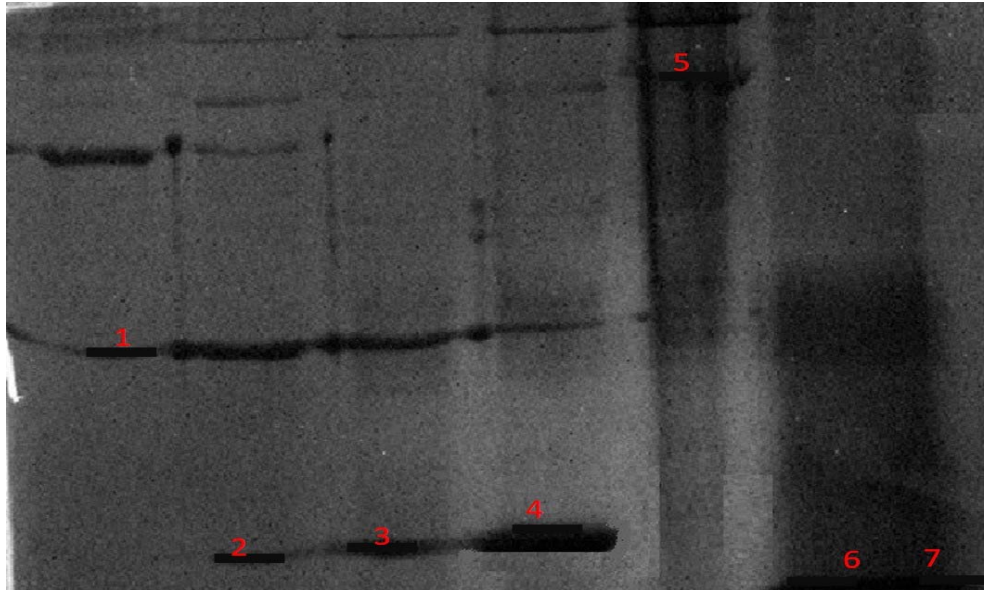
Kolon Boyutu: 1.4x10 cm, Kolona uygulanan protein: 200 mg/ml, Elüsyon tamponları: pH'sı 7,0 olan 0,5 mM sodyum fosfatta çözülmüş 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM NaCl.

Tablo 1. Papatyadan Lipazın Elde Edilme Evrelerinin Esteraz Aktivitesine Göre İncelenmesi

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

3.2. 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 2).

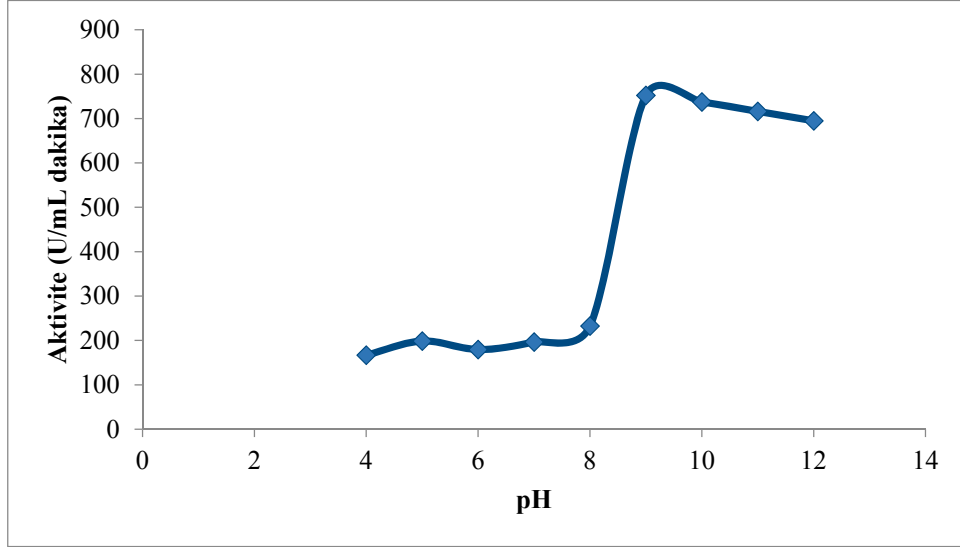


Şekil 2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Bovine serum albumin (Mr = 14,2 kDa), 2. Karbonik anhidraz (Mr = 29 kDa), 3. Serum albumin (Mr = 45 kDa), 4. Alfa lakta albumin (Mr=132 kDa), 5. Üreaz (Mr= 272 kDa), 6. Ham ekstre (Mr = 20,5 kDa), 7. DEAE-selüloz enzim çözeltisi (Mr =30 kDa)

