

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-DR-2009-0003**

**TERMOFİLİK *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ÜN
LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Zehra Burcu BAKIR ATEŞLİER

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN**

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Zehra Burcu BAKIR ATEŞLİER tarafından hazırlanan “Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134’ün Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı tez, 07.09.2009 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı	Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. İsmail KARABOZ	Ege Üniversitesi	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Doç. Dr. İhsan YAŞA	Ege Üniversitesi	
Üye :	Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
.....sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Unvanı, Adı Soyadı
Enstitü Müdürü

İNTİHAL BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Zehra Burcu BAKIR ATEŞLİER

İmza :

ÖZET

Doktora Tezi

TERMOFİLİK *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ÜN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Zehra Burcu BAKIR ATEŞLİER

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresindeki çeşitli sıcak su kaynaklarından izole edilerek Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Kültür Stok'larında kayıtlı bulunan 201 adet termofilik bakteri izolatının 43 tanesinin lipolitik aktivite açısından pozitif sonuç verdiği ve bunlardan 22 tanesinin de lipaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Seçilen 22 izolat LB broth ortamında geliştirilerek kantitatif lipaz aktiviteleri belirlenmiş ve HBB 134 19,925 U/mL ile en iyi aktivite gösteren izolat olarak seçilmiştir. HBB 134 izolatının 16S rRNA dizi analizi sonucu en yüksek benzerlik oranı (% 99) *Anoxybacillus flavithermus* ile saptanmıştır. HBB 134 suşu en iyi enzim üretimini karbon kaynağı olarak % 0,5'lik zeytin yağı, azot kaynağı olarak % 0,5'lik pepton içeren enzim üretim ortamında pH 6,50'de ve 45°C'de gerçekleştirmiştir. HBB 134 izolatı optimum koşullarda geliştirildiğinde enzim üretimi logaritmik evrenin başlarında başlamış ve ortasında (12. saat) maksimuma ulaşmıştır. Enzimin büyük oranda hücre içinde olduğu saptanmıştır. HBB 134 izolatından elde edilen lipaz sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile 7,4 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile yaklaşık 64 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin en yüksek aktivitesini pH 9,00'da ve 50°C'de gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin pH 6,00-11,00 arasında geniş bir pH aralığında 24 saat boyunca stabilitesini koruduğu saptanmıştır. Enzim 25, 40 ve 50°C'de 24 saat sonunda aktivitesinin sırasıyla % 100, 92 ve 85'ini korumuştur. Enzimin Km ve Vmax değerleri sırasıyla 83,47 µM ve 500 U/mg olarak bulunmuştur. Gliserol, sorbitol ve mannitolün enzimin sıcaklık stabilitesini artırdığı saptanmıştır. Enzim aseton (% 10), etilasetat (% 10) ve dietileter (% 10, 50) karşısında stabilitesini korumuştur. Enzim triptofan inhibitörü olan NBS ve serin inhibitörü olan PMSF tarafından inhibe edilmiştir. Hg⁺², Fe⁺³, Pb⁺², Al⁺³ ve Zn⁺² enzimi kuvvetle inhibe ederken Li⁺, Na⁺, K⁺ ve NH₄⁺ hafif bir aktivasyona yol açmıştır. Enzim sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat, n-oktil-β-D-glukopiranozit ve CHAPS karşısında aktivite ve stabilitesinin en azından % 60'dan fazlasını korumuştur. Triton X-100 ise % 1'lik konsantrasyonda enzim aktivitesini % 34 oranında artırmıştır. Lipazın geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğu saptanmıştır. En yüksek enzim aktivitesi

gerçek substratlardan Span 80, yapay substratlardan p-nitrofenil kaprilat kullanıldığında elde edilmiştir. HBB 134 lipazının trioleinin 3. pozisyonundaki ester bağlarını hidrolizleyerek 1,2-diolein ve oleik asit ürünlerinin açığa çıktığı saptanmıştır.

2009, 156 sayfa

Anahtar sözcükler

Lipaz, *Anoxybacillus*, lipaz üretimi, termostabil enzim, karakterizasyon

ABSTRACT

PhD Thesis

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM
THERMOPHILIC *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134**

Zehra Burcu BAKIR ATEŞLİER

Adnan Menderes University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN

In this study, 201 thermophilic bacteria that were isolated from natural hot springs in and around Aydın and registered in Adnan Menderes University Department of Biology culture stocks were used. It was determined that 43 of these bacteria exhibited lipolytic activity and 22 of them exhibited lipase activity. These 22 lipase positive isolates were grown in LB broth medium and the quantitative lipase activities were determined. HBB 134 was chosen as the best lipase producing isolate with the activity of 19,925 U/mL. According to 16S rRNA sequences, it was found that the isolate showed maximum similarity (% 99) with *Anoxybacillus flavithermus*. The best enzyme production from HBB 134 was determined in medium including % 0,5 olive oil as carbon source and % 0,5 pepton as nitrogen source, pH 6,50 and 45 °C. When the isolate HBB 134 was grown in optimum culture conditions it was determined that production of the lipase started at the beginning of the logarithmic growth phase and it reached maximum level in the middle (12 hour) of the logarithmic phase. It was determined that most of the enzyme activity was intracellular. The lipase from HBB 134 was purified 7,4 fold using ammonium sulphate precipitation, dialysis, hydrophobic interaction chromatography and gel filtration chromatography. Molecular weight of the enzyme was found to be about 64 kDa by SDS-PAGE method. The enzyme showed maximum activity at pH 9,00 and 50 °C. It was determined that the enzyme was stable for 24 hour between pH 6,00-11,00 and at 25, 40 and 50 °C it retained %100, 92 and 85 of the original activity respectively. It was found that the Km and Vmax of the enzyme were 83,47 µM and 500 U/mg respectively. Glycerol, sorbitol and mannitol enhanced the enzyme thermostability. The enzyme was found to be highly stable against acetone (% 10), ethyl acetate (% 10) and diethylether (% 10, 50). The enzyme activity was inhibited in the presence of NBS (tryptophane inhibitor) and PMSF (serine inhibitor). Hg²⁺, Fe³⁺, Pb²⁺, Al³⁺ and Zn²⁺ were strongly inhibited the enzyme while Li⁺, Na⁺, K⁺ and NH₄⁺ were slightly activated. At least % 60 of the enzyme activity and stability were retained against sodium deoxycholate, sodium taurocholate, n-octyl-β-D-glucopyranoside and CHAPS. The enzyme activity was elevated about % 34 in the presence of % 1 Triton X-100. The lipase showed a broad range of substrate

specificity. The maximum enzyme activity was determined when the Span 80 and p-nitrophenyl caprylate was used as real and synthetic substrates, respectively. The lipase of HBB 134 cleaved triolein at only 3-position releasing 1,2-diolein and oleic acid.

2009, 156 pages

Keywords

Lipase, *Anoxybacillus*, lipase production, thermostable enzyme, characterization

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmam süresince deneyim ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, akademik çalışmalarında beni daima destekleyen ve çalışmalarımızın her aşamasında büyük bir özveri ile katkılarını sunmaktan asla kaçınmayan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e, doktora tez izleme komitesinde yer alan ve değerli bilgileriyle çalışmamıza katkılar sunan Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e ve Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Celal ÜLGER'e saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın her aşamasında bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen Sayın hocam Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a ve Biyoloji Bölümü Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kurtuluş OLGUN'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamızın moleküler tanı kısmında bilgilerini ve katkılarını esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Sayın hocam Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN ve sevgili arkadaşım Arş. Gör. Gamze BAŞBÜLBÜL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamızın istatistik değerlendirmelerindeki yardımlarından dolayı çalışma arkadaşım Arş. Gör. Öznur ARAT'a ve laboratuvar aşamasında büyük bir özveri ile yardımlarını esirgemeyen mezun öğrencilerimizden Gurbet ASLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde FEF-07009 no'lu proje ile araştırmamızı destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na, 106T581 no'lu proje ile finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a ve Biyoloji Bölümü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan ve varlıklarıyla bana güç veren sevgili annem Hüdaverdi BAKIR ve babam Arif BAKIR'a, uzakta olmasına rağmen manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili kardeşim Doğu BAKIR'a teşekkür ederim. Akademik çalışmalarında ve yaşantımda her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili hayat arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Suat ATEŞLİER'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	3
1.2. Bakteriyal Lipazların Biyokimyasal Sınıflandırılması	3
1.3. Lipazların Arayüzey Aktivasyonu	6
1.4. Lipazların Substrat Spesifitesi	7
1.5. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemleri	8
1.5.1. Titrimetrik Yöntem	8
1.5.2. Kolorimetrik Yöntem	8
1.5.3. Florimetrik Yöntem	10
1.5.4. Turbidimetrik Yöntem	10
1.5.5. Diğer Yöntemler	11
1.6. Lipaz Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Görüntülenmesi	11
1.7. Lipaz Üretimi	12
1.8. Lipazların Saflaştırılması	13
1.9. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar	14
1.9.1. Hidroliz	15
1.9.2. Sentez	15
1.10. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları	16
1.10.1. Hidroliz	17
1.10.1.1. Lipolizis	17
1.10.1.2. Deri Endüstrisi	17
1.10.1.3. Atıksu Uygulamaları	17
1.10.1.4. Deterjanlar	18

1.10.1.5. Süt ve İlişkili Endüstrilerde Lezzet Oluşumu	18
1.10.1.6. Besinler	19
1.10.1.7. Medikal Uygulamalar	19
1.10.1.8. Farmasötikler ve Kozmetikler	19
1.10.1.9. Trigliseritlerin Yapısal Analizi	19
1.10.1.10. Kâğıt Atıklarının Boya Giderimi	20
1.10.1.11. Rasematların Rezolüsyonu	20
1.10.2. Sentez	20
1.10.2.1. Düşük ve Orta Molekül Ağırlıklı Esterler	20
1.10.2.2. Poliesterler	21
1.10.2.3. Besinler	21
1.10.2.4. Farmasötikler ve Kozmetikler	21
1.10.2.5. Farklı Uygulamalar İçin Ara Ürünlerin Sentezi	22
1.10.2.6. Süt Endüstrisi ve Şekerleme	22
1.10.2.7. Peptit Sentezi	22
1.10.2.8. Biyodizel Üretimi	22
1.11. Çalışmanın Kapsamı ve Amacı	23
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
2.1. Lipaz Üretimi	24
2.2. Lipazların Saflaştırılması	24
2.3. Lipazların Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi	30
2.4. Lipazların Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA' nın Etkisi	34
2.5. Lipazların Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi	37
2.6. Lipazların Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi	39
2.7. Lipazların Stabilitesi Üzerine Deterjanların Etkisi	42
2.8. Lipazların Substrat Spesifitesi	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM	48
3.1. Kimyasallar	48
3.2. Yöntem	49
3.2.1. Kalitatif lipolitik aktivite tayini	49
3.2.2. Kantitatif lipaz aktivite tayini	50

3.2.2.1. p-Nitrofenol'ün farklı pH'lardaki molar absorbans katsayılarının belirlenmesi	52
3.2.3. Protein tayini	52
3.2.3.1. Coomassie Brilliant Blue G250 çözeltisinin hazırlanışı	53
3.2.3.2. Protein standartlarının hazırlanışı	53
3.2.3.3. Yöntem	53
3.2.4. HBB-134 izolatının 16S rRNA analizi ile tanınması	54
3.2.4.1. İzolattan genomik DNA izolasyonu	54
3.2.4.2. PCR ve 16S rRNA analizi	55
3.2.5. <i>Anoxybacillus flavithermus</i> HBB 134'den lipaz üretimi üzerine kültür koşullarının etkisi	56
3.2.5.1. Lipaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi	56
3.2.5.2. Lipaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi	57
3.2.5.3. Lipaz üretimi üzerine başlangıç pH'mın etkisi	58
3.2.5.4. Lipaz üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi	59
3.2.5.5. Lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi ve lipazın lokalizasyonu	59
3.2.6. <i>Anoxybacillus flavithermus</i> HBB 134 lipazının saflaştırılması	60
3.2.6.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	61
3.2.6.2. Diyaliz	62
3.2.6.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	62
3.2.6.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi	63
3.2.6.5. SDS-PAGE ve PAGE yöntemi ile enzimin molekül ağırlığı tayini ve zimogram	64
3.2.7. <i>Anoxybacillus flavithermus</i> HBB 134 lipazının karakterizasyonu	68
3.2.7.1. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'ın etkisi	68
3.2.7.2. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	68
3.2.7.3. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi	69
3.2.7.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	69
3.2.7.5. Enzimin sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi	69
3.2.7.6. Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	70
3.2.7.7. Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi	70

3.2.7.8. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi	71
3.2.7.9. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine deterjanların ve beyazlatıcıların etkisi	71
3.2.7.10. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi	72
3.2.7.11. Enzimin pozisyon spesifitesinin belirlenmesi	73
3.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi	74
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	75
4.1. Lipolitik Aktiviteye Sahip İzolatların Seçimi	75
4.1.1. Lipolitik Aktiviteye Sahip İzolatların Kalitatif Olarak Seçimi	75
4.1.2. Lipolitik Aktiviteye Sahip İzolatların Kantitatif Olarak Seçimi	75
4.2. HBB-134 İzolatının 16S rRNA Analizi İle Tanılanması	80
4.3. <i>Anoxybacillus flavithermus</i> HBB 134'den Lipaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi	84
4.3.1. Lipaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi	84
4.3.2. Lipaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi	86
4.3.3. Lipaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi	90
4.3.4. Lipaz üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi	90
4.3.5. HBB 134'ün zamana bağlı gelişimi ve lipazın lokalizasyonu	92
4.3. <i>Anoxybacillus flavithermus</i> HBB 134 Lipazının Saflaştırılması	94
4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	97
4.3.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi	97
4.3.3. Jel filtrasyon kromatografisi	98
4.3.4. SDS-PAGE ve PAGE ile enzimin molekül ağırlığı tayini ve zimogram ...	99
4.4. Enzimin Karakterizasyonu	105
4.4.1. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'nın etkisi	105
4.4.2. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	110
4.4.3. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi	115
4.4.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	116
4.4.5. Enzimin sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi	118
4.4.6. Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	121
4.4.7. Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi	122
4.4.8. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi	127

4.4.9. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine deterjanların ve beyazlatıcıların etkisi	128
4.4.10. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi	132
4.4.11. Enzimin pozisyon spesifitesinin belirlenmesi	135
5. SONUÇ	139
KAYNAKLAR	141
ÖZGEÇMİŞ	153

SİMGELER DİZİNİ

bp	baz çifti
BSA	Sığır serum albumini
°C	Santigrad derece
CASO	Kazein-pepton Soya-pepton
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)-dimetilamonyo]-1-propansulfonat
cm	Santimetre
CMC	Sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromid
Da	Dalton
DFP	Di-isopropilflorofosfat
DGGR	1,2-O-dilauril-rac-glisero-3-glutarik asit-resorfin ester
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	dideoksinükleotidtrifosfat
DTT	1,4- dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
<i>et al.</i>	Ve arkadaşları
g	Gram
<i>g</i>	Yer çekimi ivmesi
HBB	Halil Bıyık Bakteri
IU	Uluslararası enzim ünitesi
kDa	Kilodalton
Km	Michaelis-Menten sabitesi
L	Litre

LB	Luria-Bertani
LBS	Sodyum lauril benzen sülfonat
mL	Mililitre
mg	Miligram
mmol	Milimol
mM	Milimolar
M	Molar
μ M	Mikromolar
μ l	Mikrolitre
μ mol	Mikromol
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NBS	N-bromo suksinamit
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PCMB	p-kloromerküri benzoat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
pNP	p-nitrofenol
pNPA	p-nitrofenil asetat
pNPB	p-nitrofenil butirat
pNPL	p-nitrofenil laurat
pNPP	p-nitrofenil palmitat
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sp.	Tür

TEMED	Tetrametiletildiamid
TLC	ince tabaka kromatografisi
U	Enzim ünitesi
UMB	Umbelliferone
UV	Ultraviyole
V _{max}	Maksimum enzim aktivitesi
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 <i>Mucor miehei</i> lipazının kapalı (A) ve açık (B) formlarının yapısı	7
Şekil 1.2 Bir triaçilgliserolün lipaz tarafından hidrolizi	15
Şekil 3.1 Protein standart eğrisi	54
Şekil 4.1 Rhodamin B plaklarında kalitatif lipolitik aktivite tarama sonuçları	77
Şekil 4.2 Kantitatif lipolitik aktivite tayini	79
Şekil 4.3 HBB 134 izolatına ait filogenetik ağaç	83
Şekil 4.4 <i>A. hidirlerensis</i> HBB 134'den lipaz üretimi ve lipazın lokalizasyonu	96
Şekil 4.5 Hidrofobik etkileşim kromatografisi	102
Şekil 4.6 Jel filtrasyon kromatografisi	103
Şekil 4.7 Lipazın SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini (A) ve zimogram ile görüntülenmesi (B)	104
Şekil 4.8 SDS-PAGE protein standart eğrisi	104
Şekil 4.9 Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	107
Şekil 4.10 Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisi	108
Şekil 4.11 Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	113
Şekil 4.12 Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	113
Şekil 4.13 Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi	115
Şekil 4.14 Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten grafiği).....	117
Şekil 4.15 Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)	118
Şekil 4.16 Enzimin sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi	119
Şekil 4.17 Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	124
Şekil 4.18 Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi	126
Şekil 4.19 Enzim aktivitesi üzerine deterjanların etkisi	132
Şekil 4.20 Enzim stabilitesi üzerine deterjanların etkisi	134
Şekil 4.21 Lipazın gerçek substratlara karşı spesifitesi	137
Şekil 4.22 Lipazın yapay substratlara karşı spesifitesi	137
Şekil 4.23 TLC ile enzimin pozisyon spesifitesinin görüntülenmesi	138

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Lipaz üretimi üzerine kültür koşullarının etkisi	25
Çizelge 3.1 Luria Bertani (LB) agar ortamının içeriği	49
Çizelge 3.2 Tween 80'li agar ortamı	49
Çizelge 3.3 Rhodamin-B agar ortamı	50
Çizelge 3.4 Kantitatif lipaz tayininde reaksiyon bileşenleri	51
Çizelge 3.5 Optimum koşullar altında standart kantitatif lipaz tayininde reaksiyon bileşenleri	51
Çizelge 3.6 CASO agar ortamının içeriği	55
Çizelge 3.7 Lizis tamponunun içeriği	55
Çizelge 3.8 Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi incelenirken kullanılan kontrol besiyerleri	57
Çizelge 3.9 Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi incelenirken kullanılan besi ortamı	58
Çizelge 3.10 Enzim üretimi üzerine başlangıç pH'ının etkisi	59
Çizelge 3.11 Enzim üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi	59
Çizelge 3.12 Diyaliz torbasının ön işlemde geçirilmesi	62
Çizelge 3.13 % 10' luk ayırma jelinin içeriği	66
Çizelge 3.14 % 4' lük yoğunlaştırma jelinin içeriği	66
Çizelge 4.1 Lipolitik aktiviteye sahip izolatların lipolitik aktivite tarama sonuçları	76
Çizelge 4.2 Kantitatif lipolitik aktivite tayini ile en iyi lipolitik aktiviteye sahip izolatın seçimi	78
Çizelge 4.3 HBB-134 izolatına ait 16S rRNA konsensus sekans ve BLAST karşılaştırma sonucu	80
Çizelge 4.4 Lipaz üretimi üzerine çeşitli karbon kaynaklarının etkisi	87
Çizelge 4.5 Lipaz üretimi üzerine çeşitli yağların etkisi	88
Çizelge 4.6 Lipaz üretimi üzerine çeşitli azot kaynaklarının etkisi	91
Çizelge 4.7 Lipaz üretimi üzerine başlangıç pH'ının etkisi	91
Çizelge 4.8 Lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi	92
Çizelge 4.9 <i>A. hidirlerensis</i> HBB 134'den lipaz üretimi ve lipazın lokalizasyonu ...	95
Çizelge 4.10 Amonyum sülfat çöktürme basamakları	100
Çizelge 4.11. <i>A. flavithermus</i> HBB 134 lipazının saflaştırma adımları	101

Çizelge 4.12 pNP'ün farklı pH'lardaki molar absorbanans katsayıları	107
Çizelge 4.13 Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	108
Çizelge 4.14 Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisi	109
Çizelge 4.15 Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	112
Çizelge 4.16 Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	114
Çizelge 4.17 Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi	115
Çizelge 4.18 Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	117
Çizelge 4.19 Enzimin sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi	120
Çizelge 4.20 Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi	123
Çizelge 4.21 Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi	126
Çizelge 4.22 Enzim aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi	129
Çizelge 4.23 Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine deterjanların ve beyazlatıcıların etkisi	133
Çizelge 4.24 Lipazın gerçek substratlara karşı spesifitesi	136
Çizelge 4.25 Lipazın yapay substratlara karşı spesifitesi	136

1. GİRİŞ

Yaşam, iyi şekilde organize olmuş kimyasal reaksiyonlara dayanır. Bununla beraber bu reaksiyonların pek çoğu yaşamı devam ettirecek kadar hızlı ilerleyemez. Bundan dolayı doğa bizim enzim olarak adlandırdığımız ve kimyasal reaksiyonların hızını oldukça artıran kimyasal katalizörleri geliştirmiştir. Enzimlerin katalitik gücü virüslerden insanlara kadar bütün yaşam formlarının hayatını kolaylaştırır. Enzimler antik dönemden beri peynirlerin, ekmeklerin ve alkollü içkilerin üretiminde ve etlerin yumuşatılmasında kullanılmaktadır. Günümüzde de enzimler halen pek çok besin ve içki üretiminde ve çamaşır deterjanları gibi pek çok ürüne katkı olarak kullanılmaktadır (Copeland, 2000). Bugün yaklaşık 4000 enzim tanımlanmış olup, bunlardan sadece 200 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimler genellikle mikrobiyal orijinlidir. Endüstriyel enzimlerin çoğunluğu (yaklaşık %75'i) hidrolitik etkiye sahiptir. Hidrolazlar, çok geniş substrat spesifitesi gösteren bir enzim sınıfıdır. Hidrolazlar peptidleri, amidleri, halidleri, esterleri ve trigliseritleri hidrolizlerler. Hidrolazların iki büyük sınıfı olan lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilester hidrolazlar) endüstriyel potansiyeli yüksek olan önemli biyokatalizörlerdir. Bununla birlikte lipolitik enzimler (lipazlar ve esterazlar), hem hidroliz hem de sentez reaksiyonlarını katalizlerler (Sharma *et al.*, 2001b).

