

LİPAZ ENZİMİ: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları

Ticari enzimlere özellikle de mikrobiyal kaynaklı olan enzimlere olan ilgi pek çok alanda kullanıma sahip olmalarından dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar kimyasal metotlara göre daha ucuz ve de daha basittir. Enzimler başta gıda, eczacılık, deterjan, tekstil ve kozmetik olmak üzere pek çok sanayi dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nin 1995 yılındaki yaklaşık ticari enzim satış hacmi 1 milyon dolar olmakla birlikte bu rakamın 2005 yılına kadar ikiye katlanması beklenmektedir. Bu enzimlerin en az %75'lik kısmını hidrolazlar oluşturmaktadır ve bunların da %90'ı mikroorganizmalardan fermentasyon yolu ile üretilmektedir. Son on yılda mikrobiyal kaynaklı lipazın biyokatalitik potansiyelinin anlaşılmasından sonra, bu enzim de sanayide yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve böylece toplam satış hacminde üçüncü sırada yer almıştır (Jaeger ve arkadaşları, 1997).

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açıl hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Bu enzim dünya çapındaki enzim satışlarının sadece %4'lük kısmına sahiptir (Paiva ve arkadaşları, 2000; Balcao ve Malcata, 1998). Burada lipazların ekonomik açıdan değerinin anlaşılacağı bariz bir şekilde görülmektedir ve bu çalışmaların sanayiye yansımaları için belirli bir süre gerekmektedir. Ayrıca enzimin maliyeti yüksektir. Enzimlerin sanayide kullanımının yaygınlaşmasını engelleyen en önemli nedenler ise düşük dayanım, aktivite ve seçicilikleridir. Bu sebeple, son yıllarda, lipazların hidroliz ve sentez reaksiyonlarındaki katalitik özelliklerinin geliştirilmesi için bazı kimyasal ve fiziksel işlemlere tabi tutulması gündeme gelmiştir. Buna ilave olarak moleküler biyoloji yolu ile enzimin maliyeti de düşürülebilir. Böylece de genetik özellikleri geliştirilmiş olan lipazın büyük miktarlarda üretimi sağlanabilir (Villeneuve ve arkadaşları, 2000).

Lipazlar hayvansal, bitkisel ve doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilebilir. Bunların arasından, kolay üretilmesi ve pek çok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizlemesinden dolayı en fazla kullanım bulan ise mikrobiyal kaynaklı lipazlardır. Lipaz tarafından katalizlenmiş olan reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzemesinden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla daha çevre dostu olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle lipazın katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötral pH gerektirir, enerji gereksinimi düşüktür ve de ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir ve bu aktivite özellikle de substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Bu kavram ara yüzey aktivasyonu olarak tanımlanabilir. Bu sebeple, en yüksek aktivitelere, substrat için yüksek yüzey alanına ulaşıldığı emülsiyon sistemlerinde ulaşılmaktadır.

LİPAZLARIN SINIFLANDIRILMASI

Enzimleri kimyasal reaksiyonlardan ayıran en önemli özellikleri seçicilikleridir. Lipazın seçicilik özelliği ise enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Lipazların yağ asidi seçiciliği, tıbbi gıdalar için yağ üretimi ve yağın besin değerini arttırmak için yağ asitleri ile zenginleştirmek için kullanılmaktadır. Lipaz spesifikliği üç temel grupta toplanır; pozisyon, substrat ve stereo seçicilik.

Bazı lipazlar yağ asitleri ile gliserid arasındaki bağları rasgele parçalar; gliserid molekülünün yerleşimi önemli değildir. *Candida rugosa*, *Corynebacterium acnes*, *Chromobacterium* spp. Ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar bunlara örnek

olarak verilebilir. Pozisyon seçiciliği olan lipazlar ise sadece sn-1, 3 pozisyonundaki yani dıştaki ester bağlarını parçalar. Bu gruba örnek olarak ise *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus* ve *Rhizopus delemar* gibi organizmalardan elde edilen lipazlar verilebilir. Bazı lipazlar ise yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçicidir. Mesela, *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerini parçalarken *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise kısa zincirli yağ asitlerine seçicilik gösterir. En son olarak ise yağ asidi seçici lipazlar yer alır. Bunlar ise cis-9 pozisyonuna duyarlıdır. *Geotrichum candidum* lipazı cis-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine seçicidir.