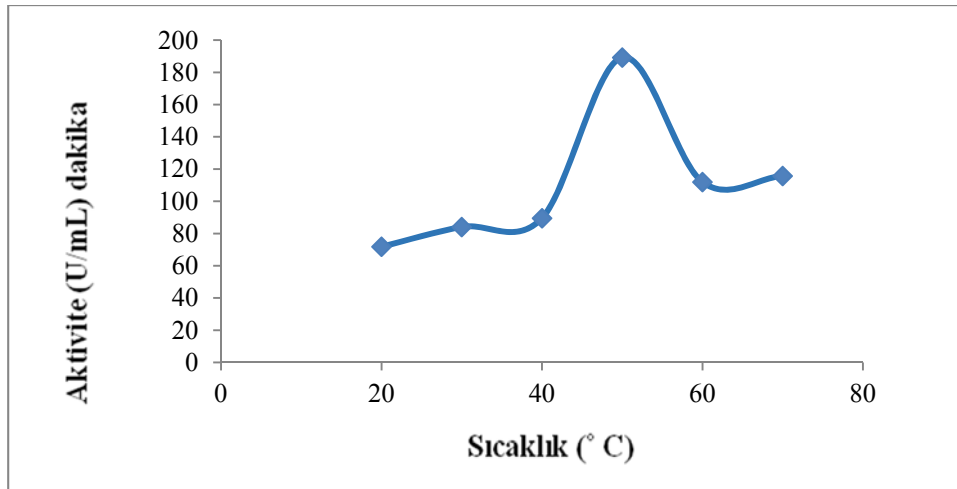
3.3. Lipaz Esteraz Aktivitesine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Farklı pH'larda (pH = 4-12) lipaz aktivitesinin 400 nm'de, 100 mM p-nitrofenil asetat substratı kullanılarak Erlanson yöntemine göre incelenmesi sonucunda papatya bitkisi lipazının en yüksek aktiviteyi pH = 9-12 aralığında gösterdiği görüldü (Şekil 3).



Şekil 3. Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

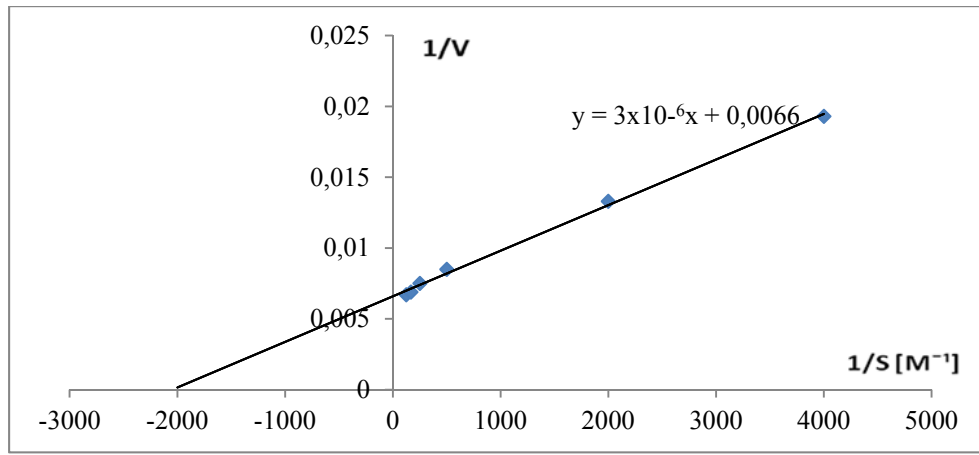
Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi 10-70 °C arasında p-NFA substratı kullanılarak incelendiğinde, en yüksek aktivitenin 50 °C'de olduğu bulundu. Sıcaklığın daha da artmasıyla aktivitenin azaldığı saptandı (Şekil 5).