Lipolitik enzimlerin hidroliz ve sentez yeteneklerinden endüstride çok çeşitli alanlarda yararlanılmaktadır. Bu enzimler deterjan endüstrisi, kağıt endüstrisi, deri endüstrisi, rasemik karışımların ayrılması, ilaç endüstrisinde saf kimyasalların sentezi, gıda endüstrisinde lezzet veren esterlerin sentezi, katı ve sıvı yağ endüstrisinde trigliseritlerin fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesi, atık su arıtımı, peptit sentezi ve biyoyakıt üretimi gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılır (Gandhi, 1997; Sharma, *et al.*, 2001b; Bornscheuer, 2002; Almeida, *et al.*, 2006; Hasan, *et al.*, 2006). Lipazların başlıca ticari uygulama alanı çamaşır deterjanlarında kullanımlarıdır. Deterjan enzimleri toplam lipaz satışlarının yaklaşık % 32'sini oluşturmaktadır. Lipazların deterjanlarda kullanılabilmesi için termostabil olması ve makinede yıkama esnasındaki alkalın koşullarda aktif kalması

gerekmektedir. Her yıl üretilen yaklaşık 13 milyar ton deterjana tahminen 1000 ton lipaz eklenmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998).

Ticari olarak üretilen lipazların çoğu bakteri, fungus ve mayalardan elde edilmektedir. Bununla beraber, özellikle yüksek sıcaklıklarda ve diğer çeşitli koşullarda diğer organizmalardan daha stabil olmalarından dolayı bakteriyal lipazlar daha çok ilgi çekmektedir.

Ekstrem koşullarda yaşayan termofilik bakteriler, mezofilik temsilcilerinin yaşayamadığı koşullar altında iş gören eşsiz enzimleri üreterek, bu koşullara adapte olmuşlardır. Bu türlerden elde edilecek enzimlerin sert koşullarda gerçekleştirilen endüstriyel işlemlerde kullanımı oldukça önemlidir, çünkü bu enzimler ekstrem koşullar altında aktif ve stabildirler. Şu ana kadar 4000'den fazla enzimin bulunmuş olması ve bunların çoğunun biyoteknolojide ve endüstriyel uygulamalarda kullanılıyor olmasına rağmen, bu enzimler endüstriyel uygulamadaki bütün istekleri karşılayacak yeterliliğe halen ulaşamamıştır. Bu durumun en önemli sebebi enzimlerin çoğunun endüstriyel reaksiyon koşulları altında dayanıklı olmamasıdır. Bugüne kadar kullanılan enzimlerin çoğu mezofilik mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Pek çok avantajlara sahip olmalarına rağmen, ekstrem sıcaklık, pH, iyonik kuvvet vb. koşullar altında stabil olmamalarından dolayı bu enzimlerin kullanımı sınırlıdır. Termofilik enzimler özellikle son yıllarda büyük önem kazanmışlardır. Bunun en önemli nedeni, oldukça termostabil olmaları ve proteolizis, ekstrem pH veya kimyasal ajanlar karşısında denatürasyona dirençli olmalarıdır (Dominguez, *et al.*, 2005). Enzimin organik çözücülerde denatürasyona dirençli olmasının sudaki termostabiliteleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple, termostabil enzimler, yalnızca sulu ortamlarda değil, organik ortamlarda kullanılırken de caziptir (Meghji, *et al.*, 1990; Kademi, *et al.*, 1999a). Bu yüzden, yeni termostabil enzimlerin araştırılması, yeni uygulamaların geliştirilmesi için önemlidir. Termofilik enzimlerin geliştirdiği termostabilizasyon mekanizmalarının başlıcaları, paketlenme yoğunluğu, hidrofobik etkileşimler, disülfid köprüleri, hidrojen bağları, amino asit kompozisyonu, tuz köprüleri ve yüzey ilmeklerinin stabilizasyonudur (Vieille ve Zeikus, 2001; Almog, *et al.*, 2002).

1.1. TARİHÇE

Lipitler dünya biomasının büyük bir bölümünü oluşturmaktadırlar ve lipolitik enzimler bu suda çözünmeyen bileşiklerin dönüştürülmesinde önemli bir rol oynar. İlk olarak Claude Bernard 1856'da pankreatik sıvıdaki bir lipazı keşfetmiştir ve onu çözünür olmayan yağ damlalarını hidrolizleyen ve onları çözünür ürünlere dönüştüren enzimler olarak tanımlamıştır. Lipazlar geleneksel olarak hayvan pankreasından elde edilirler ve diğer hidrolazlarla birlikte (pankreatin) ham karışım şeklinde yada saf halde insanlarda sindirime yardımcı olarak kullanılırlar (Hasan, *et al.*, 2006).

Hasan *et al.*'nın (2006) bildirdiğine göre mikrobiyal lipazların varlığı ilk olarak 1901'de *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* ve *B. fluorescens*'de gözlenmiştir (Eijkman, 1901), günümüzde ise en çok çalışılmış lipaz üreten bakteriler sırasıyla *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens*'tir.

Lipazlar, orijinleri (bakteriyal, fungal, memeli, vs.) ve özellikleri açısından büyük farklar gösterebilirler ve çok çeşitli karboksilik esterlerin hidroliz veya sentezini katalizleyerek organik asitlerin ve gliserolün açığa çıkmasını sağlarlar (Hasan *et al.*, 2006).

1.2. BAKTERİYAL LİPAZLARIN BİYOKİMYASAL SINIFLANDIRILMASI

Enzimlerin sınıflandırılması, ya substrat spesifitelerine ya da amino asit dizilimlerine dayanır. Karşılaştırılmak istenen bütün enzimlerin, aynı ya da en azından ilişkili bir substratla tercihen benzer reaksiyon koşulları altında denenmesi gerekir. Genellikle, lipolitik enzimler çok çeşitli reaksiyonları katalizleyebilme kabiliyetlerine göre karakterize edilirler. Ne yazık ki, lipaz aktivite ölçümlerinde çok çeşitli metotların kullanılması (çeşitli p-nitrofenil esterlerin hidrolizi ve pH-stat metodu gibi) substrat spesifitesine dayalı bir karşılaştırma yapmayı engellemektedir.

Proteinlerin üç boyutlu yapılarıyla ilgili bilgilerin giderek artması, proteinleri kıvrımlarına göre sınıflandırma fikrini geliştirmiştir. Hidrolazlar α/β kıvrım grubu içinde yer alırlar ve α/β hidrolaz kıvrımı olarak adlandırılırlar. Bu gruptaki enzimlerin sekonder yapıları α -sarmal ve β -katlanmış yapılar gösterir. İlk olarak Ollis *et al.* (1992)'nin tanımladığı α/β -hidrolazlar, aktiviteleri genellikle Ser, His ve Asp residülerinin oluşturduğu katalitik üçlüye bağlı olan çok çeşitli enzimlerden oluşmaktadır. Serin residüsü genellikle korunmuş bir pentapeptitte yer alır (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly). Bütün lipazlar ve esterazların çoğu bu kıvrım yapısını gösterir. Triaçilgliserol lipazlar, bütün fungal, bakteriyal ve pankreatik lipazları kapsamaktadır. Esterazlar üç gruba ayrılır: flavodoksin benzeri kıvrım grubuna dâhil olan kütinaz grubu, α/β hidrolaz kıvrımına sahip olan esteraz grubu ve asetilkolinesteraz grubudur. Bu α/β hidrolaz kıvrımı haloperoksidazlarda ve epoksid hidrolazlarda da bulunur (Fojan *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2001b).

Genel veritabanlarındaki amino asit dizilimlerine ulaşabilmek günümüzde çok kolaydır. Amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması, farklı orijinli enzimler arasındaki evrimsel ilişki hakkında daha açıklayıcı bilgiler sağlar. Diğer yandan, amino asit dizilim homolojisinin yüksek olması, enzimlerin özellikleriyle (substrat spesifitesi, stereoselektivite, optimum pH ve sıcaklık, çözücü stabilitesi gibi) ilişkili olmayabilir ve hatta bazı durumlarda tamamiyle farklı tipte reaksiyonları katalizleyebilirler. Örneğin, *Streptomyces aureofaciens*'den elde edilen bir bromoperoksidaz, *Pseudomonas fluorescens*'in esterazı ile yaklaşık % 55 amino asit dizilim özdeşliği gösterir. Fakat substrat spesifiteleri çok az uygunluk gösterir (Bornscheuer, 2002).

Arpigny ve Jaeger (1999), lipazların ve esterazların 53 amino asitlik dizilimlerini karşılaştırmış ve amino asit dizilimleri ve biyolojik özelliklerini esas alarak 8 gruba ayırmışlardır:

1. Gerçek Lipazlar: Aile I olarak da adlandırılan bakteriyal gerçek lipazlar eskiden *Pseudomonas* grupları olarak üç alt grupta inceleniyordu. Çünkü *Pseudomonas* lipazları muhtemelen çalışılan ilk lipazlardır ve endüstride önemli bir role sahiptirler. Önemli lipazlar üreten bazı *Pseudomonas* türlerinin *Burkholderia* olarak yeniden

adlandırılmasından ve pek çok lipazın farklı cinslerden elde edilmesinden dolayı gerçek lipazlar 6 alt aile temelinde yeniden sınıflandırılmıştır. Çeşitli *Bacillus* ve *Staphylococcus* türlerine ait lipazlar da bu grupta yer alırlar. Alt aile 5’de yer alan *Staphylococcus hyicus*’un lipazı önemli bir fosfolipaz aktivitesi göstermesi ile lipazlar içinde tektir.

2. GDSL Ailesi: Aile II olarak da adlandırılan bu enzimler geleneksel Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly pentapeptit yapısını göstermezler, bunun yerine aktif bölgedeki serin residüsü Gly-Asp-Ser-(Leu) (GDS(L)) motifini gösterir. Bu proteinlerde katalitik rol oynayan bu önemli amino asitler diğer lipolitik enzimlere göre N-terminale çok daha yakındırlar. *Streptomyces scabies* esterazı bu ailede yer almaktadır.

3. Aile III: Lipazların bu ailesi ilk olarak Cruz *et al.* (1993) tarafından ortaya konmuş ve daha sonra *Streptomyces exfoliatus* (M11) lipazının üç boyutlu yapısını çözen Wei *et al.* (1998) bu lipaz ailesinden bahsetmişlerdir. Bu enzim α/β -hidrolazların katlanma yapısını gösterir ve tipik katalitik üçlüyü içermektedir.

4. Hormon duyarlı lipaz (HSL) ailesi: Birkaç bakteriyal enzim (aile IV), memelilerin hormon duyarlı lipazı (HSL) ile önemli oranda amino asit dizilim benzerliği gösterirler. Memeli hormon duyarlı lipazı ve *Moraxella* sp. lipazının düşük sıcaklıkta (15 °C’nin altında) oldukça yüksek bir aktivite göstermesi bu enzimlerdeki korunmuş amino asit dizilim sıralarına sahip olmalarına bağlanmıştır. Ancak benzer amino asit dizilim sıralarının çeşitli mezofilik (*Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*) ve termofilik (*Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Archeoglobus fulgidus*) türlerde de bulunması bu korunmuş dizilimden sıcaklık adaptasyonunun sorumlu olmadığını göstermiştir.

5. Aile V: Bu ailedeki enzimler, HSL ailesindeki proteinler gibi mesofilik bakterilerden (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*) orijinlendikleri gibi, soğuğa adapte olmuş (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*) veya sıcağa adapte olmuş (*Sulfolobus acidocaldarius*) organizmalardan da orijinlenebilmektedirler. Bu enzimler, tipik α/β -hidrolaz katlanması ve bir katalitik triad gösteren epoksid hidrolazlar, dehalojenazlar ve haloperoksidazlar gibi çeşitli bakterial non-lipolitik enzimlerle önemli bir amino asit

dizilim benzerliği (% 20-25) gösterirler.

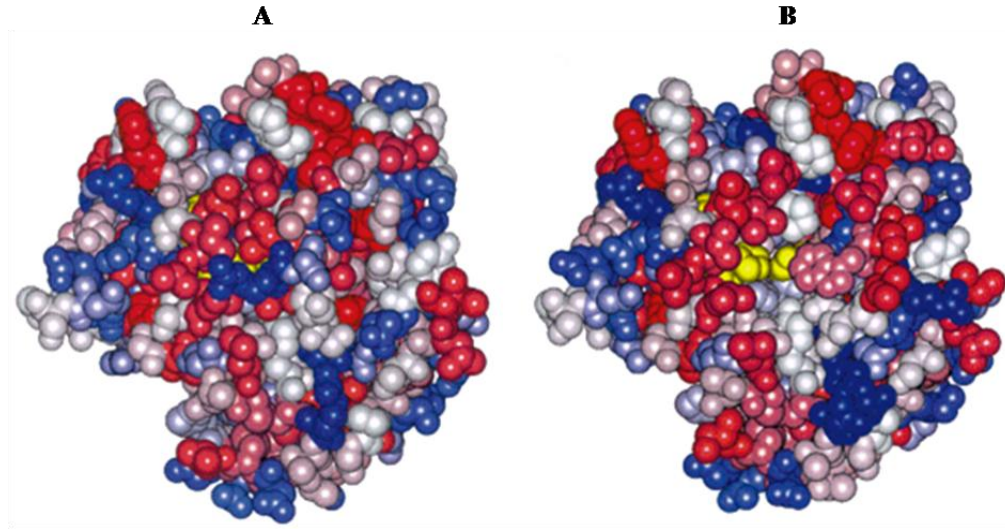
6. Aile VI: Bu ailede yer alan enzimler 23-26 kDa moleküler ağırlığa sahip bilinen en küçük esterazlardır. *Pseudomonas fluorescens* karboksilesterazının üç boyutlu yapısı çözülmüştür. Bu enzimin aktif formu bir dimerdir ve altünite, α/β -hidrolaz katlanması ve bir klasik Ser-Asp-His katalitik üçlüsüne sahiptir. Bu karboksilesteraz geniş bir spesifite göstererek küçük substratları hidrolizler ve uzun zincirli trigliseritlere karşı hiçbir aktivite göstermez. Bu ailedeki diğer enzimlerle ilgili çok az bilgi mevcuttur.

7. Aile VII: Bu ailede daha çok büyük molekül ağırlığa sahip olan (55 kDa) bakteriyal esterazlar yer almaktadır. Bu enzimler ökaryotik asetilkolin esterazlar ve bağırsak/karaciğer karboksilesterazları ile önemli bir amino asit dizilim benzerliği gösterirler.

8. Aile VIII: Bu aileyi oluşturan üç enzim yaklaşık 380 amino asit uzunluğundadır ve çeşitli C β -laktamaz sınıfı enzimlerle önemli bir benzerlik gösterirler. Bu ailedeki esterazların katalitik mekanizmasını açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

1.3. LİPAZLARIN ARAYÜZEY AKTİVASYONU

Sarda ve Desnuelle 1958 yılında lipazları ara yüzey aktivasyonu fenomenine dayanarak tanımlamışlardır (Schmid ve Verger, 1998). Lipazlar, suda çözünen karboksilik ester moleküllerine karşı aktivite gösteren esterazlardan farklı olarak çözünür olmayan veya kümeleşen substratlara karşı aktiftirler. 1990 yılında iki lipazın X-ışın kristalografisi ile yapıları aydınlatılmış ve diğer enzimlerden farklı olarak özel bir mekanizmaya sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır: Bu enzimlerin üç boyutlu yapılarına bakıldığında, ara yüzey aktivasyonunun aktif bölgeyi çevreleyen “kapak” benzeri amfifilik peptidik bir ilmekten dolayı olabileceği ileri sürülmüştür. Lipaz substratıyla bir yağ/su ara yüzeyinde karşılaştığında bu “kapak” konformasyonel olarak yeniden düzenlenir ve aktif bölge substratın ulaşabilmesi için açılır (Şekil 1.1) (Schmid ve Verger, 1998).



Şekil 1.1 *Mucor miehei* lipazının kapalı (A) ve açık (B) formlarının yapısı. Sarı alanlar katalitik üçlüyü temsil etmektedir. “Kapak” yapısının açılması ile (B) katalitik bölgeye (sarı) erişilebilmektedir.

Kaynak: (Schmid ve Verger, 1998).

1.4. LİPAZLARIN SUBSTRAT SPESİFİTESİ

Lipazlar, substrat spesifiteleri temel alınarak üç grupta incelenebilmektedirler. Birinci grupta yer alan lipazlar öncelikle triaçilgliserolün birincil hidroksil pozisyonlarındaki (1. ve 3. karbon atomları arasındaki) ester bağlarını hidrolizlerler ve 1,3-spesifik lipaz olarak adlandırılırlar. Bu grup lipazlara örnek olarak *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar* ve domuz pankreasından elde edilen lipazlar verilebilir.

İkinci grupta yer alan lipazlar pozisyon açısından spesifik değildirler ve triaçilgliserollerini tüm pozisyonlarından hidrolizleyebilirler. *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum* ve hintyağı tohumundan elde edilen lipazlar bu ikinci gruba örnek olarak verilebilmektedir.

Üçüncü grubu oluşturan lipazlar ise belirli yağ asitlerine karşı spesifite gösterirler. Örneğin, *Geotrichum candidum*'den elde edilen lipaz oleik asit gibi cis doymamış (Δ^9) yani 9. ve 10. karbon atomları arasında çift bağ içeren yağ asitlerini seçer. *Brassica nopus* ve *Mucor miehei*'den elde edilen lipazlar γ -linolenik ve docosaheksaenoik asit gibi polidoymamış yağ asitlerini ayırt ederken, adipöz

dokudaki hormona-duyarlı lipaz tercihen trigliseritlerden polidoymamış yağ asitlerini serbest bırakır (Gandhi, 1997).

1.5. LİPAZ AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Ham veya saf haldeki lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin çoğu azalan substratın veya oluşan ürünün ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

1.5.1. Titrimetrik Yöntem

Titrimetrik yöntem, lipaz aktivitesinin tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Bu yöntemde substrat olarak çoğunlukla triolein veya zeytinyağı kullanılmaktadır ve enzim aktivitesi açığa çıkan yağ asitlerinin NaOH ile titre edilmesiyle belirlenmektedir. Titrimetrik yöntem iki şekilde uygulanabilmektedir. Birincisinde substrat emülsiyonu ve enzim karıştırılarak inkübe edilmekte ve inkübasyon sonunda % 95'lik etanol eklenerek reaksiyon durdurulmaktadır. Bu karışım daha sonra indikatör olarak fenolftalein kullanılarak 10 mM NaOH ile titre edilmektedir (Saxena *et al.*, 2003b). İkinci olarak enzim aktivitesi bir pH-stat kullanılarak belirlenebilmektedir. Buna göre substrat emülsiyonu pH-stat'ın sıcaklık kontrollü kabına aktarılmakta ve karışımın pH'sı çalışılacak pH'ya ayarlanmaktadır. Bu karışıma enzimin eklenmesiyle reaksiyon başlatılmaktadır. Titratörün bitiş noktası çalışılacak pH'ya ayarlanmakta ve açığa çıkan yağ asitleri 10 mM NaOH ile ve pH-stat'ın otomatik büreti kullanılarak sürekli titre edilmektedir (Lesuisse *et al.*, 1993). Enzim aktivitesi dakikada 1 µmol yağ asidi açığa çıkmasını sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilir.