LİPAZ REAKSİYONLARI

Diğer hidrofilik enzimlerde olmamasına rağmen farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar polar olmayan organik çözümler içinde dayanıklıdır ve farklı boyutta ve özellikteki oldukça fazla sayıda substratı kabul edebilir. Bunların esnek protein yapıları onlara hidroliz, interesterifikasyon, transesterifikasyon (asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz), aminoliz, oksimoliz ve tiotransesterifikasyon gibi pek çok reaksiyonu katalizleme olanağı verir. İleri (hidroliz) ve tersinir (sentez) reaksiyonlar, reaksiyon karışımının su aktivitesi ile kontrol edilir.

Lipaz enziminin su kullanarak triağliserolün ester bağlarını bölmesi olayına hidroliz denir. Amerikan yağ sanayinde Colgate-Emery prosesi yağların parçalanması amacı ile kullanılmaktadır. Bu proses aşırı basınç ve sıcaklıkta gerçekleştiği için yağ yapısında bozulmaya yol açar. Ayrıca maliyeti de oldukça yüksektir. Bu sebeple, yağ sanayinde

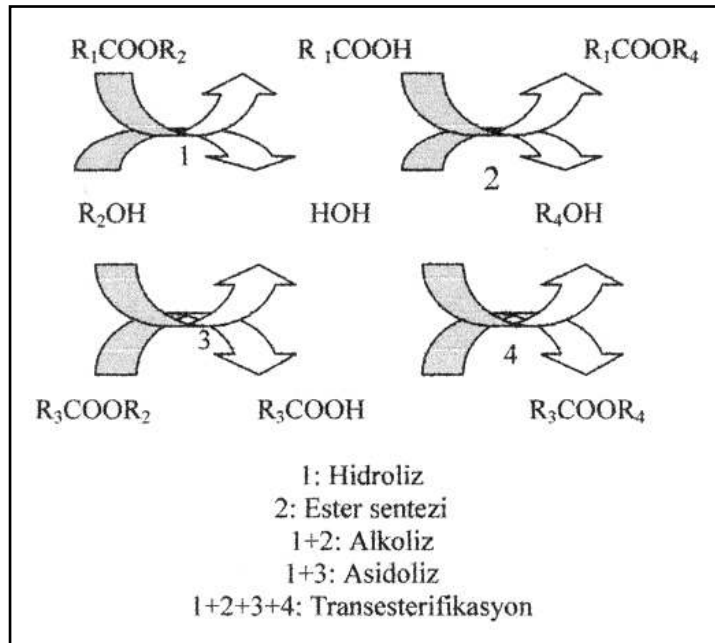
lipaz enziminin kullanımı daha uygundur. Bu teknoloji günümüzde yağ asidi, diğliserid, monogliserid üretimi, süt ürünleri ve deterjan imalatında uygulanmaktadır.

Esterifikasyon hidroliz olayının tersidir ve düşük su aktiviteli sistemlerde gerçekleşir. Transesterifikasyon ise açıl radikallerinin bir ester ve bir asit (asidoliz), bir ester ve diğer bir ester (interesterifikasyon) veya bir ester ve bir alkol arasında değişimi olarak tanımlanabilir. Aşağıdaki şekilde lipaz tarafından katalizlenen tüm reaksiyonlar toplu olarak görülebilir.

GIDA SANAYİNDE LİPAZLAR

Lipaz enzimi gıda sanayi de dahil olmak üzere pek çok sektörde kullanıma sahiptir. Bu enzimin kullanım alanları Tablo 1'de verilmiştir.

Son yıllarda doğal ürünlere olan ilginin artmasıyla birlikte gıda sanayinde geleneksel kimyasal işlemler yerine enzimlerin kullanımı gündeme gelmiştir. Günümüzde lipazlar peynir, tereyağı, sos ve çorba gibi birçok ürünün üretiminde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İtalyan peynirlerinde tadın oluşturulması, Çedar peynirinde olgunlaştırmanın hızlandırılması ve işlenmiş mavi peynirde tadın iyileştirilmesi işlemleri lipaz enziminin yardımlarıyla gerçekleştirilir. Lipaz ilavesi ilk olarak kısa-zincirli (C_4 , C_{14}) yağ asitlerinin salınmasıyla birlikte sabunsu tadın elde edilmesine yol açar. Lipazla kısmen hidrolize edilmiş tereyağı, zenginleştirilmiş kaymakı tada sahip olup, patlamış mısır, sıvı yağlar, katı yağlar, tahıllar, şekerlemeler, tüketime hazır gıdalar ve unlu mamuller gibi çeşitli gıda maddelerine eklenmektedir.