Şekil 4. Lipaz Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

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

Lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk denkleminden yararlanılarak hesaplandı (Tablo 2). Lipazın substrat olarak en fazla ilgisinin p-NFA'ta olduğu görüldü (Şekil 5).



Şekil 5. p-Nitrofenil Asetat Konsantrasyonunun Lipaz Esteraz Aktivitesine Etkisi

Tablo 2. Papatya Lipazının Farklı Substratları İçin K_m ve V_{max} Değerleri

Substrat	K_m	K_m (mM)	V_{max} (U)
p-NPA	0,000454	0,4545	151,52
p-NPB	0,000416	0,4167	138,89
p-NPK	0,000389	0,3896	129,87
p-NPL	0,000422	0,4225	140,85
p-NPM	0,000410	0,4109	136,99
p-NPP	0,000289	0,2899	144,93

3.5. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları

Çeşitli taşıyıcılara farklı immobilizasyon yöntemleri ile immobilize edilen lipazın bu taşıyıcılardaki % tutuklanmaları Tablo 3'te verildi. Lipaz enziminin 98,12 oranında kovalent bağlama yöntemine göre, silikajele immobilize edildiği görüldü. Adsorpsiyon metoduna göre yapılan immobilizasyon yönteminde, lipaz enziminin en düşük oranda Aluminaya adsorplandığı bulundu.

Tablo 3. Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmiş Lipaz Enziminin % Tutuklanmaları

Taşıyıcı	İmmobilizasyon Şekli	% Tutuklanma
Alumina	Adsorpsiyon	16,71
Deniz kumu	Kovalent	98,44
Cam Boncuk	Kovalent	23,80
Silika jel	Kovalent	32,81
Cam boncuk	Adsorpsiyon	13,70
Amberlite IRA-900	İyonik	11,50

3.6. İmmobilizasyonun Lipaz Esteraz Aktivitesinin pH ve Sıcaklık Değerlerine Etkisi

Serbest ve immobilize papatya lipazlarının optimum pH değerleri Tablo 4'te verildi. Buna göre immobilize lipazların optimum pH değerlerinin yaklaşık 10 civarında olduğu görüldü. Bu çalışmada papatya lipazının da optimum pH değerinin değeri 9 olarak bulunmuştu (Şekil 3).

İmmobilize lipazların optimum sıcaklığının 40 °C olduğu bulundu. Saflaştırılan lipaz enziminin ise optimum sıcaklık değerinin 50 °C olduğu bulunmuştu.

Tablo 4. İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH ve Sıcaklık Değerleri

	İmmobilizasyon Türü	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
Serbest Enzim	-----	9	50
Cam boncuk-enzim	Kovalent	10	40
Cam boncuk-enzim	Adsorpsiyon	10	40
Silikajel	Kovalent	10	40
Deniz kumu	Kovalent	10	40
Alumina	Adsorpsiyon	10	40
Amberlite IRA-900	İyonik	10	40

Lipazlar, süt ve yağ endüstrisi, deterjan ve gıda endüstrisi, saf kimyasalların ve ilaçların sentezi, kağıt ve kozmetik endüstrisi, eczacılık ve tekstil gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım alanlarına sahip olup; fungus, alg, bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Lipazın papatya bitkisinden saflaştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, papatya lipazı ilk kez saflaştırılmış, bazı kinetik özellikleri ve çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu incelenmiştir.