1.5.2. Kolorimetrik Yöntem

Lowry ve Tinsley (1976)'in bildirdiğine göre, lipaz aktivitesini belirlemek için serbest yağ asitlerini tayin ederken yöntemin hassasiyetini ve hızını artırma ihtiyacı kolorimetrik metotların geliştirilmesine yol açmıştır (Thomson *et al.*, 1999). Bu amaçla geliştirilen bütün metotlar serbest yağ asitlerinin organik bir çözücüde

divalent bir metalle (genellikle bakır) kompleks oluşturması prensibine dayanır ve daha sonra organik fazdaki metal spektrofotometrik olarak analiz edilir.

1.5.2.1. Sentetik substratlar

Literatürde, lipaz aktivitesinin ölçümünde sentetik substratların kullanıldığı pek çok çalışma vardır. Özellikle yağ asitlerinin p-nitrofenil türevleri (genellikle pNPL veya pNPP) oldukça sık kullanılmaktadır (Winkler ve Stuckmann, 1979; Kordel *et al.*, 1991; Sigurgisladottir *et al.*, 1993). Substratın lipaz tarafından hidrolizi sonucu p-nitrofenol açığa çıkar ve oluşan ürün görünür alanda (yaklaşık 410 nm) spektrofotometrik olarak ölçülür. Enzim aktivitesi, reaksiyon koşulları altında, bir dakikada açığa çıkan μmol p-nitrofenol olarak ifade edilir. Bu metot enzim aktivitesini spektrofotometrik olarak görüntüleme imkânı verir. Substrat sentetik olduğu için sonuçlar, enzimin doğal bir substratı kullanılarak doğrulanmalıdır. Örneğin Sigurgisladottir *et al.* (1993), çalışmada kullandıkları lipazın zeytinyağı emulsiyonunda aktivitesini tayin ederek doğrulamışlardır. Bu metot enzimin görüntülenmesi amacıyla da kullanılmaktadır. Ayrıca, bu metot için gerekli olan ekipmanlar pahalı değildir ve kolay elde edilir. p-Nitrofenil laurat yüksek sıcaklıklarda stabildir (Sigurgisladottir *et al.*, 1993). Üstelik Pereira-Meirelles *et al.* (1997)'nin bildirdiğine göre p-nitrofenil laurat ile elde edilen sonuçlar titrimetrik yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında uyumlu oldukları görülmüştür.

1.5.2.2. Yeni lipaz substratları

Lipaz aktivitesinin tayininde p-NPL ve p-NPP gibi kromojenik substratların kullanımı bazen çok doğru bulunmamaktadır çünkü bu bileşiklerin lipazlar için spesifik olmadıkları bildirilmiştir. Jaeger *et al.* (1996), p-NPP'in hem lipazlar hem de esterazlar tarafından hidrolizlendiğini göstermişlerdir. Jaeger *et al.* (1996)'a göre sn-1- yerini alan trilaurin türevi 1,2-O-dilauril-rac-glisero-3-glutarik asit-resorfin ester (DGGR) lipazlar için spesifik bir kromojenik substrattır. Bununla birlikte DGGR bazı alternatif kromojenik lipaz substratlarına göre çok daha pahalıdır (Thomson *et al.*, 1999).

Miles *et al.* (1992), alternatif bir spektrofotometrik lipaz tayin yöntemi tanımlamışlardır. 5-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenilmetilen)-2-tioksotiazolin-3-asetik asit (SRA- yağ asidi türevleri)'in çeşitli yağ asidi esterleri kırıldıktan sonra başlangıçta soluk sarı renkli olan substrattan bazik pH'da kırmızı stabil bir fenol meydana gelir ($\lambda_{\max}= 505$ nm). SRA'nın laurik, miristik ve dekanoik asit türevleri pek çok alkali tampon sistemlerinde çözünürdür fakat suda çözünmezler. SRA-yağ asidine dayanan lipaz uygulamaları tipik olarak pH 8'de gerçekleştirilir. Bununla birlikte, imalatçılar spektrofotometrik ölçümlerin çabuk yapılması gerektiğini çünkü pH yükseldikçe enzimatik olmayan hidrolizin meydana geldiğini belirtmişlerdir (Thomson *et al.*, 1999).

1.5.3. Florimetrik Yöntem

UMB (umbelliferone) ile esterleşmiş yağ asitlerinin spektroflorimetrik olarak görüntülediği lipaz uygulamaları da geliştirilmiştir. De Laborde de Monpezat *et al.* (1990), çeşitli doymuş ve doymamış yağ asitlerini (laurik, palmitik, stearik, oleik ve linoleik) kullanarak nonfloresan UMB esterleri sentezlemişlerdir. Esterler etilen glikol monometil eterde çözülmüş ve lipaz aktivitesi bir Tris-maleat tamponunda esterlerden açığa çıkan floresan UMB miktarındaki artışla belirlenmiştir (Thomson *et al.*, 1999).

1.5.4. Turbidimetrik Yöntem

Bu yöntem yukarıdaki yöntemlerden farklı olarak azalan substrat miktarının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Rollof *et al.* (1984), substrat olarak bir trigliserit emülsiyonu kullanmışlardır. Başlangıçta bulanık olan bu substrat emülsiyonu enzimle muamele edilmiş ve daha sonra spektrofotometrede 480 nm'de absorbansı ölçülerek emülsiyonun berraklaşma hızına göre enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Araştırmacılar, eklenen lipaz miktarı ile berraklaşma arasında doğrusal bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir.

Bu yönteme göre lipaz aktivitesi, bulanık olan substrat emülsiyonunun berraklaşma hızı ölçülerek tayin edilir. Arzoglou *et al.* (1989), substrat olarak triolein-isopropanol

emülsiyonu kullanmışlar ve 340 nm'de absorbanstaki düşüğe göre lipaz aktivitesini tayin etmişlerdir (Thomson *et al.*, 1999).

1.5.5. Diğer Yöntemler

Lipaz aktivitesinin tayininde yukarıda bahsedilen yöntemler dışında iletkenlik yöntemi, kromatografik yöntemler, ara yüzey geriliminin ölçülmesi, test kitleri, immunouygulamalar ve nükleer magnetik rezonans (NMR) yöntemi gibi yöntemler de kullanılabilir. İletkenlik yönteminde lipazın triasetini hidrolizlemesiyle birlikte reaksiyon ortamının iletkenliğindeki değişim ölçülmektedir. Ancak bu yöntemin dezavantajı, lipazlar için spesifik olan uzun-zincirli triaçilgliseritler suda zayıf çözündükleri için kullanılamazlar. Lipaz aktivitesi sonucu triaçilgliserollerden açığa çıkan yağ asitleri HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ve Gaz kromatografisi kullanılarak ölçülebilmektedir. Oluşan ürünler HPLC'de bir UV dedektörü veya kırılma indisisiyle (RI) ölçülürken gaz kromatografisinde daha hassas olan FID dedektörleri kullanılmaktadır. Lipazlar ara yüzeyde aktivite gösteren enzimler oldukları için enzim aktivitesi yüzey basıncındaki değişimler ölçülerek de belirlenebilir. Monomoleküler bir substratın hava-su ara yüzeyinde kırılması sonucu substrat ara yüzeyi terk eder ve bu da yüzey basıncının azalmasına yol açar. Bunun dışında lipaz aktivitesini belirlemek için çeşitli test kitleri de mevcuttur. Diğer yöntemlerden farklı olarak NMR yönteminde lipaz aktivitesi reaksiyon ortamındaki ester:alkol oranındaki değişimle belirlenir (Thomson *et al.*, 1999).

1.6. LİPAZ ÜRETEN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE GÖRÜNTÜLENMESİ

Lipaz üreten mikroorganizmalar çok çeşitli habitatlarda bulunabilmektedir; örneğin, endüstriyel atıklar, bitkisel yağları işleyen fabrikalar, mandıralar, yağ, yağ tohumu ve bozulmuş besinlerle kontamine olmuş topraklar, gübre yığınları ve sıcak su kaynakları (Sharma *et al.*, 2001b).

Lipaz üreten mikroorganizmalar bakterileri ve fungusları içermektedir. Sharma *et al.* (2001b)'ın bildirdiğine göre Sierra (1957), mikroorganizmalardaki lipaz aktivitesinin

tayini için basit ve güvenilir bir metot açıklamıştır. Bu metoda göre, bir sürfaktan olan Tween 80 belirleyici olarak katı üretim ortamına eklenir. Kolonilerin etrafında opak zon oluşumu organizmanın lipaz ürettiğinin göstergesidir. Bu uygulama, çeşitli Tween surfaktanların Nile blue, neet's foot oil ve Cu^{+2} tuzları ile kombine olarak kullanılmasıyla modifiye edilmiştir. Lipaz üreten mikroorganizmaların görüntülenmesinde substrat olarak tribütirin içeren agar plakları da sıklıkla kullanılmaktadır (Cardenas *et al.*, 2001) ve lipaz üretimi kolonilerin etrafındaki şeffaf zonla tanımlanmaktadır. Bunun yanında floresan bir boya olan Rhodamin-B'nin kullanıldığı görüntüleme sistemleri de tanımlanmıştır (Mackenzie *et al.*, 1967). Bu yöntemle göre lipaz aktivitesi gösteren kolonilerin etrafında floresan turuncu zonlar oluşmaktadır. Kouker ve Jaeger (1987) bu metodu hem mikroorganizmaların petrielerde kalitatif taramasında hem de kültür süpernatantlarında kantitatif tayinde kullanılmak üzere modifiye etmişlerdir.

1.7. LİPAZ ÜRETİMİ

Sharma *et al.* (2001b), mikrobiyal lipazların çoğunlukla sıvı kültür olarak üretildiklerini, fakat katı kültür fermentasyon metotlarının ve birkaç çalışmada da immobilize hücre kültürlerinin kullanıldığını bildirmişlerdir. Sıvı kültür yöntemiyle lipaz üretiminde optimum kültür koşullarının ve besin gereksinimlerinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışma yapılmaktadır. Lipid yapıdaki karbon kaynakları genellikle lipaz verimini artırmaktadırlar, bununla beraber birkaç araştırmacı yağ kullanmadan iyi bir verim elde ettiklerini bildirmişlerdir (Sharma, 2001b). Karbon ve azot kaynaklarının uygunluğu, aktivatörlerin, stimulatörlerin, inhibitörlerin, surfaktanların bulunması, inkübasyon sıcaklığı ve pH'ı, inokülüm seviyesi ve kaynağı ve oksijen miktarı gibi büyüme koşulları lipaz sentezini etkileyebilmektedir (Hasan *et al.*, 2009). Shelley (1987), lipaz-pozitif bir bakterinin belirlenebilmesi için üç faktörün birlikte bulunması gerektiğini söylemiştir: (1) organizma üremeli; (2) organizma genel büyüme koşulları altında lipaz üretmeli veya ortama salmalı ve (3) aktivite tayini için kullanılan metot yeterli hassasiyette olmalı (Hasan *et al.*, 2009).

1.8. LİPAZLARIN SAFLAŞTIRILMASI

Woolley ve Peterson (1994), pek çok lipazın pH, sıcaklık, metal iyonları ve şelat ajanlar karşısındaki aktivite ve stabiliteleri göz önüne alınarak geniş ölçüde saflaştırılıp karakterize edildiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kullanılan saflaştırma metotlarının genellikle presipitasyon, hidrofobik etkileşim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi spesifik olmayan teknikler olduğunu fakat bazı durumlarda saflaştırma adımlarının sayısını azaltmak için afinite kromatografisinden yararlandığını bildirmişlerdir (Sharma *et al.*, 2001b).

Mikrobiyal lipazların çoğu ekstraselülerdir ve fermentasyon işleminden sonra hücreler kültür sıvısından santrifüjle veya filtrasyonla uzaklaştırılır. Daha sonra kültür sıvısı ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi veya organik çözücülerle ekstraksiyon işlemlerinden biriyle konsantre edilir (Saxena *et al.*, 2003a). Eğer enzim hücre içi ise bu defa hücreler santrifüjle kültür sıvısından ayrılır ve tekrar tamponda çözülerek parçalanır. Hücrelerin parçalanmasında sonikasyon veya Fransız presi gibi fiziksel yöntemler kullanılabilir gibi enzimler (bakteriler için lizozim ve mayalar için zimoliyaz) veya çeşitli kimyasalların (safra tuzu, SDS ve Triton gibi deterjanlar) kullanıldığı kimyasal yöntemler de kullanılabilir (Metin, 2007). Hücreler parçalandıktan sonra santrifüjle hücre atıkları uzaklaştırılır ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılır.

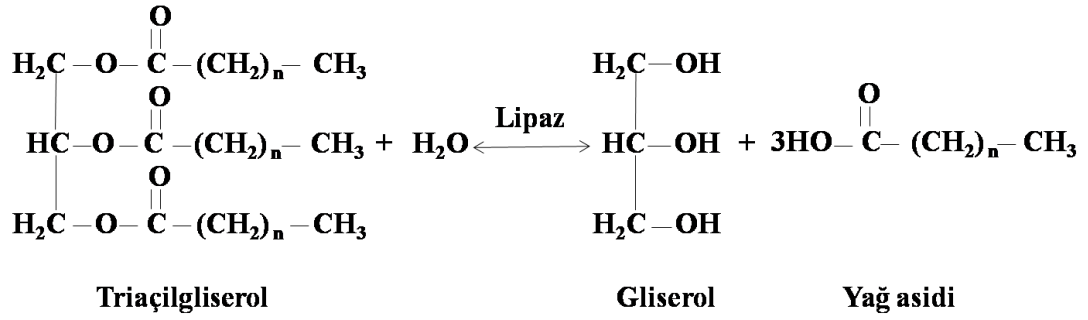
Saflaştırma işlemlerinin yaklaşık % 80'inde ilk olarak çöktürme işlemi yapılır. Çöktürme işlemlerinin % 60'ında amonyum sülfat ve % 35'inde etanol, aseton veya bir asit (genellikle hidroklorik asit) kullanılır. Aires-Barros *et al.* (1994), diğer tekniklerle karşılaştırıldığında çöktürme yöntemlerinde genellikle yüksek bir ortalama verim (% 87) elde edildiğini bildirmişlerdir (Saxena *et al.*, 2003a). Çöktürme işlemi çeşitli kromatografik yöntemler izlemektedir. Çoğu zaman istenilen saflaştırma düzeyine ulaşmak için tek bir kromatografik basamak yeterli değildir ve birkaç kromatografi adımı ard arda kullanılır. Lipazların saflaştırılmasında, iyon değişim kromatografisi en çok kullanılan kromatografik yöntemdir; saflaştırma işlemlerinin % 67'sinde kullanılmışlardır ve bunların %

29'unda birden çok kez kullanılmışlardır. En çok kullanılan iyon değiştiriciler, bir anyon değiştirici olan dietilaminoetil (DEAE) (% 58) grubu ve bir katyon değiştirici olan karboksimetil (CM) (% 20) grubudur. Jel filtrasyon kromatografisi en çok kullanılan ikinci saflaştırma yöntemidir; saflaştırma işlemlerinin % 60'ında kullanılmışlardır ve bunların % 22'sinde birden çok kez kullanılmışlardır. Afinite kromatografisi saflaştırma işlemlerinin % 27'sinde, hidrofobik etkileşim kromatografisi ise % 18'inde kullanılmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde en çok kullanılan hidrofobik adsorbenler oktil veya fenil fonksiyonel grubuna sahip olanlardır (Saxena *et al.*, 2003a).

Aires-Barros *et al.* (1994), bir proteini, % 30 verimle ve 320 katlık bir saflaştırma katsayısı ile saflaştırmak için dört veya beş tane saflaştırma adımının gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bu değerleri her bir saflaştırma planından elde edilen verimlerin ve saflaştırma katsayılarının ortalamalarından elde etmişlerdir (Saxena *et al.*, 2003a). Lipaz saflaştırmasının alışılmış işlemleri oldukça güç ve zaman alıcı olabilmektedir ve sonuçta oldukça düşük bir verim elde edilebilmektedir. Lipazların saflaştırılmasında son zamanlarda bazı yeni saflaştırma teknolojileri uygulanmaktadır. Bunlar arasında, membran işlemleri, immüno saflaştırma, durgun faz olarak epoksi bağlanmış ligand ve sefaroza immobilize edilmiş polietilen glikolün kullanıldığı hidrofobik etkileşim kromatografisi ve sıvı iki-faz sistemleri sayılabilir (Saxena *et al.*, 2003a).

1.9. LİPAZLARIN KATALİZLEDİğİ REAKSİYONLAR

Lipazlar temel olarak triaçilgliserollerin hidrolizinden sorumlu enzimlerdir (şekil 1.2). Bununla beraber, bazı düşük ve yüksek molekül ağırlıklı esterler, tiyol esterler, amitler ve poliol/poliasit esterler bu enzim grubunun substratları olabilirler. Lipazlar geniş substrat spesifitelerinden dolayı çok çeşitli reaksiyonları katalizleyebilirler. Bunun yanında lipazların sentez reaksiyonlarını geri dönüşümlü olarak katalizleyebilme özellikleri de vardır.



Şekil 1.2 Bir triaçilgliserolün lipaz tarafından hidrolizi

Lipazların katalizledikleri reaksiyonlar iki temel kategoride sınıflandırılabilir:

1.9.1. Hidroliz

Lipazlar için hidroliz terimi, bir yağ veya esterin suyun varlığında kendini oluşturan asit ve gliserol veya alkole ayrılmasını ifade eder.

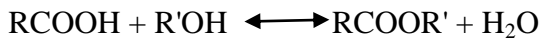


Yağların geleneksel kimyasal yöntemlerle parçalanması yüksek sıcaklık ve basınçta gerçekleşir. Enzimatik yöntem kimyasal reaksiyonla karşılaştırıldığında maliyetin daha düşük olduğu ve oluşan ürünlerin daha iyi koku ve renge sahip oldukları görülür. Enzimatik metotlarda reaksiyon koşulları daha ılımlıdır, çalışma riski daha azdır, enerji tüketimi daha düşüktür ve istenmeyen yan reaksiyonlar oluşmaz (Gandhi, 1997).

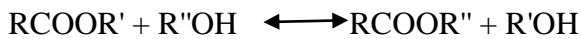
1.9.2. Sentez

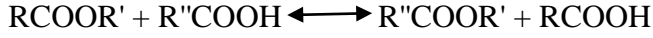
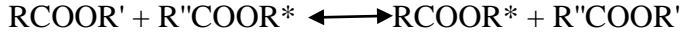
Sentez reaksiyonları 4 alt başlık halinde incelenebilir:

Esterifikasyon



Alkolizis



Asidolizis**İnteresterifikasyon**

Son üç reaksiyon genellikle birlikte sınıflandırılır ve “transesterifikasyon” olarak adlandırılır.

Lipazların geri dönüşümlü sentez reaksiyonlarını katalizleme kabiliyetleri istenilen bazı ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Esterifikasyon su ve ester oluşumuna yol açarken, alkolizis, asidolizis ve interesterifikasyon gibi transesterifikasyon işlemleri sırasında su yerine alkol, asit veya ester oluşur. Bu nedenle, bu oluşan ürünlerden herhangi biri istenilen bir ürün ise, transesterifikasyon reaksiyonları esterifikasyona göre daha karlı bir işlem olur.

Esterifikasyon temel olarak bir asidin alkolle reaksiyonunu kapsarken, lipazlar çok daha geniş bir substrat spektrumu gösterirler. Bu da lipazlara şeker esterleri, tiyol esterleri, peptitler, yağ amidleri gibi ürünlerin sentezlerini katalizleme olanağı sağlar. Bu durumun sonucu olarak, lipazlar potansiyel uygulamalar için bilinen diğer enzimlerden çok daha önemli bir yere sahiptirler (Gandhi, 1997).