Şekil 1. Lipaz reaksiyonlarının şematik olarak gösterilişi (Balcao ve Akadaşları, 1996)

Lipazla modifiye edilmiş kremalar, kahve beyazlatıcılarına, şekerlemelere, hamurlara, çorbalara ve unlu mamullere süt tadı katması amacı ile ilave edilmektedir. Süt yağlarının hidrolizi de lipaz tarafından kontrol edilmektedir. Lipaz kullanımına yer veren süt sanayinde, lipaz konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve emülsiyon miktarının belirli değerlere ayarlanması spesifik yağ asitlerinin kontrollü salınmasına izin vermektedir. Alışlagelen kimyasal interesterifikasyon işlemiyle yapılması mümkün olmayan bu işlem, aynı zamanda kötü tat oluşturan spesifik yağ asitlerinin de en aza indirilmesini sağlar. Ayrıca farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar farklı özellikler ve seçicilik gösterdiğinden, istenilen özellikte ürün elde etmek için lipaz tipinin seçimi çok önem taşımaktadır. Süt yağı besinsel yağların çok önemli bir kaynağı olmakla birlikte, yüksek oranlarda kolesterol ve koroner kalp hastalıklarının artmasının sebebi

olarak gösterilen birincil doymuş yağ asidi kalıntıları ihtiva etmesi sebebiyle birkaç yıldır sağlık açısından zararlı olarak görülmektedir. İnsan diyetindeki doymuş asitlerden kaynaklanan sağlık sorunlarının başlıca sorumluları laurik, miristik ve palmitik asitlerdir. Bunların tam tersine oleik asit (C18: 1), kandaki kolesterol miktarını azaltmaktadır. (Balcao ve malcata, 1998). Bu nedenle, tada yaptığı etkilerin yanında lipaz, yağ asidi kombinasyonlarının değiştirilmesi ve bu yolla besinsel kalitesinin artırılması amacıyla süt yağının işlenmesinde kullanılmaktadır.

Lipaz tarafından katalizlenmiş ester sentezinin piyasada tat verici esterlere giderek artan talebi karşılayabileceği düşünülmektedir. Bunlardan bir tanesi ananas ve muz gibi doğal meyve aromalarına sahip olan etil bütirat olup gıda sanayinde lezzet artırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. (Chen, 1996). Kısa bir süre önce, lipazın gıdalarda bozulmaya yol açan mikroorganizmaların ve bazı gıda toksinlerinin hızlı tespitinde bir indeks olarak kullanılabilmesi keşfedilmiştir. Ayrıca bir başka çalışmada lipazların, gıdaların çürümeye yol açan psikotrof organizmaların üzerindeki etkisine ve bunların kontrolünde kullanılabilirliğine yer verilmiştir. (Pandey ve arkadaşları, 1999).

Bir trigliseridin pozisyonu, zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi yalnızca fiziksel özelliklerini etkilemekle kalmayıp aynı zamanda besinsel ve duyuşal değerlerini de etkilemektedir. Palmitik ve stearik asitleri bünyesinde bulunduran kakao yağının erime noktasının yaklaşık 37 C° dir. Bu

sebeple ağza alınması ile birlikte erir ve bir serinlik duyusunun algılanmasına sebep olur. 1976'da Unilever adlı firma immobilize lipaz kullanmak suretiyle yaptığı bir dizi hidroliz ve sentez reaksiyonları sonucunda kakao-tereyağı yerine geçen bir madde üretmiş ve bunun patentini almıştır.

LİPAZIN ÜÇ BOYUTLU YAPISI

Tüm kaynaklardan elde edilen lipazların üç boyutlu yapıları hemen hemen birbirine benzemektedir. 1990 ile 1995 yılları arasında 11 değişik lipaz türünün yüksek çözünürlükteki yapısı çözülmüştür. Burada boyut, sıralama benzerliği, substratlar ve aktivatörler dışında çoğunluğunun benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda tüm lipazların karakteristik olarak katalitik grupları içeren merkezi bir β -bandı ile α/β hidrolaz yapıdaki proteinlerin iç yapısı incelendiğinde ise paralel β kıvrımlı bantların heliks şeklindeki α yapıları ile ayrıldığı ve süper heliks olarak gönmüş bir şerit şekli aldığı görülmüştür. Heliks yapısındaki peptid kısımları ise bu şeridin dış kısımlarında yer almıştır.