Enzimlerin çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmasında, farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere ve kaynaklarına göre çalışmalarda saflaştırma oranları da değişmektedir. Yapılan çalışmalarda lipaz, kayısı tohumundan 21,03 kat (Bilgin Sökmen, 2005), pirinç kepeğinden 7,6 kat (Bhardwaj ve ark., 2001), süttten izole edilen *Serratia marcescens*'ten 20,88 kat (Abdou, 2003), *Pseudomonas* sp.'den 37 kat (Dong ve ark., 1999) ve kestaneden 186,87 kat (İlgün, 2016) saflaştırılmıştır. Çalışmamızda papatya lipazı 26 kat saflaştırılmıştır. Bu değer, diğer bitkilerle ilgili çalışmalarla uygunluk göstermektedir.

SDS-PAGE ile papatya lipazının molekül ağırlığının 30 kDa olduğu bulundu. Bitki lipazları ile ilgili yapılan çalışmalarda, lipazların molekül ağırlıklarının nispeten küçük olduğu, örneğin; *Jatropha curcas* L. tohum lipazının molekül ağırlığının 21,6 (Staubman ve ark., 2001), pirinç kepeğinin 9,4 kDa (Prabhu ve ark., 1999), palm meyvasının 32 kDa (Hiol ve ark., 2000), kayısı tohumunun 32,2 kDa molekül ağırlığında oldukları bulunmuştur.

Bitkisel kaynaklı yağlı tohumların lipaz aktivitesine etki eden pH değerleri üzerine yapılan çalışmalarda, ayçiçek tohum lipazının optimum pH'sı 8-9 (Beisson ve ark., 1997), pirinç kepeği lipazının optimum pH'sı 7-7,5 (Prabhu ve ark., 1999), *Umbellularia californica* tohumundan saflaştırılan lipazın optimum pH'sı 8.5 olarak (Haas ve ark., 2001), kayısı tohumundan saflaştırılan lipazın optimum pH'sı 10 (Bilgin Sökmen, 2005), kestaneden saflaştırılan lipazın optimum pH'sı ise 9 olarak belirtilmiştir. Saflaştırılan papatya lipazının optimum pH'sı ise 9 olarak belirlenmiştir.

Bitkisel kaynaklı yağlı tohumlar üzerine yapılan çalışmalarda lipaz aktivitesinin sıcaklık etkisi değerlendirildiğinde optimum sıcaklığın 30-60 °C arasında olduğu görülmektedir (Hiol ve ark., 2000; Haas ve ark., 2001). Kayısı tohumundan saflaştırılan lipazın 30 °C (Bilgin Sökmen, 2005), kestaneden saflaştırılan lipazın 30 °C (İlgün, 2016), palm yağı (*Elaeis guineensis*)'ndan saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığının 30 °C (Abigor ve ark., 1985), acı baklardan saflaştırılan lipazın ise 25 °C olduğu verilmiştir (Sanz ve Olais, 1990). Papatya lipazının optimum sıcaklık değeri ise 50 °C olarak tayin edilmiştir.

İmmobilizasyon tekniği ile enzimlerin kararlılığı arttırılmakta ve bu özellikleri nedeniyle enzimler çeşitli endüstri alanlarında uzun süre kullanılabilir. Bu çalışmada iyonik, kovalent ve adsorpsiyon yöntemi ile papatya lipazı farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş ve özellikleri incelenmiştir. Papatya lipazı, en yüksek oranda (% 98,44) kovalent bağlama yöntemi ile deniz kumuna tutuklanmış; bunu kovalent bağlı olarak tutuklanan silikajel izlemiştir (% 32,81). Tutuklanma en düşük oranda iyonik bağlama yöntemi ile Amberlite IRA-900 üzerine gerçekleşmiştir. Enzimin aktif merkezi etkilenerek üç boyutlu yapısında değişiklik meydana geldiği için substrata olan ilgi azalmıştır. Bu nedenle aktivitenin azaldığı düşünülmektedir.

İmmobilize papatya lipazları için yapılan pH çalışmalarında immobilize lipazların optimum pH'ları, 10; serbest enziminki ise 9 olarak belirlendi. İmmobilizasyonla enzimin daha bazik bölgeye kaydığı görülmektedir. İmmobilizasyon sonucu lipazın optimum sıcaklığı pratik olarak fazla değişmemiştir. Lipazın alginata immobilize edilmesiyle de immobilize lipazlarda aynı sonuçlar bulunmuştur (Kılınç,1990).