1.10. LİPAZLARIN ENDÜSTRİYEL UYGULAMALARI

Mikrobiyal lipazlar, toplam satış miktarlarına göre proteazlar ve karbohidrazlardan sonra üçüncü büyük grubu oluşturmaktadır. Bunun başlıca nedeni çeşitli uygulamalar için çok yönlü bir enzim grubu olması ve üretimlerinin kolay olmasıdır. Mikrobiyal lipazlar genellikle enzimatik özellikleri ve substrat spesifiteleri bakımından birbirlerinden ayrılırlar ve bu çeşitlilik onları endüstriyel uygulamalar için oldukça cazip biyokatalizörler yapar. Endüstriyel alanda en çok ilerlemeyi lipazların ve selülazların göstereceği tahmin edilmektedir. Lipazların reaksiyon çeşitliliği özelliklerinden önümüzdeki yıllarda daha çok yararlanılması ve deterjan ve kozmetik alanlarında daha çok kullanılmaları beklenmektedir (Hasan *et al.*, 2006).

Lipazların endüstrideki kullanımları, hidroliz yeteneklerinden yararlanılan alanlar ve sentez yeteneklerinden yararlanılan alanlar olarak iki ana grup altında incelenebilir;

1.10.1. Hidroliz

1.10.1.1. Lipolizis

Bu işlem, lipazların yağları yağ asidi ve gliserole hidrolizleyebilme kabiliyetinin doğal sonucunu kullanır. Oluşan ürünlerin her ikisi de endüstriyel uygulamalarda önemlidir. Örneğin yağ asitleri sabun yapımında kullanılırlar. *Candida rugosa*, hint yağı bitkisi ve *Pseudomonas fluorescens*'den elde edilen lipazlar bu amaçla kullanılmaktadır (Gandhi, 1997).

1.10.1.2. Deri endüstrisi

Post ve derilerin işlenmesi esnasında en önemli basamak deri ve saçtan kaynaklanan yağ ve protein atıklarının uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla lipazlar ve proteazlardan oluşan bir karışım kullanılmaktadır. Yağ giderme işleminde sürfaktanların kullanımı hem enzimler kadar etkili değildir hem de çevreye zararlıdır. Sığır postlarından yağ giderme işleminde lipazlar tamamen yüzey aktif maddelerin yerini alabilmektedir. Yaklaşık % 40 oranında yağ içeren koyun derilerinde ise çözücülerin kullanımı çok yaygındır ancak bunların yerine de lipazlar ve sürfaktanlar kullanılabilir. (Hasan *et al.*, 2006)

1.10.1.3. Atıksu uygulamaları

Aktif çamur ve diğer aerobik atıksu işlemlerinde lipazlardan yararlanılmaktadır. Biomasın yaşam koşullarını sürdürebilmesi için havalandırma tanklarında sürekli bir oksijen geçişinin olması gerekir. Bu nedenle de havalandırma tanklarının yüzeyinde biriken ince yağ tabakasının sürekli uzaklaştırılması gerekir. Bu kaymaklaşmış yağca zengin sıvı lipazlar kullanılarak parçalanır. Bu amaçla kullanılan lipazlardan biri *Candida rugosa*'nın lipazıdır ve Lipaz-MY ticari adı altında Meito Sangyo Co. (Nagoya, Japan) tarafından üretilmektedir. Atık su arıtımı mezbaha, besin endüstrisi,

deri endüstrisi ve kümes hayvanlarının atıklarının işlenmesi gibi endüstriyel işlemlerde de kullanılmaktadır (Gandhi, 1997).

Dharmstithi ve Kuhasuntisuk'un (1998), yaptıkları çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* LP602'nin hem hücrelerini hem de lipazını lipitçe zengin atık su arıtımında kullanmışlardır.

1.10.1.4. Deterjanlar

Deterjanlarda kullanılan enzimler lekeleri daha basit formlara dönüştürerek temizleyiciler tarafından uzaklaştırılmalarını kolaylaştırır. Lipazlar yanmış yağlar, salata yağları, tereyağı, yağlı soslar, çorbalar, insan derisinden kaynaklı yağlar ve belli kozmetikler gibi yağ içeren lekelerin uzaklaştırılması amacıyla deterjan içeriklerinde kullanılmaktadır. Lipazlar, trigliseritleri mono- ve digliseritler ile gliserol ve serbest yağ asitlerine dönüştürür. Oluşan bu ürünlerin hepsi başlangıç materyali olan yağdan daha çok suda çözünürler ve böylece uzaklaştırılmaları daha kolaydır (Hasan *et al.*, 2006).

1.10.1.5. Süt ve ilişkili endüstrilerde lezzet oluşumu

Lipazlar peynir, tereyağı ve margarin gibi süt ürünlerinin lezzetlerinin geliştirilmesinde kullanılmaktadırlar. Bu süt ürünlerinin aroma ve dokusu sütteki yağ, protein ve laktoz metabolizmasının bir sonucudur. Bu nedenle lipazlar ve proteazlar peynirin olgunlaşmasını hızlandırmada ve tipik tatların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu işlem boyunca serbest yağ asitleri ve çözünür peptitlerle amino asitler oluşur ve bunlar lezzet bileşeni olarak görev yaparlar. Lezzet oluşumu kullanılan enzime bağlıdır. Örneğin, İtalyan Provolone ve Romano peynirlerinin yapımında pregastrik esteraz kullanılır ve bu peynirler karakteristik biberli bir tada sahiptirler. Kahve kremalarında, lipazlar zengin krema tadının verilmesinde kullanılır. Çikolata endüstrisinde, serbest yağ asitleri sütlü çikolataların, karamellerin, şekerlemelerin ve yağ kremalarının lezzetine katkıda bulunur. Böyle lezzetler kültür sıvılarının veya lipazların kullanımıyla elde edilebilir (Gandhi, 1997).

1.10.1.6. Besinler

Lipaz uygulamaları için önemli bir potansiyele sahip diğer bir endüstri de besin endüstrisidir. Biolipolizis, yağsız et üretiminde kullanılmaktadır. Ekmek hamuruna lipazların eklenmesiyle trigliseritlerin kısmi hidrolizi monogliserit içeriğinin artmasına yol açar ve bayatlamamanın gecikmesini sağlar. Lipazlar köpek mamalarının lezzetinin artırılmasında da kullanılmaktadırlar (Gandhi, 1997).

1.10.1.7. Medikal uygulamalar

Karbohidratlar ve proteinlerin yanında biyomateryallerin diğer bir büyük grubu da lipitlerdir. Her üçü de vücut tarafından kullanıldığında oldukça doyurucudur ve sindirimleri, absorpsiyonları ve emilimleri önemli bir fonksiyonu yerine getirir. Yağ metabolizmasının başlıca enzimi lipazdır ve eksikliğinde önemli sağlık sorunları ortaya çıkar. Bu nedenle lipazlar sindirime yardımcı olarak kullanılabilirler (Gandhi, 1997). Kato *et al.* (1989), lipazların Tümör Nekroz Faktörü'nün aktivatörü olduklarını ve bu nedenle kötü huylu tümörlerin tedavisinde kullanılabileceklerini bildirmişlerdir (Gandhi, 1997).

1.10.1.8. Farmasötikler ve kozmetikler

Gandhi (1997), "incelme" amacıyla, çeşitli kremlerde (August, 1972) veya oral uygulamalarda (Smythe, 1951) yağların uzaklaştırılması için lipazların kullanıldığını bildirmiştir. Bunun dışında Berrobi *et al.* (1970)'ın, deri iltihaplarında kullanılmak üzere hyaluronidaz ve/veya thiomukaz enzimlerine ilaveten lipazları da içeren farmasötik preparasyonlar için patent aldıkları bildirilmiştir (Gandhi, 1997).

1.10.1.9. Trigliseritlerin yapısal analizi

Lipazlar, substrat spesifiteleri temel alınarak sınıflandırılabilirler. Bazı lipazlar triaçilgliserolün birincil (1, 3) ester bağlarını hidrolizlerken, bazıları pozisyon açısından spesifite göstermezler. Bazı lipazlar da belirli yağ asitlerine karşı (örneğin mono- veya poli- doymamış yağ asitleri) spesifite gösterirler. Böylece, farklı

pozisyonlarda farklı yağ asitleri içeren lipitlerin hidrolizi lipazın belli bir tipi için spesifik hidrolizatların oluşumuna yol açar. Bundan dolayı, lipazların regiospesifitesi ve substrat seçiciliği trigliseritlerin yapılarının belirlenmesinde ve spesifik bir mono-ve/veya digliseritin sentezinde kullanılabilir (Gandhi, 1997).

1.10.1.10. Kâğıt atıklarının boya giderimi

Lipazlar, kâğıt endüstrisinde beyazlaşmayı artırır, kimyasal kullanımını ve işlem süresini azaltır. Fukuda *et al.* (1990), *Pseudomonas* türlerinden (KWI-56) elde edilen 200 ünite lipazın boya giderme çözeltisine eklenmesi ile kâğıdın beyazlaşma oranının % 56,5'den % 58'e çıktığını ve atık mürekkep lekelerinin 18 cm'den 7 cm'ye indiğini bildirmişlerdir (Hasan *et al.*, 2006).

1.10.1.11. Rasematların rezolüsyonu

Rezolüsyon, bir rasem bileşiğin enantiyomerlerine ayrılma işlemidir. Rezolüsyonun birçok uygulama alanı vardır. Örneğin ilaç olarak kullanılacak bileşik disimetrik bir molekül ise bunun sadece bir enantiyomeri etkindir, diğer enantiyomerin ilaç etkinliği yoktur veya çok azdır. Böyle bir bileşik kimyasal yöntemlerle sentezlendiğinde çoğunlukla rasem şeklinde elde edilir, sonrasında ise rasemik bileşiğin rezolüsyonu yapılarak etkin enantiyomer elde edilir (Kösali, 2005). Lipazlar, stereospesifik karakterlerinin bir sonucu olarak rasemik karışımların rezolüsyonunda ve çeşitli farmasötikler, tarım kimyasalları ve pestisitler için kiral yapı bloklarının sentezinde kullanılabilirler (Hasan *et al.*, 2006).

1.10.2. Sentez

1.10.2.1. Düşük ve orta molekül ağırlıklı esterler

Geranil asetat, isoamil bütirat ve benzil propionat gibi düşük molekül ağırlıklı esterler, temel olarak tat ve aroma kalitesini geliştirmek için kullanılmaktadırlar. Örneğin, bütülaurat şeftali ve kayısı tatlarını vermek için, etil bütirat ananas lezzeti için kullanılır. Bazı uçucu esterler parfümlerde, kozmetikte ve sabunlarda yaygın

olarak kullanılmaktadır. Bu esterler lipazlar kullanılarak hazırlanmaktadır (Gandhi, 1997).

1.10.2.2. Poliesterler

Dimetil terephthalate, vinil asetat, butil akrilatın polimerleri plastiklerde, kaplamalarda, yapıştırıcılarda ve laminatlarda kullanılmaktadır. Diisodesil fitalat ve ditriodesil fitalat boyalarda, cilalarda ve kaplamalarda kullanılmaktadır. Böyle poliesterlerin esterleri (monomerleri) lipazlar tarafından sentezlenmektedir (Gandhi, 1997).

1.10.2.3. Besinler

Lipazlar, monolaurin gibi monogliseritlerin, şeker esterlerinin ve *O*-açıl-L-homoserin gibi yağ açıl amino esterlerin sentezinde kullanılırlar. Bu bileşikler besinlerde emülsifiye edici olarak kullanılmaktadır. 3-Stearoil D-glukoz gibi şeker açıl esterleri ekmeklerin yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Gandhi, 1997).

Bazı mono-, di- ve trigliseritler, lipazların transesterifikasyon özelliği kullanılarak üretilmektedir. Zaks ve Gross (1990) *Pseudomonas fluorescens*'in lipazını bu amaçla kullanmışlardır. Nakai *et al.* (1991), hidrojenlenmiş balık yağı ile ayçiçeği yağı gibi doymamış yağ asitleri içeren yağların transesterifikasyonu ile margarinleri elde etmişlerdir (Gandhi, 1997).

1.10.2.4. Farmasötikler ve kozmetikler

Oktanoik ve dekanoik asitlerin mono-, di- ve trigliseritleri kozmetikte saç boyası ve parfüm bazı olarak, banyo malzemelerinde ve farmasötiklerde kullanılmaktadır. Bunların aynı zamanda insanlarda safra taşlarını çözdüğü de bilinmektedir.

Mentil salisilat, pek çok bronzlaşma ürünüde güneş koruyucu olarak kullanılır. Sorbitol ile laurik ve stearik asitin şeker monoesterleri antitümör etkiye sahiptir. Oleil monooleat, banyo yağlarında, kozmetik krem ve losyonlarda, saç ürünlerinde,

makyaj ürünlerinde, cilt ürünlerinde, farmasötiklerde kullanılmaktadır (Gandhi, 1997).

1.10.2.5. Farklı uygulamalar için ara ürünlerin sentezi

Lipazların katalizlediği alkolizis, oleokimyada değerli ara ürünler olan yağ asidi alkil esterlerinin üretiminde kullanılır. Menalone-lactone, endo- ve ekzo-brevicommin gibi optikçe aktif doğal ürünler lipazlar tarafından da sentezlenebilir. Optikçe aktif florid içeren poliestерler, *Alcaligenes* ve *Achromobacter* lipazlarının stereospesifik esterifikasyonu ile hazırlanmaktadır. Bu esterler vitaminler, kardiyotonicler ve antibiyotikler için ara ürün olarak kullanılmaktadır. Bu işlem için Kitatsume ve Kokusho (1990) patent almışlardır (Gandhi, 1997).

1.10.2.6. Süt endüstrisi ve şekerleme

Lipazların katalizlediği sentezlerden en çok bilineni, yağların interesterifikasyonu ile istenilen özelliklere sahip sentetik trigliseritlerin üretilmesidir. Bu uygulamalardan biri çikolata ve şekerlemelerin önemli bir bileşeni olan kakao yağının hurma yağından üretilmesidir (Gandhi, 1997).

1.10.2.7. Peptit sentezi

Lipazlar amid/peptit bağları (C-N) üzerine de etki edebilmektedirler. Bununla birlikte, proteazların aksine lipazlar D-amino asitlere de etki edebilirler, böylece başlangıç materyali olarak hem D- hem de L- konfigürasyonlarını kullanarak penisilin G ve diğer penisilin analoglarının peptit öncüllerinin sentezini yapabilirler. Bunu proteazlarla yapmak mümkün değildir (Gandhi, 1997).

1.10.2.8. Biyodizel üretimi

Fosil yakıt kaynaklarının sınırlı oluşu (ve hızla tükenmesi), ham yağ fiyatlarının artması ve çevre sorunları nedeniyle bitkisel yağlar alternatif yakıt olarak araştırılmaya başlanmıştır (Hasan *et al.*, 2006).

Metanol ve etanol ile yağların lipaz katalizli alkolizisi sonucu metil ve etil esterler oluşur ve bunlar dizel yakıtların yerini alabilecek önemli bileşenlerdir. Bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin, *Pseudomonas cepacia*'nın immobilize lipazı soya yağının metanol ve etanolle transesterifikasyonunda kullanılmıştır (Noureddini *et al.*, 2005).

1.11. ÇALIŞMANIN KAPSAMI VE AMACI

Lipolitik enzimlerin ve özellikle lipazların organik çözücüler karşısında dirençli oldukları ve ayrıca lipazların çeşitli deterjanlara da katıldıkları ve yıkama koşullarında stabil ve aktif olan enzimlerin endüstride büyük öneme sahip oldukları bilinmektedir. Ancak yine de lipolitik enzimlerin çeşitli kimyasal ajanlar karşısındaki stabiliteleri oldukça değişkenlik göstermektedir ve halen endüstride sert reaksiyon koşulları karşısında stabil ve aktif olan enzimler büyük rağbet görmektedir. Bu çalışma sonucunda gıda, deterjan, deri, ilaç, biyoyakıt ve kâğıt endüstrisi gibi pek çok biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilecek potansiyelde bir enzim elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada ADÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Stokları'nda kayıtlı bulunan çeşitli doğal kaynaklardan izole edilmiş 201 adet termofilik bakteri (Başbülül, 2009) lipolitik aktiviteleri açısından taranarak en iyi lipaz üreten izolatın belirlenmesi ve bu izolatın en iyi enzim üretimini gerçekleştirdiği kültür koşulları ve enzimin lokalizasyonunun saptanması amaçlanmıştır. Enzim saflaştırılarak enzimin optimum sıcaklık ve pH'ı ile sıcaklık ve pH stabiliteleri, enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun, çeşitli metal iyonlarının, inhibitörlerin, organik çözücülerin ve deterjanların etkisinin ve son olarak enzimin substrat spesifitesi ve pozisyon spesifitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. LİPAZ ÜRETİMİ

Mikroorganizmalardan lipaz üretiminde çoğunlukla sıvı kültürler kullanılmaktadır. Lipaz üretiminde optimum kültür koşullarının ve besin gereksinimlerinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

2.2. LİPAZLARIN SAFLAŞTIRILMASI

Birçok çalışmada mikrobiyal kaynaklardan lipazların saflaştırılması amacıyla çeşitli saflaştırma teknikleri kullanılmıştır (amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, affinite kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi). Bu araştırmalarda, saflaştırma tekniklerinden biri veya birkaçının birlikte kullanılmasıyla, bu enzimler kısmen veya tamamen saflaştırılmıştır.

Saprofitik bir askomiset olan *Ophiostoma piliferum*’dan sırasıyla hidrofobik etkileşim kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile 60 kDa ve 52 kDa moleküler ağırlığa sahip iki lipaz saflaştırılmıştır. Çalışmada % 33 verimle 100 katlık bir saflaştırma elde edilmiştir (Brush *et al.*, 1999).

Rhizopus oryzae’den 32 kDa moleküler ağırlığa sahip bir lipaz saflaştırılmıştır. Saflaştırmada sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve ikinci kez iyon değişim kromatografisi kullanılmış ve enzim % 22 verimle 1260 kat saflaştırılmıştır (Hiol *et al.*, 2000).

Pseudomonas aeruginosa LST-03’ün lipazı sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanarak % 12,6 verimle 34,7 kat saflaştırılmıştır. Lipazın molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 27,1 kDa olarak belirlenmiştir (Ogino *et al.*, 2000).