Lipazlar genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Bunlardan N- kısmı katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır (Akoh ve Min, 1998).

Bu gruptaki enzimlerin farklı seviyelerdeki benzerliklerinin dışında bir sıralama istisnai olarak sıkça gözlenmiştir; pentapeptit Gli-X-Ser-X-Gli. Bu serin amino asidinin yapısı korunması ve bunun değişime uğraması veya yer değiştirmesi ile katalitik aktivitenin yitirilmesi bu amino asidin kataliz için çok önemli ve gerekli olduğunu göstermiştir. Bunun topografik yerleşimi de korunmuş ve belirgindir; protein zincirinin gergin bir bölümünün en üstünde bulunmaktadır. Fakat bu gergin bölümün serin amino asidine yakın -2 ve +2 pozisyonlarındaki amino asitlerinin küçük yan zincir gruplar içermesi mecburidir.

Katalitik serin amino asidine ilave olarak çoğu lipazın aktif merkezi histidin ve başka bir amino asit (Asp veya Glu) daha içerir. Nükleofilik serin bir β -bandı ile α -heliksine anırsad yer alırken histidin, aspartik asit ve glutamik asit ise serinin diğer yanlarında yer alır. Katalitik bölgeyi içeren amino asitler çoğu lipaz yapısında korunur.

Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma aktif merkezde bulunan serin aminoasidi üzerinde yoğunlaşmıştır. Serinin nükleofilik oksijeni trigliserid ile tetrahedral hemiasetal bir ortam oluşturur. Hemiasetalin ester bağı hidroliz olur ve diaçilgliserid

Tablo 1. Mikrobiyal lipazların sanayide önemli kullanım alanları (www.iisc.ernet.in/~currsci/july10/articles18.htm)

Sanayi Dalı	Etki	Ürün
Unlu mamuller	Lezzet artırıcı, raf ömrü uzatıcı	Unlu mamuller
İçecek	Aroma geliştirici	İçecekler
Kimya	Enantiyo seçicilik	Kiral kimyasallar
Temizleme	Sentez Hidroliz	Kimyasallar Sörfektanlar gibi temizleme Ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, Nemlendirme ajanları
Süt ve süt mamulleri	Süt yağının hidrolizi Peynirin olgunlaştırılması Tereyağın modifiye edilmesi	Lezzet ajanları Peynir Tereyağı
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon Hidroliz	Kakao yağı, margarin Yağ asitleri, gliserol, mono ve digliseridler
Soslar	Kalite geliştirilmesi	Mayonez, krema
Sağlıklı gıdalar	Transesterifikasyon	Sağlıklı gıdalar
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Et ve balık	Lezzet geliştirilmesi ve yağın uzaklaştırılması	Et ve balık ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Eczacılık	Transesterifikasyon	Özellikle lipitler Sindirim destekçileri

serbest kalır. Aktif merkezdeki serin açil esterinin bir su molekülü ile tepkimeye girdiği, daha sonra açil enzimin bölündüğü ve yağ asidinin ayrıldığı tahmin edilmektedir. Katalitik prosesin bu aşamasında ürünün aktif merkezden ayrılması özellikle önem taşımaktadır (Petersen ve arkadaşları, 2001).

ARA YÜZEY AKTİVASYONU

İlk defa 1958 yılında Sadra ve Desnuelle tarafından da belirtildiği üzere lipaz enzimi tam katalitik performans gösterebilmek için ara yüzey aktivasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (Balcao ve arkadaşları, 1996). Ara yüzey aktivasyonu olgusu ilk kez 1936 yılında Holwerda ve arkadaşları ve daha sonra da 1945 yılında Schonheyder ve Vokqvartz tarafından gözlenmiştir. (Verger, 1997).