4. Sonuçlar ve Öneriler

Elde edilen sonuçlardan, ülkemizde yetişen papatya bitkisinden lipaz enziminin saflaştırılıp farklı taşıyıcı maddeler ve farklı immobilizasyon işlemleriyle çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabileceği kanısına varıldı.

Teşekkür

Bu çalışma, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FEN-BAP-A-140316-65 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abdou, M. A. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophiz *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*, 86, 127-132.
- Abigor, D. R., Opute, F. I., Opoku, A. R., Osagie, A. U. (1985). Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36, 599-606.
- Arslan, D. (2012). Yalova Ekolojik Koşullarında Mayıs Papatyası (*Matricaria Recutita* L.) Çeşitlerinde Farklı Ekim Zamanları ve Ekim Mesafelerinin Verim ve Kalite Özelliklerine Etkisi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 175.
- Beisson, F., Gardies, A. M., Teissere, M., Ferte, N., Noat, G. (1997). An esterase neosynthesized in post-germinated sunflower seeds is related to a new family of lipolytic enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35, 761-765.
- Bhardwaj, K., Raju, A., Rajasekharan, R. (2001). Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*, 127, 1728-1738.
- Bilgin Sökmen, B. (2005). *Kayıt (Armeniaca vulgaris Lam.) tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi*. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dong, H., Gao, S., Han, S., Cao, S. (1999). Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30, 251-256.
- Erlanson, C. (1970). p-Nitrophenyl acetate as a substrate for a carboxyl-ester hydrolase in pancreatic juice and intestinal content. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 5, 333-336.
- Fuciños, P., Abadin, C. M., Sanromán, A., Longo, M. A., Pastrana, L., Rúa, M. L. (2005). Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. *Journal of Biotechnology*, 117, 233-241.
- Haas, M. J., Cichowicz, D. J., Dierov, J. K. (2001). Lipolytic activity of California-laurel (*Umbellularia Californica*) seeds. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 78, 1067-1071.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., Comeau, L. C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 421-430.
- Hong, M. C., Chang, M. C. (1988). Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1. *Biotechnology Letters*, 20, pp. 1027-1029.
- İlgün, R. (2016). *Kestane tohumundan (Castanea sativa) lipaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun.
- Kılınç, A. (1990). *Alginatta immobilize edilmiş lipazın bazı özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Mohamed, M. A., Mohamed, T. M., Mohamed, S. A., Fahmy, A. S. (2000). Distribution of lipases in the gramineae: Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*, *Bioresource Technology*, 73, 227-234.
- Prabhu, V. A., Tambe, S. P., Gandhi, N. N., Sawant, S. B., Joshi, J. B. (1999). Rice bran lipase: Extraction, activity and stability. *Biotechnology Progress*, 15, 1083-1089.
- Rúa, M. L., Díaz-Mauriño, T., Fernández, V. M., Otero, C., Ballesteros, A. (1993). Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1156, 181-189.

- Sağıroğlu, A., Telefoncu, A. (1993). Synthesis of stereospecific esters and resolution of rasemic alcohols with immobilized lipases. *Indian Journal of Chemistry*, 32B, 227-233.
- Sanz, L. C., Olais, J. M. (1990). Characterization of lupin seed lipase. *Food Chemistry*, 37, 221-228.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. (2001). Research review paper: Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- 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.
- Taipa, M. A., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. S. (1992). Purification of lipases. *Journal of Biotechnology*, 26, 301-311.
- Veeraragavan, K. (1990). A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. *Analytical Biochemistry*, 186, 301-305.
- Vorderwulbwcke, T., Kieslich, K., Erdmann, H. (1992). Comparison of lipases by different assays. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 631-639.
- Warburg, O., Christian, W. (1941). Isolierung und kristallinsation des garungsferments enolase. *Biochemische Zeitschrift*, 310, 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, 663-670.
- Yağar, H. (2000). *Ayva polifenol oksidazının eřitli taşıyıcılara immobilizasyonu ve karakterizasyonları*, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.