Çizelge 2.1 Lipaz üretimi üzerine kültür koşullarının etkisi

Organizma	Karbon Kaynağı	Azot Kaynağı	Sıcaklık	pH	Kullanılan aktivite ölçüm yöntemi ve substrat	Kaynak
<i>Alternaria brassicicola</i>	Metil oleat (50 mM) (1,64 U/mL)	-	25 °C	5,50	Florimetrik, Umbelliferil (UMB) oleate	Berto <i>et al.</i> , 1997
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Zeytin yağı (% 0,1) + n-hekzadekan (% 1,5) (~ 26 U/mL) n-hekzadekan (% 1,5) (~ 34 (U/mL)	Tripton (% 1) + Yeast ekstrakt (% 0,5)	30 °C	7,0	pH-stat zeytin yağı	Chen <i>et al.</i> , 1998
LCB 38, LCB 39, LCB 40 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	pNPC8 ile; Glukoz (%0,2) + Tween80 (%0,1) (LCB 38-60 U/L, LCB 39-95,3 U/L, LCB 40- 117,2 U/L). pNPP ile; Tween 80 (%1) (LCB 38-86 U/L, LCB 39-75 U/L, LCB 40-90,7 U/L)	NH ₄ Cl (% 0,1)	50 °C (LCB 39, 40) 30 °C (LCB 38)	7,4 (LCB 38,39) 6,4 (LCB 40)	Spektrofotometrik, p-nitrofenil kaprilat (pNPC8) p-nitrofenil palmitat (pNPP)	Fakreddine <i>et al.</i> , 1998
Strain MAS2	Glukoz (% 0,2) + Tween 80 (% 0,1) (10,3 U/mL) Glukoz (% 0,2) (15 U/mL) Glukoz (% 0,2) + Triolein (% 0,1) (14,5 U/mL) Tween 80 (% 0,1) (7,8 U/mL)	NH ₄ Cl (% 0,1)	50 °C	7,4	Spektrofotometrik, pNPC8	Kademi <i>et al.</i> , 1999a

Organizma	Karbon Kaynağı	Azot Kaynağı	Sıcaklık	pH	Kullanılan aktivite ölçüm yöntemi ve substrat	Kaynak
<i>Bacillus circulans</i> MAS2	Fruktoz (0,33M) (73 U/L)	Yeast ekstrakt (0,126M) (86 U/L)	50 °C (42.2 U/L)	8,1 (69 U/L)	Spektrofotometrik, pNPC8	Kademi <i>et al.</i> ,1999b
<i>Aspergillus terreus</i>	Mısır yağı (%2) (1790 U/L)	Kazein (%0,1) (6130 U/L)	37 °C	9,0 (4010 U/L)	Titrimetrik, zeytin yağı	Gulati <i>et al.</i> , 1999
<i>Candida rugosa</i>	Palmitik asit (2g/L) (5,3 U/mL hücre dışı, 52 U/g _{hücre} hücreye bağlı)	(NH ₄) ₂ SO ₄	30 °C	6,2	Turbidimetri, triolein	Dalmay <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus circulans</i>	Glukoz (% 1) (18,9 U/L) Tween 80 (% 0,1) (7,45 U/L) Triolein (% 0,1) (3,08 U/L)	Tripton (% 1) + Yeast ekstrakt (% 0,5)	50 °C	7,5	Spektrofotometrik, pNPC8	Kademi <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus thermoleovorans</i> IHI-91	Zeytin yağı (%1) (0,3 U/mL)	Yeast ekstrakt (% 0,45)	65 °C	6,0	Spektrofotometrik, p-nitrofenil laurat (pNPL)	Markossian <i>et al.</i> ,2000
<i>Lactobacillus casei</i> CL96	Laktoz (%1) (1016 U/mL)	Kazein pepton (% 1) + Meat ekstrakt (% 1) + Yeast ekstrakt (% 0,5)	30 °C	7,0	Spektrofotometrik, pNPC8	Choi ve Lee, 2001
<i>Fusarium solani</i>	Susam yağı (%0,5) (0,889 U/mL) (0,45 U/mg)	NaNO ₃ (% 0,3)	28 °C	5,5	Spektrofotometrik, pNPP	Maia <i>et al.</i> , 2001
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Tween 80 (% 0,2) (17 U/mL) Zeytin yağı (% 0,08) (2,5 U/mL) Oleik asit (% 0,06) (2,3 U/mL)	Tripton (% 1) + Yeast ekstrakt (% 0,5) + NH ₄ Cl (% 0,1)	30 °C	7,0	pH-stat zeytin yağı	Li <i>et al.</i> , 2001
<i>Geobacillus</i> sp.	Tween 80 (% 0,5) + Zeytin yağı (% 6) (495 U/L)	Pepton (% 0,5) + Beef ekstrakt (% 0,3)	70 °C	9,0	Spektrofotometrik, pNPP	Abdel-Fattah, 2002

Organizma	Karbon Kaynağı	Azot Kaynağı	Sıcaklık	pH	Kullanılan aktivite ölçüm yöntemi ve substrat	Kaynak
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ayçiçek yağı (%1) (57,9 U/mL, 7,9 U/mg) Tribütirin (%1) (32,9 U/mL, 61,1 U/mg)	Üre (% 0,2)	30 °C	6,0	pH-stat, zeytin yağı, tribütirin	Dominguez <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus sp.</i>	Zeytin yağı (% 1) (15,3 U/mL)	Pepton (% 1) (14,83 U/mL)	30 °C	5,5	Titrimetrik, zeytin yağı	Cihangir ve Sarıkaya, 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T1 (lipaz)	Salata yağı (%1) (~0,3 U/mL) veya Oleik asit (%0,2) (~0,35 U/mL)	NH ₄ NO ₃ (% 0,4) + Yeast ekstrakt (% 0,01)	25 °C	7,0	Spektrofotometrik, pNPS (p-nitrofenilstereat)	Hasanuzzaman <i>et al.</i> , 2004
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Tween 80 (% 0,3)	Yeast ekstrakt (% 0,75) (24 U/mL)	30 °C	7,0	pH-stat zeytin yağı	Li <i>et al.</i> , 2004
<i>Penicillium camembertii</i> Thom PG-3	Mannitol (% 0,5) (248 U/mL) Laktoz (% 0,5) (241,4 U/mL) Jojoba yağı (% 0,5) (422 U/mL) Tween 60 (% 0,1) (270 U/mL)	Soya unu (yağı alınmış) (% 4) (128,4 U/mL) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₆ (132 U/mL)	28 °C	6,5	Kolorimetrik, zeytin yağı	Tan <i>et al.</i> , 2004
<i>Thermus thermophilus</i>	Trypticase (% 0,8)	Yeast ekstrakt (% 0,4)	70 °C (50 U/L hücre dışı, 110 U/L hücre içi)	7,5	Spektrofotometrik, pNPL	Dominguez <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	Rafine hardal yağı (%1) (0,68 U/mL)	Pepton (% 0,5) + yeast ekstrakt (%0,5) (0,67 U/mL)	55 °C	8,5 (~0,85 U/mL)	Spektrofotometrik, pNPP	Kumar <i>et al.</i> , 2005

Organizma	Karbon Kaynağı	Azot Kaynağı	Sıcaklık	pH	Kullanılan aktivite ölçüm yöntemi ve substrat	Kaynak
<i>Bacillus licheniformis</i> S-86	3-metilbütan-1-ol (%0,4) (5,96 U/mg)	Pepton (% 0,25) + yeast ekstrakt (% 0,15)	50 °C	-	Spektrofotometrik, p-nitrofenil kaproat (pNPC6)	Torres <i>et al.</i> , 2005
<i>Penicillium restrictum</i>	Zeytin yağı (%1) (Sıvı kültür 12 U/mL, Katı kültür 17 U/g)	Meat pepton (% 2) + Yeast ekstrakt (% 0,1)	30 °C	5,5	Titrimetrik	de Azeredo <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus</i> sp.	Triolein (% 1) (138,4 U/mL)	Pepton (% 0,5) + yeast ekstrakt (% 0,3)	30 °C	6,0	Spektrofotometrik, pNPP	Ertuğrul <i>et al.</i> , 2007

Acinetobacter sp. RAG-1 lipazının iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kromatografileri kullanılarak % 22,4 verimle 10,7 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir. Lipazın molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık olarak 33 kDa olarak bulunmuştur (Snellman *et al.*, 2002).

Pseudomonas mendocina PK-12CS'nin lipazı aseton çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile % 14,8 verimle 241 kat saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile 80 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu saptanmıştır (Jinwal *et al.*, 2003).

Kojima ve Shimizu (2003), *Pseudomonas fluorescens* HU380'nin lipazını sırasıyla hidrofobik etkileşim kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi adımlarından geçirek % 14 verimle 24,3 kat saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığı 64 kDa olarak saptanmıştır.

Aspergillus carneus'un lipazı amonyum sülfat çöktürmesini takiben hidrofobik etkileşim kromatografisi ile 24 kat ve % 38 verimle saflaştırılmıştır. Lipazın 27 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu bulunmuştur (Saxena *et al.*, 2003b).

Bacillus coagulans BTS-3'ün lipazı amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile 40 kat ve % 2,5 verimle saflaştırılmış ve enzimin molekül ağırlığı 31 kDa olarak belirlenmiştir (Kumar *et al.*, 2005).

Bacillus cereus C71'in lipazı sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve daha sonra ard arda üç kere iyon değişim kromatografisi adımlarından geçirilerek % 18 verimle 1092 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı ise 42 kDa olarak bulunmuştur (Chen *et al.*, 2007).

Singh ve Banerjee (2007), *Pseudomonas aeruginosa*'nın lipazını sırasıyla aseton çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile % 2,1 verimle 21,5 kat saflaştırmışlar ve enzimin molekül ağırlığını 59,4 kDa olarak saptamışlardır.

Pseudomonas aeruginosa PseA'nın lipazı jel filtrasyon kromatografisi ile % 51,6 verimle 8,6 kat saflaştırılmış ve enzimin molekül ağırlığı 60 kDa olarak saptanmıştır (Gaur *et al.*, 2008).

Aureobasidium pullulans'ın lipazı, amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak % 4,8 verimle 3,4 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 63,5 kDa olarak bulunmuştur (Liu *et al.*, 2008).

Aspergillus niger NCIM 1207'nin lipazı amonyum sülfat çöktürmesini takiben hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografi adımlarından geçirilerek % 54 verimle 149 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin monomerik bir protein olduğu ve 32,2 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu bildirilmiştir (Mhetras *et al.*, 2009).

2.3. LİPAZLARIN AKTİVİTESİ VE STABİLİTESİ ÜZERİNE pH VE SICAKLIĞIN ETKİSİ

Bir enzimin substratı veya inhibitörü arasındaki moleküler etkileşim temelde bir çok yüzey temasları ile gerçekleşmektedir. Doğadaki proteinlerde, 10-15 A° aralığındaki iç moleküler kuvvetlerin tümü elektrostattır. Proteinin elektrostattik etkisi ortam pH'sına bağlı olarak değişir. Enzimler, fonksiyonları için, aktif pH aralığında uygun protonlanma durumuna sahip, katalitik amino asitlere ihtiyaç duyarlar. Çözücünün dielektrik sabitesi, iyonik gücü ve diğer yüklü amino asitlerin yakınlığı gibi çeşitli faktörler, bu katalitik amino asitlerin yük durumunu etkiler. pH'daki değişim katalitik amino asitlerin protonlanmış ve protonlanmamış formlarının denge konsantrasyonlarında bir değişime neden olur. Bu değişimin en belirgin sonucu, katalitik amino asitlerin ortalama yükünde bir değişim meydana getirmesidir. Bu nedenle pH, enzim aktivitesi için anahtar bir öneme sahiptir. Lipazların optimum pH'ları türler arasında değişmekle birlikte lipaz enzimleri genellikle alkali pH değerlerinde optimum aktivite göstermektedirler (Fojan *et al.*, 2000). Bu enzimlerin pH stabiliteyi optimum pH değerleriyle ilişkilidir. Bununla birlikte enzimlerin genellikle aktivite gösterdikleri pH aralığından daha geniş bir pH aralığında stabil oldukları görülmüştür. Mikrobiyal lipazların optimum sıcaklığı türler arasında

değişmekle birlikte bakteriyal kaynaklı enzimlerin daha yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Mikrobiyal lipazların sıcaklık stabilitesinin de genellikle optimum sıcaklıklarıyla ilişkili olduğu görülmüştür.

Bacillus sp. J 33 lipazının optimum aktivitesini 60 °C'de ve pH 8,0-8,5 arasında gösterdiği bildirilmiştir. Enzim pH 7,0-9,5 arasında 30 dakika stabilitesini korumuş ve pH 6,8 ve pH 10,0'da aktivitesinin % 75'ini korumuştur. Enzim 60 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin tamamını korurken 70 °C'de % 50'sini koruyabilmiştir (Nawani *et al.*, 1998).

Imamura ve Kitaura (2000) *Bacillus* sp. H-257'nin monoaçilgliserol lipazının optimum aktivitesini pH 7,5 ve 75 °C'de gösterdiğini belirlemişlerdir. Enzim pH 7,0-10,0 arasında 70 °C'de 10 dakika stabilitesini korumuştur. Enzimin 60 °C'ye kadar stabilitesini 10 dakika koruduğu fakat bu sıcaklığın üzerinde inaktive olduğu bildirilmiştir.

Pseudomonas aeruginosa LST-03'den elde edilen lipaz, maksimum aktivitesini pH 6,0-7,0 arasında göstermiştir. Enzim farklı pH'lardaki tamponlarla 30 °C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve pH 5,0-8,0 arasında stabil olduğu bildirilmiştir. Enzim, yaklaşık 37 °C'de maksimum aktivite göstermiş ve 60 °C'nin üzerinde neredeyse hiç aktivite gözlenmemiştir. Enzim farklı sıcaklıklarda 10 dakika inkübe edilerek kalan aktivitesi tayin edilmiş ve 40 °C'nin altında stabil kaldığı ve 70 °C'nin üzerinde inaktive olduğu görülmüştür (Ogino *et al.*, 2000).

Acinetobacter sp. RAG-1'in lipazı (LipA) pH 8,0-10,0 arasında iyi bir aktivite göstermekle birlikte optimum aktivitesini yaklaşık olarak pH 9,0'da ve 55 °C'de göstermiştir. LipA, pH 5,8-9,0 arasında 20 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin tamamını korumuştur (Snellman *et al.*, 2002).

Pseudomonas mendocina PK-12CS'den elde edilen lipaz optimum aktivitesini pH 8,0'de göstermiş ve pH 8,6'nın üzerinde ve pH 7,6'nın altında aktivitesi hızla düşmüştür. Enzimin geniş bir pH aralığında stabil olduğu (pH 5,6-9,0) bildirilmiştir. Enzimin maksimum aktivitesini 37 °C'de gösterdiği ve bu sıcaklığın üzerinde

aktivitenin hızla düştüğü belirlenmiştir. Enzim 45 ve 57°C sıcaklıklarda 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin sırasıyla % 50 ve 25'ini korurken oda sıcaklığında bir ay stabil kaldığı bildirilmiştir (Jinwal *et al.*, 2003).

Bacillus megaterium lipazının pH 5,0-7,0 arasında yüksek aktivite göstermekle birlikte maksimum aktivitesini pH 6,0'da gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin pH 5,0-8,0 arasında 1 saat boyunca stabil kaldığı, pH 4,0'de aktivitenin % 70'ini korurken pH 3,0'de tamamen inaktive olduğu bildirilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığının 55°C olduğu ve 30-60°C arasında stabilitesini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir (Lima *et al.*, 2004).

Pseudomonas sp. S5 lipazının optimum aktivitesini pH 9,0'da gösterdiği ve pH 6,0'nın altında ve 10,0'un üstünde aktivitenin önemli oranda düştüğü bildirilmiştir. Enzimin pH 7,0-9,0 arasında 30 dakika boyunca stabilitesini koruduğu ancak pH 10,0-12,0 arasında aktivitenin önemli oranda düştüğü belirtilmiştir. Enzim pH 7,0 ve 8,0'de aktivitesinin sırasıyla % 64 ve 86'sını korurken pH 6,0'da aktivitenin % 80'i kaybolmuştur. *Pseudomonas* sp. S5 lipazı maksimum aktivitesini 45°C'de gösterirken 37°C ve 50°C'de maksimum aktivitenin sırasıyla % 86 ve 52'si korunmuştur. Enzimin 45 °C'nin altında 30 dakika boyunca stabil olduğu, 50°C'de aktivitenin yaklaşık % 80'i korunurken 55°C'de 2 saat inkübasyon sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu bildirilmiştir (Rahman *et al.*, 2005).

Bacillus sphaericus 205y'nin lipazı maksimum aktivitesini pH 7,0-8,0 arasında göstermiştir. Enzim geniş bir pH aralığında (pH 5,0-13,0) 37°C'de 30 dakika stabilitesini korumuştur. Enzim optimum 55°C'de aktivite göstermiş, 60 ve 70°C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin sırasıyla % 28 ve 35'ini korumuştur. Enzimin 45°C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin % 50'den fazlasını koruyarak stabilitesini koruduğu bildirilmiştir (Sulong *et al.*, 2006).

Acinetobacter sp. ES-1 lipazının optimum pH 7,0'de aktivite gösterdiği ve pH 6,0-8,0 arasında stabilitesini koruduğu bildirilmiştir. Enzim maksimum aktivitesini 40 °C'de göstermiş ve 50 °C'de 30 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık % 50'sini korumuştur (Lee *et al.*, 2006).

Bacillus sp. lipazının pH 7,0-9,0 arasında aktivite gösterdiği ve optimum pH'nın 8,0 olarak belirlendiği bildirilmiştir. Enzimin pH 7,0-8,5 arasında stabilitesini koruduğu gözlenmiştir. Enzim optimum 60 °C'de aktivite göstermiş ve 60 °C sıcaklığa kadar 1 saat stabil kalmıştır. Enzim aktivitesi 70 °C'nin üzerinde ani bir düşüş göstermiştir (Nawani ve Kaur, 2007).

Pseudomonas aeruginosa lipazının pH 7,0-9,0 arasında 48 saat stabilitesini koruduğu ancak pH 6,0'da 48 saat sonunda aktivitede % 33'lük bir kayıp olduğu bildirilmiştir. Enzim pH 10,0'da 3 saat sonunda aktivitesinin yaklaşık yarısını kaybetmiştir (Singh ve Banerjee, 2007).

Yarrowia lipolytica lipazının optimum pH 8,0'de aktivite gösterdiği ve bu pH'nın üzerinde aktivitenin hızla düşerek pH 9,0'da ancak % 20'lik bir aktivitenin gözlendiği bildirilmiştir. Enzimin pH 4,0-10,0 arasında 25°C'de 3 saat inkübasyonu sonunda aktivitesinde kayıp olmadığı söylenmiştir. Enzimin maksimum aktivitesini 40°C'de gösterdiği, 45 °C'nin üzerinde aktivitenin hızla düştüğü ve 60°C'de hiç aktivitenin gözlenmediği bildirilmiştir. Enzim 30 ve 35°C'lerde 4 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin sırasıyla % 95 ve 83'ünü korurken 40 ve 45°C'lerde ancak % 32 ve 5'ini koruyabilmiştir (Yu *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa PseA lipazının optimum 40°C'de aktivite gösterdiği ve bu sıcaklıkta 4 saat stabil kaldığı; buna karşın 50°C'de 4 saat sonunda aktivitesinin yaklaşık % 40'ını koruyabildiği bildirilmiştir (Gaur *et al.*, 2008).

Serratia marcescens ECU1010 lipazının optimum pH'ı 8,0 olarak bulunmuş ve pH 6,0-9,0 arasında stabil olduğu bildirilmiştir. Enzim optimum aktivitesini 45°C'de göstermiş ve 50°C'de 1 saat sonunda aktivitesinin % 71'ini korumuştur (Zhao *et al.*, 2008).

Staphylococcus aureus lipazının maksimum aktivitesini pH 9,5 ve 55°C'de gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin pH 5,0-12,0 arasında 24 saat stabilitesini koruduğu ve 60°C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin % 50'sini koruduğu bildirilmiştir (Horchani *et al.*, 2009).

Pseudomonas fluorescens JCM5963 lipazı maksimum aktivitesini pH 9,0'da göstermiştir. Enzim pH 7,6-10,0 arasında maksimum aktivitesinin % 80'den fazlasını gösterirken pH 4,0-5,8 arasında hiç aktivite gözlenmemiştir. Enzim pH 5,0-9,5 arasında 25°C'de 20 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin % 80'den fazlasını korumuştur. Enzimin optimum sıcaklığı 55°C olarak belirlenirken 50 ve 60°C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitenin sırasıyla % 90 ve % 75'i korunmuştur. Bununla beraber 60°C'nin üzerinde aktivitede belirgin bir düşüş gözlenmiştir (Zhang *et al.*, 2009).

2.4. LİPAZLARIN AKTİVİTESİ ÜZERİNE METAL İYONLARI VE EDTA' NIN ETKİSİ

Voet *et al.* (1999)'nın bildirdiğine göre enzimlerin yaklaşık üçte biri katalitik aktivite için metal iyonlarına gereksinim duyarlar. Bunlardan birinci grubu oluşturan metalloenzimler kuvvetli şekilde bağlanmış Fe⁺², Fe⁺³, Cu⁺², Zn⁺², Mn⁺² ve Co⁺³ gibi geçiş metallerini içeren enzimlerdir. İkinci grubu oluşturan metalle aktive edilen enzimler ise Na⁺, K⁺, Mg⁺² ve Ca⁺² gibi alkali veya toprak alkali metalleri zayıf olarak bağlayan enzimlerdir. Metal iyonları katalitik işleme farklı yollarla yardımcı olurlar. Ya substrata bağlanarak reaksiyon için onun doğru yönelimini sağlarlar, ya oksidasyon sayılarındaki dönüşümlü değişimlerle redoks reaksiyonlarına katılırlar yada substratın negatif yükünü elektrostatik olarak kararlı hale getirirler (Uslan, 1997).

Bacillus sp. J 33 lipazının aktivitesi Mg⁺², Na⁺ ve Li⁺ iyonları tarafından sırasıyla % 63, 63 ve 23 oranında artarken Hg⁺² ve Cd⁺² iyonları enzimi büyük oranda inhibe etmişlerdir. Lipaz EDTA karşısında aktivitesinin % 40'ını korumuştur (Nawani *et al.*, 1998).

Bacillus sp. THL027 lipazının sadece Fe^{+3} iyonlarına karşı hassas olduğu ve aktivitesinin % 54'ünü koruyabildiği bildirilmiştir. Bunun yanında, aktivitenin Cu^{+2} ve Co^{+2} varlığında % 85'den fazlası, Ca^{+2} ve K^{+} varlığında % 75'den fazlası ve Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} ve NH_4^{+2} varlığında % 65'den fazlası korunmuştur. Enzimin EDTA'ya karşı hassas olduğu ve bu nedenle bir metalloenzim olduğu ileri sürülmüştür (Dharmsthiti ve Luchai, 1999).