1990 yılında lipaz enziminin üç boyutlu yapısının ilk kez tanımlanmasından sonra ara yüzey aktivasyonu olayının, çözelti içindeki enzimin aktif merkezini bir kapak gibi çevreleyen ampifilik peptidik yapıdaki bir halkadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Ara yüzeyin olmaması durumunda lipaz ikincil yapı elemanlarına sahiptir ve bu yapı enzimin substrata ulaşmasını engeller. Fakat, hidrofobik bir ara yüzey ile karşılaşması durumunda lipaz "açık yapı" durumuna geçer ve aktif hale gelir. Bu şekilde lipazlar katalitik merkezi çevreleyen hidrofobik alanlar aracılığıyla hidrofobik yüzeylere güçlü bir şekilde adsorbe olur. Bu mekanizma kapak yapısı ile açıklanabilir. Daha önce de belirtildiği üzere lipazın aktif merkezi Asp-His-Ser amino asitlerini içermektedir. Çözelti içindeyken, heliksel bir kısım lipazın aktif merkezini çevreler fakat lipit veya organik çözügen varlığında kapağın açılması ile yapısal bir değişim olur ve aktif merkezi içeren hidrofobik merkez ortamla temas eder. Bu sebeple, ara yüzeye olan gereksinim aktivite için temeldir. Kapağın dış yüzeyi nispeten hidrofilik iken aktif merkeze dönük olan kısım hidrofobiktir. Ara yüzey ile olan etkileşim artar ve substrat aktif merkezi içeren hidrofobik tünele girer. Kapak genellikle hidrofobik ve hidrojen bağları ile yerinde tutulur. Kapağın yapısı yüzeydeki yerleşim ve sayı olarak değişmektedir. Lipazın lipit ara yüzeyine bağlanma etkinliği kapaktaki a-heliksinin ampifilitesine bağlı olarak değişmektedir. Amphifilik özellikler azaldıkça enzimin aktivitesi de azalır.

Bu şekilde ara yüzey aktivasyonunun lipaz yapısında bazı değişikliklere sebep olduğu varsayılmaktadır. Bu değişiklikler ile katalitik özellikler ve özellikle de seçicilik gelişir.

Lipazın ara yüzeylerdeki davranışları göz önüne alındığında, adsorpsiyonun geri dönebilirliği, aktivite kaybı olasılığı ara yüzeyin kalitesi gibi bazı faktörler incelenmelidir. Genel olarak, artan yüzey basıncının desorpsiyona sebep olduğunun bilinmesinden dolayı, lipazların ara yüzeylere

geri dönüşümlü olarak adsorbe olduğu düşünülür. Ara yüzeyin kalitesi lipazın aktivitesini etkileyebilir. Enzimin ara yüzeye olan eğilimi ve moleküllerin yerleşimi de aktivite üzerinde etkilidir.

Bu çalışmada görüldüğü üzere lipazın gerek yapısı gerekse de sanayide kullanılabilirliği açısından oldukça ilgi çekici bir enzimdir. Bu enzim başta gıda sanayi olmak üzere pek çok sanayi dalı için çok önemli olmasına rağmen kullanımı henüz yaygınlaşmamıştır. Bunun sağlanması için bu enzimin dayanımını arttıracak, tekrar tekrar kullanımını sağlayacak, maliyetini düşürecek metotlar üzerinde çalışılması gerekmektedir.

REFERANSLAR

1. Akoh, C.C., Min, D.B., "Microbial Lipases" ve "Enzymatic Interesterification" Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology (1998), Marcel Dekker, Inc, New York, sf. 641-698.
2. Chen J.P., "Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase", Journal of fermentation and bioengineering, 82, (1996), 404-407.
3. Balcao V.M., Malcata F.X., "lipase catalyzed modification of milkfat", Biotechnology advances, 16, no 2, (1998), 309-341.
4. Balcao V.M., Pavia A.L., Malcata F.X., "Bioreactors with immobilized lipases: state of the art", Enzyme and Microbial Technology, 18, (1996), 392-416.
5. Jaeger K.E., Schneidinger B., Rosenau F., Werner M., Lang D., Dijkstra B.W., Schimossek K., Zonta A., Reetz M.T., "Bacterial lipases for biotechnological applications", Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 3,(1997), 3-12.
6. Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata F.X. "Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases", Enzyme and microbial technology, 27, (2000), 187-204.
7. Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T., "The realm of microbial lipases in biotechnology", Biotechnology and applied biochemistry, 29, (1999), 119-131.
8. Petersen M.T.N., Fojan P., Petersen S.B., "How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution", Journal of biotechnology, 85,issue 2, (2001),119-131.
9. Verger, R., "Interfacial activation of lipases: facts and artifacts", TIBTECH reviews, 15,(1997), 32-38.
10. Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J., "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches", Journal of molecular catalysis B:enzymatic, 9, issues 4-6,(2000), 113-148.
11. (www.iisc.ernet.in/~currsci/july10/articles18.htm) ■