Rhizopus oryzae lipazının Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Fe^{+3} tarafından inhibe olduğu ve aktivitenin sırasıyla % 28, 16 ve 6'sının koruduğu bildirilmiştir (Hiol *et al.*, 2000).

Acinetobacter sp. RAG-1 lipazının EDTA, Hg^{+2} ve Cu^{+2} tarafından kuvvetli şekilde inhibe edildiği, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} ve Rb^{+} iyonlarının ise aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir (Snellman *et al.*, 2002).

Aspergillus carneus lipazı, Mg^{+2} , Na^{+} ve NH_4^{+} iyonları tarafından stimüle edilirken, Cu^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} ve Pb^{+2} iyonlarının inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Enzimin EDTA tarafından inhibe olmadığı ve bu nedenle aktivite için bir kofaktöre ihtiyaç duymadığı ileri sürülmüştür (Saxena *et al.*, 2003b).

Bacillus coagulans BTS-3 lipazının Al^{+3} , Co^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} iyonları tarafından inhibe olurken K^{+} , Fe^{+3} , Hg^{+3} ve Mg^{+2} iyonlarının aktiviteyi artırdığı ve Na^{+} iyonlarının ise aktivite üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Kumar *et al.*, 2005).

Li ve Zhang (2005), *Geobacillus* sp. TW1'in lipaz aktivitesinin Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Fe^{+3} varlığında arttığını, fakat Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Li^{+} tarafından inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin EDTA karşısında aktivitesini koruduğu bildirilmiştir.

Bacillus thermoleovorans CCR11 lipazının, Na^{+} ve Ba^{+} iyonlarından etkilenmediği fakat Mg^{+2} , K^{+} ve Li^{+} iyonlarının aktivitede sırasıyla % 25, 24 ve 23'lük bir inhibisyona yol açtığı bildirilmiştir (Castro-Ochoa *et al.*, 2005).

B. coagulans MTCC-6375'den elde edilen metallolipazın 1 mM konsantrasyondaki Mg^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Hg^{+2} , Al^{+3} , ve Fe^{+3} iyonları tarafından aktive edilirken EDTA tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Kanwar *et al.*, 2006).

Acinetobacter sp. ES-1 lipazının Zn^{+2} ve Fe^{+3} iyonları tarafından inhibe edildiği buna karşın Mg^{+2} ve özellikle Ca^{+2} iyonlarının enzimi aktive ettiği bildirilmiştir. Enzim ayrıca EDTA tarafından da kuvvetle inhibe edilmiştir (Lee *et al.*, 2006).

Bacillus sp. lipazı Na^{+} , K^{+} ve maksimum olarak Mg^{+2} tarafından aktive edilirken, Cu^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} ve Cd^{+2} tarafından inhibe edildiği ve Hg^{+2} tarafından da tamamen inaktive olduğu bildirilmiştir. Enzim üzerine Li^{+} ve Ca^{+2} 'un hiçbir etkisi olmazken EDTA tarafından inhibe edilmiştir (Nawani *et al.*, 2006).

Nawani ve Kaur (2007), *Bacillus* sp.'den elde edilen lipazın Cu^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Cd^{+2} ve EDTA tarafından inhibe olduğunu Hg^{+2} 'nin ise tamamen inhibisyona yol açtığını bildirmişlerdir. Diğer yandan Ca^{+2} , Li^{+} , Mg^{+2} ve K^{+} 'un enzimi aktive ettiği ancak en çok Mg^{+2} tarafından aktive olduğu bildirilmiştir.

Yarrowia lipolytica'nın lipazının Ca^{+2} ve Mg^{+2} tarafından aktive edilirken Zn^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. EDTA'nın aktivite üzerine bir etkisinin olmadığı ve bu nedenle enzimin bir metalloenzim olmadığı ileri sürülmüştür (Yu *et al.*, 2007).

Chakraborty ve Raj (2008), *B. licheniformis*'den elde edilen metallolipazın Ca^{+2} ve Mg^{+2} tarafından aktive edildiğini ve Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} tarafından ise inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, EDTA'nın, 70 mM konsantrasyonda, lipaz aktivitesini önemli oranda inhibe ettiğini söylemişlerdir.

Serratia marcescens ECU1010'dan elde edilen lipazın Fe^{+2} , Fe^{+3} ve Zn^{+2} dışındaki pek çok metal iyonuna karşı aktivitesini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir. Enzimin EDTA tarafından önemli oranda inhibe olduğu ve bu nedenle bir metalloenzim olabileceği söylenmiştir (Zhao *et al.*, 2008).

2.5. LİPAZLARIN AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİTÖRLERİN ETKİSİ

Reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında en önemli adım enzim aktif merkezinde yer alan amino asit yan zincirlerinin saptanması ve konumlarının belirlenmesidir. Bu amino asitler bağlanma merkezi ve katalitik merkez olarak görev alırlar. X-ışını yöntemleri bu iki grup amino asidi belirlemede çok yararlıdır. Ancak yöntem enzim-substrat kompleksinin yeterince kararlı olduğu sınırlı sayıda örneğe uygulanabilmiştir. Sadece belirli, özel bir çevrede yer alan amino asit yan zincirleri ile seçimli olarak reaksiyon veren birkaç reaktif bilinmektedir (Uslan, 1997). Bu reaktiflerin başında serin yan zincirleriyle reaksiyona giren fenil metil sülfonil florür (PMSF) gelmektedir. Esterazlar ve lipazlar genelde katalizden sorumlu olan aktif bölgelerinde serin amino asidi içerirler. Esterazlar PMSF tarafından kuvvetle inhibe edilirken lipazlar genellikle inhibisyona uğramazlar ya da çok az inhibisyon gözlenir. Çünkü, lipazlar genellikle aktif bölgenin etrafını çeviren, ara-yüzey aktivasyonu ile ilişkili hidrofobik bir alana sahiptirler (Fojan, *et al.*, 2000; Sharma, *et al.*, 2001b).

Acinetobacter sp. RAG-1 lipazının (LipA) 1,4- dithiothreitol (DTT) (10 mM) ve β -merkaptetanol (10 mM) tarafından inhibe edilmediği bildirilmiş ve bu nedenle enzimin aktivitesi için disülfid bağlarına ihtiyaç duymadığı ileri sürülmüştür. Serin inhibitörü olan fenilmetilsülfonil florür (PMSF) önemli bir inhibisyona yol açmamıştır (Snellman *et al.*, 2002).

Bacillus thermoleovorans CCR11'den elde edilen lipazın serin inhibitörü olan PMSF tarafından kuvvetle inhibe edildiği bildirilmiş ve bu nedenle aktif bölgesindeki katalik üçlüde serin amino asidinin bulunduğu ileri sürülmüştür. Lipazın sülfidril grubu inhibitörü olan β -merkaptetanolden etkilenmediği bildirilmiştir (Castro-Ochoa *et al.*, 2005).

Geobacillus sp. TW1 lipazının 1 mM β -merkaptetanol, PMSF, DTT ve SDS ile 40 °C'de 15 dakika inkübasyon sonunda aktivitesini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir (Li ve Zhang, 2005).

Natronococcus sp. lipazının PMSF ile 40 °C'de 90 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin neredeyse tamamını kaybettiği bildirilmiş ve bu nedenle enzimin aktif bölgesinde serin amino asidinin bulunduğu ileri sürülmüştür (Boutaiba *et al.*, 2006).

Bacillus sp.'den elde edilen lipazın 100 mM'lık SDS, β -merkaptotanol, DTT ve 10 mM'lık eserin ile neredeyse tamamen inhibe olduğu, 100 mM'lık PMSF'nin ise % 40'ın üzerinde inhibisyona yol açtığı bildirilmiştir. Lipazın 1 M üre karşısında aktivitesini koruduğu söylenmiştir (Nawani *et al.*, 2006).

Bacillus sphaericus 205y'nin lipazının aktivitesi PMSF ile düşmüştür ve bu nedenle enzimin serin hidrolazlar sınıfına dahil olduğu ileri sürülmüştür. Enzim aktivitesi β -merkaptotanol ile aktivitesinin % 50'den fazlasını kaybetmiştir ve disülfid bağlarının enzim için önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Sulong *et al.*, 2006).

Pseudomonas aeruginosa'nın lipaz aktivitesinin SDS ve DTT tarafından büyük oranda inhibe olduğu buna karşın β -merkaptotanolün enzim aktivitesinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (Singh ve Banerjee, 2007).

Yarrowia lipolytica lipazının 1 mM'lık β -merkaptotanol ve DTT'den etkilenmezken bir protein denatürantı olan SDS'nin enzimi kuvvetle inhibe ettiği bildirilmiştir (Yu *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa PseA lipazı β -merkaptotanolün 1 ve 8 mM'lık konsantrasyonları ile sırasıyla % 48 ve 70 oranında inhibe olmuştur ve disülfid bağlarının enzimin stabilizasyonunda önemli olduğu ileri sürülmüştür. Sistein modifiye edici olan p-kloromerküri benzoat (PCMB)'nin 1 ve 8 mM'lık konsantrasyonlarında aktivitenin % 30 ve 20'si korunabilmiştir ve sisteinin lipaz aktivitesi için önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Serin inhibitörleri olan fenil metil sülfonil florür (PMSF) ve di-isopropilflorofosfat (DFP) ise çok az inhibisyona yol açmıştır (Gaur *et al.*, 2008).

2.6. LİPAZLARIN STABİLİTESİ ÜZERİNE ORGANİK ÇÖZÜCÜLERİN ETKİSİ

Lipaz üzerine organik çözücülerin etkisi lipazdan lipaza farklılık göstermektedir. Lipazların organik çözücülerdeki stabilitesi çeşitli organik sentezlerde kullanılırlarken önem taşımaktadır. Genel olarak suyla karışan polar çözücülerin suyla karışmayan çözücülere göre stabiliteyi daha çok azalttığı söylene de (Nawani *et al.*, 1998) bunun tam tersi yönde çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Pseudomonas sp. KWI-56 lipazı % 50'lik metanol, etanol ve aseton ile aktivitesinin sırasıyla % 76, 73 ve 47'sini korumuştur (Izumi *et al.*, 1990).

Bacillus sp. J 33 lipazı % 30'luk metanol, propanol, asetonitril ve dioksan ile 37 °C'de 2 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin yaklaşık % 50'sini kaybetmiştir. Benzen, hekzan ve DMSO'nun ise % 60'lık konsantrasyonda enzimi aktivitesini büyük oranda artırdıkları bildirilmiştir (Nawani *et al.*, 1998).

Bacillus sp. THL027 lipazı % 50'lik organik çözücülerle oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiş ve isopropanol ve metanol ile aktivitesinin % 87'sini, etanol ve asetonitril ile % 76'sını ve aseton ile % 65'ini korumuştur (Dharmstithi ve Luchai, 1999).

Rhizopus oryzae lipazının alkanlar ve uzun zincirli alkoller karşısında (isooktan, siklohekzan, heptan, hekzan, dodekanol, dekanol, hekzanol ve bütanol) oldukça stabil olduğu buna karşın aseton ve kısa zincirli alkoller (metanol, etanol ve propanol) gibi hidrofilik çözücüler tarafından denatüre edildiği bildirilmiştir (Hiol *et al.*, 2000).

Streptomyces rimosus lipazının suyla karışan organik organik çözücülerin (1,4-dioksan, tetrahidrofuran, aseton, N,N-dimetilformamid, DMSO, etanol) % 2,5'lik konsantrasyonlarında stimüle olduğu bildirilmiştir (Lešćić *et al.*, 2001).

Fusarium solani FS1 lipazının aktivitesi % 50'lik n-hekzan ve toluen ile 25 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda artarken, etanol, metanol ve kloroform inhibisyona yol açmıştır (Maia *et al.*, 2001).

Acinetobacter sp. RAG-1 lipazı (LipA) % 15 ve 30'luk izopropil alkol, dimetilformamid, aseton, dimetilsülfoksit, tetrahidrofuran, asetonitril ve piridin ile 30 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. LipA'nın tetrahidrofuranın % 30'luk konsantrasyonunda piridinin ise her iki konsantrasyonunda stabilitesini koruyamadığı, asetonitrilin ise yaklaşık % 30'luk bir inhibisyona yol açtığı bildirilmiştir. Enzimin diğer organik çözücüler karşısında stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Snellman *et al.*, 2002).

Aspergillus carneus lipazının izooktan, benzen, toluen ve ksilen ile 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Saxena *et al.*, 2003b).

İsopropanolün % 50'lik konsantrasyona kadar, etanol ve asetonun ise % 80'lik konsantrasyona kadar *Bacillus megaterium*'un lipaz aktivitesini artırdıkları bildirilmiştir. Saf isopropanol ile aktivitenin % 97'si korunurken saf etanol ve asetonunda önemli bir deaktivasyon gözlenmiştir. Suyla karışmayan organik çözücülerden n-heptan ile geri kalan aktivite % 121 iken, bütanol, toluen ve hekzan aktiviteyi etkilememiştir. Lipaz izooktan karşısında aktivitesinin yaklaşık % 30'unu kaybetmiştir (Lima *et al.*, 2004).

Pseudomonas sp. S5 lipazının % 25 konsantrasyondaki çeşitli organik çözücülerle (1-pentanol, benzen, kloroform, toluen, 1-oktanol, siklohekzan, n-hekzan, 1-dekanol, n-dekan, n-dodekan, n-tetradekan ve n-hekzadekan) 37 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda 1-oktanol dışındakilere karşı stabilitesini koruduğu ve siklohekzan, benzen ve n-hekzan karşısında aktivitesinin sırasıyla % 31,8, 30,6 ve 18,6 oranında arttığı bildirilmiştir. Enzim benzen, toluen, n-hekzan ve 1-dekanol ile 2 saat inkübasyon sonunda ise tamamen inaktive olmuştur (Rahman *et al.*, 2005).

Bacillus thermoleovorans CCR11'den elde edilen lipazın, % 70'lik metanol, etanol, 2-propanol ve asetonla 30 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu bildirilmiştir (Castro-Ochoa *et al.*, 2005).

Acinetobacter sp. ES-1 lipazı % 10'luk DMSO, metanol, asetonitril, hekzan, izooktan, izopropanol, dekan, hegzadekan ve 1-hegzadekan ile 30 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve DMSO dışındakiler tarafından inhibe edilmiştir (Lee *et al.*, 2006).

Bacillus sphaericus 205y'nin lipazı çeşitli organik çözücülerle 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve metanol, p-ksilen, n-dekan ve DMSO'ya karşı yüksek bir stabilite göstermiştir. Bunun yanında, toluen ve n-dodekan ile aktivitesinin % 50'sini asetonitril ve n-bütanol ile ~ % 70'ini, n-dodekan ile ~ % 57'sini kaybetmiştir (Sulong *et al.*, 2006).

Bacillus sp. lipazının aktivitesi üzerine % 30'luk organik çözücülerin etkisi incelendiğinde benzen ve hekzanın enzimi büyük oranda stimüle ettiği bildirilmiştir. Etilen glikol hiçbir etki göstermezken etanol, metanol ve propanol yaklaşık % 40 inhibisyona yol açmıştır (Nawani ve Kaur, 2007).

Aspergillus niger MYA 135 lipazı metanol, etanol, propanol ve aseton gibi suyla karışan organik çözücülerle 37 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin yaklaşık % 70'ini korumuştur. Suyla karışmayan organik çözücüler (bütanol, hekzanol, n-hekzan ve heptan) ise enzim aktivitesinde düşüşe yol açmışlardır (Romero *et al.*, 2007).

Yarrowia lipolytica lipazının % 10'luk aseton, metanol, etanol, izopropanol ve DMSO ile 30 °C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin neredeyse % 90'ını koruduğu ancak asetonitrilin enzimi tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir. Lipaz organik çözücülerin % 20'lik konsantrasyonlarıyla inkübe edildiğinde aseton, etanol ve izopropanol aktiviteyi tamamen inhibe ederken, metanol ile aktivitenin % 60'ı ve DMSO ile % 95'i korunmuştur (Yu *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa PseA lipazının hem polar (DMSO, metanol, etanol ve propanol) hem de nonpolar (benzen, toluen, ksilen, sikloheksan, hekzan, n-heptan, izooktan, dekan, tetradekan) çözücülerin % 25'lik konsantrasyonları karşısında 24 saat stabilitesini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir (Gaur *et al.*, 2008).

Serratia marcescens ECU1010 lipazı % 10'luk DMSO, metanol, izopropanol, etanol ve aseton ile 30 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin en azında % 85'den fazlasını korumuş hatta DMSO enzim aktivitesini % 8 oranında artırmıştır. Ancak aynı çözeltilerin % 50'lik konsantrasyonları enzimi inhibe etmişlerdir (Zhao *et al.*, 2008).

Pseudomonas fluorescens JCM5963'den elde edilen lipaz % 30'luk organik çözücülerle 1 ve 24 saat inkübe edilmiş ve suyla karışan organik çözücülerin hemen hepsiyle (izopropanol, metanol, etanol, aseton ve gliserol) aktive olmuştur. Enzimin izoamil alkolle 1 saat inkübasyonu sonunda geri kalan aktivitesi % 142 olarak bulunmuştur. Buna karşın sikloheksan, kloroform ve benzen gibi suyla karışmayan organik çözücülerle 1 saat inkübasyon sonunda aktivitenin sırasıyla % 80, 65 ve 33'ü korunurken, 24 saat sonunda sırasıyla % 87, 91 ve 56'sı korunmuştur (Zhang *et al.*, 2009).

2.7. LİPAZLARIN STABİLİTESİ ÜZERİNE DETERJANLARIN ETKİSİ

Lipazların endüstrideki en yaygın kullanım alanı deterjanlardaki kullanımlarıdır. Bu nedenle lipazların çeşitli deterjanlar karşısındaki aktivite ve stabilitesinin bilinmesi önemlidir. Bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır.

Pseudomonas sp. KWI-56 lipazının anyonik deterjanlardan SDS (sodyum dodesil sülfat) ve LBS (sodyum laurilbensülfonat) tarafından kuvvetle inhibe edildiği, sodyum kolat, sodyum deoksikolat ve sodyum taurokolat karşısında aktivitesinin sırasıyla % 20, 37 ve 50'sini koruyabildiği bildirilmiştir. Enzim aktivitesinin Tween 80 ile % 29'u ve Triton X-100 ile % 57'si korunmuştur (Iizumi *et al.*, 1990).

Pseudomonas pseudoalcaligenes F-111'in lipaz aktivitesinin % 0,1'lik katyonik deterjanların (SDS, sodyum tripolifosfat, sodyum dodesil benzen sulfonat, sodyum alkilbenzen sulfonat) hiçbirinden etkilenmediği bildirilmiştir. Diğer yandan noniyonik deterjanların enzimi aktive ettikleri ve % 0,1'lik Triton X-100, Tween 80 ve Span 80 ile geri kalan aktivitenin sırasıyla % 149, 111 ve 134 olduğu bildirilmiştir (Lin *et al.*, 1996).

Bacillus thermocatenulatus lipazının % 1'lik SDS, Lubrol PX, Tween 20 ve Tween 80 ile hızla inaktive olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber enzim CHAPS ve oktil- β -D-glukopiranozit (OGP) ile % 40 oranında, Triton X-100 ve kolat ile % 80 oranında aktive olmuştur (Rúa *et al.*, 1997).

Bacillus sp. J 33 lipazının % 0,1 Triton X-100, Tween 80, Tween 20 ve deoksikolik asit karşısında sırasıyla % 40, 20, 60 ve 40 oranında stimüle edildiği buna karşın sodyum taurokolat ve setrimitin aktiviteyi etkilemediği bildirilmiştir. SDS ise lipaz aktivitesini tamamen inhibe etmiştir (Nawani *et al.*, 1998).

Sodyum kolat ve sodyum taurokolat 1 mM'dan 7 mM'a kadar *Rhizopus oryzae* lipazının aktivitesinde hafif bir artışa yol açarken aynı konsantrasyondaki SDS enzimi inhibe etmiştir (Hiol *et al.*, 2000).

Bacillus sp. H-257'nin monoaçilgliserol lipazının kolat (1 ve 5 mM) tarafından inhibe olmadığı fakat Triton X-100 (% 1,05) ve deoksikolat (5 mM) tarafından hafif bir inhibisyonun gözlemlendiği bildirilmiştir (Imamura ve Kitaura, 2000).

Aspergillus carneus lipazı SDS (5 mM) ve N-lauroilsarkozin (15 mM) tarafından neredeyse tamamen inhibe edilmiştir. Kolik asit 20 mM konsantrasyonda hafif bir inhibisyona yol açarken taurokolik asit denenen tüm konsantrasyonlarda (5-20 mM) aktiviteyi artırmıştır. Katyonik bir sürfaktan olan hekzadesil trimetil amonyum bromid yüksek konsantrasyonda (20 mM) lipaz aktivitesini artırırken, zwitteriyonik bir deterjan olan CHAPS 5 mM konsantrasyonda aktiviteyi artırmış yüksek konsantrasyonlarda ise aktivitede ani bir düşüş görülmüştür (Saxena *et al.*, 2003b).

Bacillus thermoleovorans CCR11 lipazının % 1 Triton X-100 karşısında aktivitesinde hafif bir artış (% 108) gözleendiği buna karşın % 1 SDS, Tween 80 ve Tween 20'nin aktiviteyi tamamen inhibe ettiği bildirilmiştir (Castro-Ochoa *et al.*, 2005).

Geobacillus sp. *TWI* lipazının % 0,1'lik Triton X-100, CHAPS ve Tween 20 karşısında aktivitesini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir (Li ve Zhang, 2005).

Rhizopus homothallicus'un lipaz aktivitesinin Tween 80, Triton X-100 ve sodyum taurodeoksikolat tarafından stimüle edildiği, SDS'nin ise inhibe edici bir etkisinin olduğu bildirilmiştir (Diaz *et al.*, 2006).

Aspergillus niger lipazının 7 mg/mL'lik SDS, Tween 80 ve bütün ticari deterjanlar (Henko, Surf Ultra, Ariel, Surf Excel, Tide) karşısında stabilitesinde bir artış olduğu bildirilmiştir (Saisubramanian *et al.*, 2006).

Yarrowia lipolytica lipazının % 0,1'lik Tween 80 ve Span 65 ile aktivitesinde hafif bir artış olduğu, Triton X-100 ve Span 85'in aktiviteyi etkilemediği bildirilmiştir (Yu *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa PseA lipazının non-iyonik deterjanlar olan Tween 80 ve Brij 35 (% 1) tarafından stimüle edildiği ve anyonik deterjan sodyum deoksikolatın sadece % 10'luk bir inhibisyona yol açtığı bildirilmiştir. Katyonik bir deterjan olan setiltrimetilamonyum bromid (CTAB) ise enzimi inaktive etmiştir (Gaur *et al.*, 2008).

Staphylococcus aureus lipazının 20 mM'lık Triton X-100, Tween 80, sodyum kolat ve sodyum taurokolat ile % 1'lik ticari deterjanlar (Ariel, Axion, Omino Bianco) karşısında aktivitesinin tamamını koruduğu bildirilmiştir. Enzim okside edici ajanlar olan H₂O₂ ve sodyum perborat (% 10) ile aktivitesinin sırasıyla % 60 ve % 70'ini koruyarak yüksek bir stabilite göstermiştir (Horchani *et al.*, 2009).

2.8. LİPAZLARIN SUBSTRAT SPESİFİTESİ

Lipazlar, substrat spesifiteleri temelinde üç gruba ayrılırlar; 1,3-spesifik lipazlar, nonspesifik lipazlar ve belirli yağ asitlerine karşı spesifite gösteren lipazlar (Gandhi, 1997). Bu konuda yapılan çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Rhizopus oryzae lipazının çeşitli triaçilgliseroller arasında en yüksek aktiviteyi trioktanoine karşı gösterdiği ve enzimin birincil ester bağlarını hidrolizleyerek pozisyon açısından 1,3-spesifik lipaz olduğu bildirilmiştir (Hiol *et al.*, 2000).

Pseudomonas aeruginosa LST-03 lipazının triaçilgliseroller arasında en yüksek aktiviteyi trikaproine (C6) karşı gösterdiği ve pozisyon spesifitesi açısından ise nonspesifik olduğu bildirilmiştir (Ogino *et al.*, 2000).

Streptomyces rimosus lipazının orta zincir uzunluğundaki (C8-C12) yağ asidi esterlerini tercih ettiği belirlenmiştir. Enzimin doymamış yağ asidi esterlerini hidrolizleme hızının aynı uzunluktaki doymuş yağ asidi esterlerine göre çok fazla olduğu, ayrıca, *cis* çift bağları *trans* bağlara tercih ettiği bildirilmiştir. Enzimin Tween deterjanların (Tween 20, 40, 60 ve 80) hepsini farklı oranlarda hidrolizlediği de bildirilmiştir. *S. rimosus* lipazının pozisyon spesifitesi açısından nonspesifik olduğu söylenmiştir (Lešćić *et al.*, 2001).

Acinetobacter sp. RAG-1 lipazının çeşitli p-nitrofenil esterler arasında maksimum aktivitesini orta zincir uzunluğundaki (C6 ve C8) yağ asidi esterlerine karşı gösterdiği ancak geniş bir aralıkta (C2-C18) aktif olduğu bildirilmiştir (Snellman *et al.*, 2002).

Aspergillus carneus lipazı ketentohumu yağı, soya yağı ve mısır yağı gibi farklı yağlara karşı yüksek aktivite göstermekle birlikte en yüksek aktiviteyi ayçiçek yağına karşı göstermiştir. Enzim p-nitrofenil esterlerden en yüksek aktiviteyi 12 karbon uzunluğundaki p-nitrofenil laurata karşı göstermiştir. Enzimin pozisyon spesifitesi incelendiğinde trioleinin birincil ester bağlarını hidrolizlediği ve dolayısıyla 1,3-spesifik lipaz olduğu bildirilmiştir (Saxena *et al.*, 2003b).

Bacillus thermoleovorans CCR11 lipazının çeşitli karbon uzunluğundaki (C2-C18) p-nitrofenil esterlere karşı spesifitesi incelendiğinde en yüksek aktivitesini p-nitrofenil kaproata karşı gösterdiği ve lipazın orta zincir uzunluğundaki substratları tercih ettiği bildirilmiştir (Castro-Ochoa *et al.*, 2005).

Pseudomonas sp. S5 lipazının çeşitli triaçilgliseroller ve doğal yağlara karşı spesifitesi incelenmiş ve en yüksek aktiviteyi hurma yağına karşı gösterdiği ve bunu hidistan cevizi yağının izlediği belirlenmiştir. Enzimin triaçilgliseroller arasında maksimum aktivitesini en yüksek zincir uzunluğundaki trioleine karşı gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin pozisyon spesifitesi açısından ise nonspesifik olduğu bildirilmiştir (Rahman *et al.*, 2005).

Natronococcus sp. lipazının çeşitli karbon uzunluğundaki (C2-C18) p-nitrofenil esterlere karşı spesifitesi incelenmiş ve en yüksek aktiviteyi pNPP (C16)'a karşı gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin pNPP ile karşılaştırıldığında pNPA (C2)'a karşı 10 kat daha az aktivite gösterdiği ve lipazın uzun zincirli yağ asidi esterlerini tercih ettiği söylenmiştir (Boutaiba *et al.*, 2006).

Acinetobacter sp. ES-1 lipazının tercihen orta ve uzun zincir uzunluğundaki triaçilgliseroller (C6-C16) hidrolizlediği ve kısa zincirli yağ asitlerine (C2-C4) karşı aktivite göstermediği bildirilmiştir. Enzim uzun zincirli doymuş yağ asidi içeren tristearine (C18:0) karşı aktivite göstermezken en yüksek aktiviteyi doymamış yağ asidi içeren trioleine (C18:1) karşı göstermiştir. Araştırmacılar enzimin doymamış yağ asitlerine karşı spesifite gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Lipaz p-nitrofenil esterlerin hidrolizinde de benzer bir davranış göstermiş fakat kısa (C2-C4) veya uzun (C16-C18) zincirli esterlerdence orta zincir uzunluğundaki esterleri tercih etmiştir (Lee *et al.*, 2006).

Bacillus sp. lipazının kısa zincirli triaçilgliserollerini tercih etmekle birlikte uzun zincirli triaçilgliserollerini de hidrolizleyebildiği ve hidroliz sırasında ester bağlarının pozisyonu açısından nonspesifik olduğu bildirilmiştir (Nawani *et al.*, 2006).

Bacillus sphaericus 205y'nin lipazının farklı karbon uzunluğundaki (C2-C18) trigliseritleri hidrolizleyebildiği fakat en yüksek aktivitesini orta zincir uzunluğundaki substratlar olan trikaprilin (C8) (% 77) ve trikaprin (C10)'e (% 100) karşı gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin kısa zincir uzunluğundaki substratlara (C2-C6) karşı sadece % 3 ve uzun zincirli substratlara (C14-C18) karşı ise % 20 aktivite gösterdiği saptanmıştır (Sulong *et al.*, 2006).

Bacillus sp. lipazının daha çok uzun zincirli triaçilgliserollerini tercih ettiği ve trigliseritlerin ester bağlarını hidrolizlerken pozisyon açısından nonspesifik olduğu bildirilmiştir. Trioleinin hidrolizi sonucunda son ürün olarak 1,2-diolein, oleik asit, 1,3-diolein ve 1-monoolein oluşmuştur (Nawani ve Kaur, 2007).

Yarrowia lipolytica lipazının zeytinyağı, yalancı safran yağı gibi trigliseritlere karşı metil yağ asidi esterleri gibi hidrofilik esterlerden daha yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin, çeşitli metil yağ asidi esterleri arasında C12-C16 metil esterlere karşı daha yüksek aktivite gösterdiği ve en yüksek aktiviteyi metil miristata (C14) karşı gösterdiği bildirilmiştir (Yu *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa PseA lipazının tercihen uzun zincirli esterlere spesifite gösterdiği bildirilmiştir. Lipaz en yüksek aktiviteyi ise p-NPP (C16)'a göstermiştir. Lipazın pozisyon spesifitesi açısından nonspesifik olduğu, yani triaçilgliserolün her üç pozisyonundaki ester bağlarını da kırabildiği bildirilmiştir (Gaur *et al.*, 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. KİMYASALLAR

Zeytinyağı, trikaprilin, triolein, tween 40 (poli(oksietilen) sorbitan monopalmitat), tween 80 (poli(oksietilen) sorbitan monooleat), p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil palmitat, brij-35, Luria-Bertani (LB) broth, lizozim, proteinaz K, agaroz, gliseril trioleat, 1,3-diölein, 1,2-diöleoil gliserol ve 1-öleoil gliserol **Sigma firmasından**; mısır yağı, soya yağı, badem yağı, pamuk yağı, triasetin, tribütirin, trikaproin, trikaprin, trilaurin, trimiristin, tripalmitin, tristearin, span 20 (sorbitan monolaurat), span 40 (sorbitan monopalmitat), span 60 (sorbitan monostearat), span 80 (sorbitan monooleat), p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil kaprilat, p-nitrofenil kaprat, p-nitrofenil laurat, fenil metil sülfonil florit (PMSF), TEMED, 1,4- dithiothreitol (DTT), N-bromo suksinamit (NBS), sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC), bütanol, arabic gum, agar, rhodamine-B, pepton, tripton, jelatin, kazein hidrolizat, skim milk, akrilamid, N,N-metilen bisakrilamid ve fenol-kloroform-izoamilalkol **Fluka firmasından**; tween 60 (poli(oksietilen) sorbitan monostearat), sodyum dodesil sülfat (SDS), triton X-100, NH₄Cl, AlCl₃, CuCl₂, BaCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, MgCl₂, MnCl₂, NiCl₂, NaCl, KCl, HgCl₂, PbCl₂, CoCl₂, EDTA, amonyum sülfat, amonyum per sülfat, amonyum nitrat, sodyum hidroksit, p-nitrofenol, sodyum hipoklorit, β-merkaptöetanol, metanol, etanol, isopropanol, hekzan, aseton, kloroform, gliserol, glisin, titrisol, CASO agar, triptik soy broth, yeast ekstrakt (maya özütü) ve beef ekstrakt (et özütü) **Merck firmasından**; ketentohumu yağı ve siklohekzan **Aldrich firmasından**; tween 20 (poli(oksietilen) sorbitan monolaurat), 1,4-dioksan, etilen glikol ve dimetil sülfoksit (DMSO) **Panreac firmasından**; CaCl₂, üre, dietileter, etilasetat, hidrojen peroksit, benzen, toluen, ksilol, oleik asit ve sodyum asetat **Riedel- de Haen firmasından**; Na₂O₃Se, LiCl, sodyum taurokolat, setrimit ve 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilamonyo]-1-propansulfonat (CHAPS) **ABCR firmasından**; sodyum deoksikolat, n-oktil-β-D-glukopiranozit ve sorbitol **ACROS firmasından**; asetonitril **sds firmasından**; mannitol **Lab M firmasından**; RNase **AppliChem firmasından**; Taq polimeraz, dNTP ve PCR tamponu **Fermentas firmasından** sağlanmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kalitatif Lipolitik Aktivite Tayini

ADÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Stokları'nda kayıtlı bulunan çeşitli doğal kaynaklardan izole edilmiş 201 adet termofilik bakteri lipolitik aktiviteleri açısından taranmıştır. Çalışmaya başlanmadan önce bakteri stokları, içeriği Çizelge 3.1'de verilen Luria-Bertani (LB) agar ortamında 65 °C'de 24 saat geliştirilmişlerdir. Bakteri stokları daha sonra steril koşullar altında % 20'lik skim milk çözeltisi içeren cryotüplere aktarılmış ve ADÜ Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarında – 80 °C'de saklanmaktadır.

Çizelge 3.1 Luria Bertani (LB) agar ortamının içeriği

Kimyasal madde	Miktarı
Tripton	% 1
Yeast ekstrakt (maya özütü)	% 0,5
NaCl	% 1
Agar	% 1,5
121 °C' de 15 dakika sterilizasyon	

Lipolitik aktivite taraması için Tween 80 ve CaCl₂ içeren LB agar ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Hazırlanan ortam otoklavda (Hirayama, HA-40MIV, Japan) sterilize edilmiştir ve yine steril koşullarda petrilere aktarılmıştır. Stok kültürlerden petrilere çizgi ekimi yapılarak 65 °C'deki etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında oluşan opak zon pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Smibert ve Krieg, 1994).

Çizelge 3.2 Tween 80'li agar ortamı

Kimyasal madde	Miktarı
Tripton	% 1
Yeast ekstrakt (maya özütü)	% 0,5
NaCl	% 1
CaCl ₂	% 0,01
Agar	% 1,5
Tween 80	% 1
pH 7,00	
121 °C' de 15 dakika sterilizasyon	

Yukarıdaki yöntemle göre lipolitik aktivite bakımından pozitif sonuç veren izolatlar lipaz aktiviteleri açısından tekrar yeni bir taramaya tabi tutulmuşlardır. Bunun için ise Rhodamin-B yöntemi kullanılmıştır (Kouker ve Jaeger, 1987). Bu amaçla kullanılan ortamın içeriği Çizelge 3.3'te verilmiştir. Arabic gum içeren LB agar ortamı ve zeytin yağı ayrı olarak otoklavda sterilize edilmiştir. Rhodamin-B çözeltisinin % 0.1'lik stok çözeltisi hazırlanmış ve fitre ile sterilize edilerek zeytin yağına eklenmiş ve karıştırılmıştır. Bu karışım daha sonra arabic gum içeren LB ortamına steril koşullarda eklenerek homojenizatörde 1 dakika boyunca emülsifiye edilmiş ve petrilere dökülmüştür. Petrilere stok kültürlerden çizgi ekimi yapılmış ve 65°C'deki etüvde 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrilere 350 nm'deki UV ışık (UVP-UVGL-58) altında incelenmiştir. Floresan turuncu renk oluşturan koloniler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.3 Rhodamin-B agar ortamı

Kimyasal madde	Miktarı
Tripton	% 1
Yeast ekstrakt (maya özütü)	% 0,5
NaCl	% 1
Arabic gum	% 1
Agar	% 1,5
Zeytin yağı	% 2,5
pH 7,00	
121 °C' de 15 dakika sterilizasyon	
Rhodamin-B	% 0,001

3.2.2. Kantitatif Lipaz Aktivite Tayini

Kantitatif lipaz aktivite tayini iki şekilde yapılmıştır. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi ve enzimin gerçek substratlarına karşı spesifitesi ayrıntıları ileride belirtilecek olan pH-stat yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Diğer bütün denemelerde, lipaz aktivitesi substrat olarak p-NPL (p-nitrofenil laurat) kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Sigurgisladottir *et.al.*, 1993). p-NPL etanolde 10 mM konsantrasyonda hazırlanmış ve reaksiyon karışımına final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde eklenmiştir. Aktivite tayini enzimin optimum

sıcaklık ve pH'ı belirlenmeden önce çizelge 3.4'de belirtilen koşullar altında gerçekleştirilmiş, optimum koşullar belirlendikten sonra ise çizelge 3.5'deki koşullar altında gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımlarına 0,25 mL 0,1 M Na₂CO₃ eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Karışımlar 10.000 x g'de 15 dakika santrifüjlenmiş (Heraeus-Biofuge pico, Germany) ve süpernatantların 410 nm'de köre karşı absorbanları spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japan) ölçülmüştür.

Çizelge 3.4 Kantitatif lipaz tayininde reaksiyon bileşenleri

Kör	Örnek
0,8 mL Tris-HCl (50 mM, pH 8,00)	0,8 mL Tris-HCl (50 mM, pH 8,00)
0,1 mL LB broth	0,1 mL enzim çözeltisi
0,1 mL pNPL (10 mM, etanolde)	0,1 mL pNPL (10 mM, etanolde)
65 °C' de 30 dakika inkübasyon	
0,25 mL 0,1 M Na ₂ CO ₃	
10.000 x g'de 15 dk santrifüj	
410 nm'de spektrofotometrede ölçüm	

Çizelge 3.5 Optimum koşullar altında standart kantitatif lipaz tayininde reaksiyon bileşenleri

Kör	Örnek
0,8 mL Glisin-NaOH tamponu (50 mM, pH 9,00)	0,8 mL Glisin-NaOH tamponu (50 mM, pH 9,00)
0,1 mL Tris-HCl tamponu (20 mM, pH 8,00)	0,1 mL enzim çözeltisi
0,1 mL pNPL (10 mM, etanolde)	0,1 mL pNPL (10 mM, etanolde)
50 °C' de 30 dakika inkübasyon	
0,25 mL 0,1 M Na ₂ CO ₃	
10.000 x g'de 15 dk santrifüj	
410 nm'de spektrofotometrede ölçüm	

Bir ünite lipaz aktivitesi, reaksiyon koşulları altında 1 dakikada pNP-laurattan 1 µmol p-nitrofenol oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak belirtilmiştir.

Aktivitenin hesaplanması aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır;

$$VA = \left(\frac{V}{l \cdot \epsilon \cdot v \cdot t} \cdot A \right) \cdot SF$$

$$SA = \frac{VA}{\text{mg protein/mL}}$$

SA: spesifik aktivite (U/mg)

VA: volum aktivite (U/mL)

V: reaksiyon hacmi (mL)

l: ışık yolu (1cm)

ϵ : molar absorbans katsayısı ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

v: örnek hacmi (mL)

t: inkübasyon zamanı (30 dk)

A: absorbans

SF: seyreltme faktörü

3.2.2.1. p-Nitrofenol'ün farklı pH'lardaki molar absorbans katsayılarının belirlenmesi

p-Nitrofenol (pNP)'ün farklı pH'lardaki molar absorbans katsayılarını belirlemek için öncelikle pNP 50 °C'lik etüvde 24 saat kurutulmuştur. Daha sonra pNP'ün 1 mM'lık stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiliden pH 5,00-11,90 arasındaki tamponlarla final konsantrasyonu 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 ve 0,05 M olacak şekilde uygun hacimde seyreltmeler yapılmış ve 410 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen değerlerle absorbansa karşı konsantrasyon grafikleri çizilmiş ve grafiğin eğiminden molar absorbans katsayıları belirlenmiştir.

3.2.3. Protein Tayini

Çalışma boyunca protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Bradford, M. M., 1976). Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250

boyasının proteinlere bağlanması esasına dayanan bir yöntemdir. Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yüklüdür, bu durumda kırmızı renklidir ve 470 nm’de maksimum absorbans verir. Boya proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 590 nm’de maksimum absorbans verir. Bu yöntemde renk oluşumu 2 dakika sonra gerçekleşir ve 1 saat stabil kalır. Bradford yöntemine göre protein tayini yapılırken kullanılan çözeltiler ve standartların hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

3.2.3.1. Coomassie brilliant blue G250 çözeltisinin hazırlanışı

Coomassie Brilliant Blue G250’nin 100 mg’ı 50 mL % 95’lik etil alkolde çözülmüştür. Çözelti daha sonra 100 mL % 85’lik fosforik asitle karıştırılmış ve hacmi distile su ile 1 L’ye tamamlanmıştır. Boya çözeltisi daha sonra filtre kâğıdından süzümüştür.

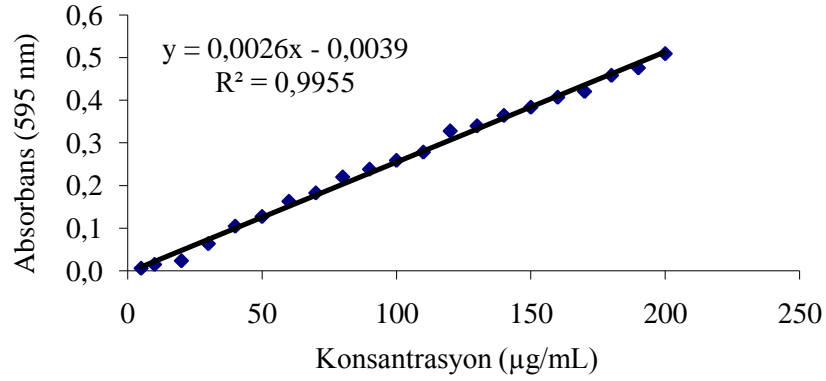
3.2.3.2. Protein standartlarının hazırlanışı

Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA’nın 1 mg/mL’lik stok çözeltisi hazırlanmıştır. Standart çözeltiler bu stoktan 5-200 µg/mL olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.2.3.3. Yöntem

Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100’er µL aktarılmış, köre ise 100 µL ultra saf su eklenmiştir. Bütün tüplere 5’er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklenmiş ve karıştırılmıştır. İki dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okunmuş ve protein standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.1).

Denemeler boyunca örneklerin protein tayini yukarıdaki yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin protein miktarları, protein standart eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1 Protein standart eğrisi

3.2.4. HBB-134 İzolatının 16S rRNA Analizi İle Tanılanması

3.2.4.1. İzolatdan genomik DNA izolasyonu

HBB-134 izolatının genomik DNA'ları Ronimus *et al.* (1997)'nin modifiye edilmiş fenol-kloroform yöntemi ile izole edilmiştir. Fenol-kloroform yönteminde, öncelikle izolatın, Caso agar ortamında (Çizelge 3.6) gecelik kültürü hazırlanmıştır. Ertesi gün bu kültürden tek koloni alınarak, sıvı ortama ekim yapılmış ve kültürler 24 saat boyunca 65°C'de geliştirilmiştir. Bu sıvı kültürlerden, eppendorf tüplerine 1 mL aktarılmıştır. 4000 x g'de 10 dakika (+4 °C) santrifüjlenen örneklerden üst faz atılmış ve pellet üzerine içeriği Çizelge 3.7'de verilen lizis tamponundan 500 µL eklenmiştir. 13.000 rpm de 5 dakika (+4 °C'de) santrifüjlenen örneklerden üst faz tekrar atılmış ve tüplerdeki pellet üzerine 75 µL lizozim (20 mg/mL) ve 425 µL lizis tamponu eklenmiştir. Tüpler alt-üst edilerek karıştırılmış ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, tüplere 20 µL RNAz A (10 mg/mL) ve 25 µL SDS (% 20'lik) eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 6,5 µL Proteinaz K ile muamele edilen örnekler, 50 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Tüplere fenol: kloroform: izoamil alkol karışımından eklenmiş ve 13.000 rpm'de 5 dakika (+4 °C) santrifüjlenmiştir. Üstteki berrak faz toplanarak 1/10 (v/v) oranında Na-asetat (3 M, pH 5.50) eklenmiş ve tüpler alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Tekrar eşit hacimde (v/v) olacak şekilde izopropanol eklenerek 30 °C' de 30 dakika bekletilen tüpler 13.000 rpm'de 20 dakika (+4 °C) santrifüjlenmiştir. Üst faz atılarak pelletin üzerine 500 µL

etil alkol (% 70) eklenmiştir. 15.000 rpm'de 5 dakika (+4 °C) santrifüjlenen örneklerden üst faz tekrar atılmış ve tüpler 50 °C'lik etüvde tutularak alkol uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 50 µL steril distile su eklenmiş ve tüpler kullanılana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Genomik DNA'yı görüntülemek amacıyla örneklerin % 0.8'lik agarozda elektroforezi yapılmıştır (Thermo EC330). Elektorofrez sonunda, DNA bantları UV (UVP LM-20E) cihazı ile görüntülenmiştir.

Çizelge 3.6 CASO agar ortamının içeriği

Kimyasal madde	Miktarı
Kazein pepton	% 1,7
Soya pepton	% 0,3
D (+) glukoz	% 0,25
Sodyum klorür	% 0,5
Dipotasyum hidrojen fosfat	% 0,25
Agar	% 1,5
121 °C' de 15 dakika sterilizasyon	

Çizelge 3.7 Lizis tamponunun içeriği

Kimyasal madde	Miktarı
Tris-HCl	50 mM
EDTA	20 mM
Glukoz	% 0,99
0,1 M NaOH ile pH 8,00'e ayarlanır	

3.2.4.2. PCR ve 16S rRNA analizi

HBB-134 suşunun genomik DNA'sı izole edildikten sonra 16S rRNA geni 341F (5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG3')-985R (5' GTA AGG TTC TTC GCG TT 3') ve 20F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1390R (5'- GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3') primerleri kullanılarak yaklaşık 1300 bp'lik bölge PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu karışımı 100 µL için; Taq buffer (10X) 10 µL, dNTP (10 mM) 2 µL, MgCl₂ (25 mM) 8 µL, Primer (100 mM) 0,4 µL, Taq polimeraz 0,6 µL, steril distile su 79 µL olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR tüplerine karışımdan 30 µL dağıtılmış ve 2 µL DNA eklenmiştir. Tüm amplifikasyon koşulları 94 °C'de 5 dakikalık ön denatürasyon, 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 50 °C'de 30 saniye bağlanma ve 72 °C'de 10 saniye uzamadan oluşan 35 siklusk amplifikasyon ve 72 °C'de 15 dakikalık son uzamadan oluşacak şekilde programlanmıştır.

Tüm sekans işlemlerinde sekanslanacak genler standart protokollere göre saflaştırılarak, Macrogen (Kore)'de, (ABİ 3730 XL) sekans cihazında dizi analizi yaptırılmıştır. Sekanslar gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve homolojiler belirlenmiştir.

3.2.5. *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'den Lipaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

3.2.5.1. Lipaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini saptamak için çeşitli karbon kaynakları (zeytinyağı, badem yağı, mısır yağı, pamuk tohumu yağı, keten tohumu yağı, soya yağı, triolein, gliserol, zeytin atık suyu, Tween (20, 40, 60 ve 80), glukoz, fruktoz, sukroz, laktöz) ve ticari olarak satılan bazı yağlar (ruşeym yağı, pamuk yağı (TARİŞ), mısır yağı (SIRMA), ayçiçeği yağı (YUDUM), soya yağı (SOYOLA), fındık yağı (ÇOTANAK) ve zeytinyağı (geleneksel üretim)) kullanılmıştır.

Yağlar dışındaki karbon kaynakları için LB broth ortamı kontrol (Kontrol 1) olarak kullanılırken, yağlı ortamlar için % 0,5 g gum arabic içeren LB broth ortamı kontrol (Kontrol 2) olarak kullanılmıştır. Kontrol 1 ve Kontrol 2 olarak kullanılan besi ortamlarının içeriği Çizelge 3.8'de verilmiştir. Karbon kaynakları final konsantrasyonları % 0,1, 0,5 ve 1 olacak şekilde Kontrol 1 ortamına eklenmişler ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmişlerdir. Yağlar ise Kontrol 2 ortamına % 0,1, 0,5 ve 1 konsantrasyonlarda eklenmiş ve karıştırıcının (WARING,

Commercial Blender 8011ES, USA) en yüksek hızında 2 dakika boyunca emülsifiye edildikten sonra otoklavda sterilize edilmişlerdir.

HBB 134 suşunun stok kültüründen LB broth içeren tüpe inoküle edilerek 65 °C'deki etüvde (Incucell-MMM, Germany) bir gece inkübe edilmiştir. Gecelik kültürün absorbansı 600 nm'de 0,1 olacak şekilde ayarlanmış ve 50 mL besi ortamı içeren 250 mL'lik erlenlere % 1 oranında inoküle edilmiştir. Kültürler 65 °C'deki inkübatörde (Newbrunswick Scientific Innova 43, USA) 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda pNPL ile spektrofotometrik olarak hücre içi lipaz aktiviteleri tayin edilmiş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Çizelge 3.8 Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi incelenirken kullanılan kontrol besiyerleri

Kimyasal madde	Kontrol 1 (LB broth)	Kontrol 2
Tripton	% 1	% 0,1
Yeast ekstrakt (maya özütü)	% 0,5	% 0,5
NaCl	% 1	% 1
Arabic gum	-	% 0,5
pH 7,00		
121 °C' de 15 dakika sterilizasyon		

Kuru ağırlıkları belirlemek amacıyla kültürler 2500 x g de 15 dakika santrifüjlenmiş (Heraeus-Labofuge 200, Germany), süpernatant atılmış ve üzerine aynı hacimde distile su eklenerek karıştırılmış ve tekrar aynı hızda santrifüjlenmiştir. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır. En son kalan pellet 80 °C'deki etüvde 24 saat kurutulduktan sonra ağırlıkları ölçülerek hücrelerin kuru ağırlıkları tayin edilmiştir.

3.2.5.2. Lipaz üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi

Enzim üretimi üzerine çeşitli azot kaynaklarının etkisini araştırmak için LB ortamındaki yeast ekstrakt ve tripton çıkarılarak bunların yerine çeşitli organik (yeast ekstrakt, tripton, pepton, kazein hidrolizat, üre, jelatin, beef ekstrakt) ve inorganik (amonyum sülfat, amonyum nitrat) azot kaynaklarından % 0,5 oranında eklenmiştir (çizelge 3.9). En iyi enzim üretimini sağlayan azot kaynağı belirlendikten sonra en

iyi enzim üretiminin sağlandığı konsantrasyonu saptamak için azot kaynağı % 0,5; 1 ve 1,5 oranlarında besi ortamına eklenmiştir.

HBB 134 suşunun stok kültüründen LB broth içeren tüpe inoküle edilerek bir gece inkübe edilmiştir. Gecelik kültürün absorbansı 600 nm’de 0,1 olacak şekilde ayarlanmış ve 50 mL besi ortamı içeren 250 mL’lik erlenlere % 1 oranında inoküle edilmiştir. Kültürler 65°C’deki inkübatörde 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin pNPL ile spektrofotometrik olarak hücre içi lipaz aktiviteleri tayin edilmiş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Çizelge 3.9 Enzim üretimi üzerine azot kaynaklarının etkisi incelenirken kullanılan besi ortamı

Kimyasal madde	Miktarı
Zeytin yağı	% 0,5
Azot kaynağı	% 0,5
NaCl	% 1
Arabic gum	% 0,5
pH 7,00	
121 °C’ de 15 dakika sterilizasyon	

En iyi enzim üretiminin sağlandığı karbon ve azot kaynağı ve oranları belirlenmiş ve artık “**enzim üretim ortamı**” olarak adlandırılmıştır.

3.2.5.3. Lipaz üretimi üzerine başlangıç pH’ ının etkisi

Enzim üretimi üzerine pH’nın etkisini belirlemek için “enzim üretim ortamı”nın pH’ı 0,5 birimlik aralıklarla 5,50’den 8,50’e kadar ayarlanmıştır (çizelge 3.10). HBB 134 suşunun stok kültüründen LB broth içeren tüpe inoküle edilerek bir gece inkübe edilmiştir. Gecelik kültürün absorbansı 600 nm’de 0,1 olacak şekilde ayarlanmış ve 50 mL enzim üretim ortamı içeren 250 mL’lik erlenlere % 1 oranında inoküle edilmiştir. Kültürler 65 °C’de, 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin pNPL ile spektrofotometrik olarak hücre içi aktiviteleri tayin edilmiş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Çizelge 3.10 Enzim üretimi üzerine başlangıç pH'ının etkisi

Kimyasal madde	Miktarı
Zeytin yağı	% 0,5
Pepton	% 0,5
NaCl	% 1
Arabic gum	% 0,5
pH 5,50-8,50	
121 °C' de 15 dakika sterilizasyon	

3.2.5.4. Lipaz üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

Enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için “enzim üretim ortamı”nın pH'ı 30-80 °C arasındaki sıcaklıklarda 6,50'e ayarlanmıştır (çizelge 3.11). HBB 134 suşunun stok kültüründen LB broth içeren tüpe inoküle edilerek bir gece inkübe edilmiştir. Gecelik kültürün absorbansı 600 nm'de 0,1 olacak şekilde ayarlanmış ve 50 mL enzim üretim ortamı içeren 250 mL'lik erlenlere % 1 oranında inoküle edilmiştir. Kültürler farklı sıcaklıklarda, 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda kültürlerin pNPL ile spektrofotometrik olarak hücre içi aktiviteleri tayin edilmiş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Çizelge 3.11 Enzim üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

Kimyasal madde	Miktarı
Zeytin yağı	% 0,5
Pepton	% 0,5
NaCl	% 1
Arabic gum	% 0,5
pH 6,50	
121 °C' de 15 dakika sterilizasyon	

3.2.5.5. Lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi ve lipazın lokalizasyonu

Enzim üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi amacıyla HBB 134 suşu belirlenen optimum koşullarda (“enzim üretim ortamında” pH 6,5 ve 45 °C) 24 saat geliştirilmiş ve bu süre boyunca kültürden 3 saatte bir örnek alınmıştır.

Alınan örneklerin pH'ı pH-metre (Loviband pH200, Germany) kullanılarak ölçülmüş ve kuru ağırlığı tayin edilmiştir. Geriye kalan örnek 20.000 x g'de +4 °C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Sigma-3K30, Germany). Süpernatant (S1) hücre dışı fraksiyon olarak ayrılmış, pellet (P1) ise ultra saf su ile iki kez yıkanmış ve en son aynı hacimde 20 mM Tris-HCl (+ 4 °C, pH 8,00) tamponunda çözülmüştür. P1'in bir kısmı aktivite tayini için ayrılmış, geri kalanı sonikatör (BANDELIN SONOPULS-HD2200, Germany) yardımıyla buzlu ortamda % 40 güçte, 4 siklusta 10 dakika sonike edilerek 20.000 x g'de +4 °C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant (S2) hücre içi fraksiyon olarak ayrılmıştır. Pellet (P2) iki kez ultra saf suda yıkanmış ve aynı hacimde tamponda çözülerek membrana bağlı aktivite tayini için ayrılmıştır.

3.2.6. *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 Lipazının Saflaştırılması

Optimum koşullarda enzim üretimi yapıldıktan sonra enzimin saflaştırma işlemlerine geçilmiştir. Enzimin hücre içi olması nedeniyle öncelikle kültür ortamı 20.000 x g de 4 °C'de 20 dk santrifüjlenerek hücreler besi ortamından ayrılmıştır. Hücreler ultra saf suda 2 kez yıkanarak en son aynı hacimde 0,1 mM EDTA ve 0,5 mM 1,4-dithiothreitol içeren 20 mM Tris-HCl (+4 °C, pH 8,00) tamponunda çözülmüş ve sonikatör ile buzlu ortamda % 40 güçte, 4 siklusta 10 dk sonike edilerek parçalanmıştır. Karışım 20.000 x g de 4 °C'de 20 dk santrifüjlenerek parçalanmış hücre artıkları uzaklaştırılmış ve süpernatant hücre içi enzim kaynağı olarak saflaştırma işlemleri için kullanılmıştır. Saflaştırmada ilk adım olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış, daha sonra ise diyaliz yapılarak kolon kromatografisi adımlarına geçilmiştir.

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonlarda aktivite ve protein tayinleri standart koşullarda yapılmıştır. Ham ekstraktın saflaştırma katsayısı 1 kabul edilmiş ve diğer fraksiyonların spesifik aktiviteleri ham ekstraktın spesifik aktivitesine oranlanarak saflaştırma katsayıları hesaplanmıştır. Fraksiyonların % verimlerini belirlemek için ham ekstraktın verimi 100 olarak kabul edilmiş ve fraksiyonların total aktivitesi ham ekstraktın total aktivitesine oranlanarak % verimleri hesaplanmıştır.

3.2.6.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Nötral tuzların ilavesiyle presipitasyon proteinlerin fraksiyonlanarak çöktürmelerinde en çok kullanılan yöntemdir. Bu şekilde çöktürülen protein genellikle denatürasyona uğramadığından aktivite pelletin geri çözülmesi ile geri kazanılır (Erarslan, 2001).

Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde, proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır, bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çökerler. Bu olaya “salting out” denir. Çöktürme işleminde birçok avantajı nedeniyle en fazla kullanılan tuz amonyum sülfattır ((NH₄)₂SO₄). Amonyum sülfat proteinlerin denatürasyon, proteolizis ve bakteriyel kontaminasyona karşı kararlılığını korur. Ayrıca, amonyum sülfatın çözünürlüğü sıcaklıkla çok az değişir (0-30 °C) ve büyük miktarlarda ucuz bir şekilde saf olarak elde edilebilir (Metin, 2007).

Kültür ortamından elde edilen hücre içi enzim fraksiyonu “ham ekstrakt” olarak adlandırılmış ve amonyum sülfat çöktürme denemeleri için kullanılmıştır. Ham ekstrakta öncelikle 0 °C’de % 20 doygunlukta amonyum sülfat eklenmiş ve + 4 °C’de 30 dakika manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş karıştırılarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda çözelti 10.000 x g de 30 dakika santrifüjlenmiş ve pellet (P1) 20 mM Tris-HCl (+4 °C, pH 8,00) tamponunda çözülerek aktivite ve protein tayini için ayrılmıştır. Süpernatanta 0 °C’de % 40 doygunlukta amonyum sülfat yavaş yavaş karıştırılarak eklenmiş ve yukarıdaki işlemler tekrarlanarak elde edilen pellet (P2) Tris-HCl (+4 °C, pH 8,00) tamponunda çözülerek aktivite ve protein tayini için ayrılmıştır. Daha sonra sırasıyla % 60 (P3) ve 70 (P4) doygunlukta amonyum sülfat çöktürme işlemleri yapılarak her fraksiyonda ve % 70 amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen süpernatantta (S4) aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Bütün fraksiyonlar için saflaştırma katsayısı ve % verim hesaplanmıştır.

3.2.6.2. Diyaliz

Enzim için uygun olan amonyum sülfat çöktürme yüzdesi belirlendikten sonra enzim artık o yüzdelik oranda çöktürülmüş ve elde edilen pellet uygun hacimde proteaz inhibitörü olarak EDTA ve 1,4-dithiothreitol içeren 20 mM Tris-HCl (+4 °C, pH 8,00) tamponunda geri çözülmüştür. Daha sonra yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) uygun uzunlukta kesilmiş ve tek tip gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantları gidermek için ön işlemde geçirilmiştir (çizelge 3.12). Diyaliz torbasına örnek aktarılmış ve her iki ucu bağlanmıştır. Daha sonra aynı tampona karşı bir gece diyaliz edilmiştir. Diyalizat bir sonraki saflaştırma adımında kullanılmak üzere ayrılmıştır.

Çizelge 3.12 Diyaliz torbasının ön işlemde geçirilmesi

1	% 0,3' lük sodyum sülfat çözeltisinde 80 °C' de 1 dakika bekletilir.
2	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.
3	% 0,2' lik sülfürik asitte 1 dakika bekletilir.
4	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.

3.2.6.3. Hidrofobik etkileşim kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi protein moleküllerinin hidrofobik grupları ile durgun faz arasındaki hidrofobik etkileşime dayanır. Durgun faz hidrofilik bir polimere (dekstran veya agaroz) bağlı küçük non-polar grupları (butil, oktil veya fenil) içermektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ilgili proteinin bulunduğu fraksiyon yüksek tuz derişimi içeren tampon içerisinde (genellikle amonyum sülfat) kolona yüklenir. Bağlı proteinlerin kolondan uzaklaştırılması ise tampondaki tuz derişimi azaltılarak yapılır. Yani negatif tuz gradienti oluşturularak yıkama yapılır. Bu yöntem özellikle amonyum sülfat gibi tuzlarla yapılan çöktürmeden sonra proteinlerin daha ileri saflaştırılması için idealdir (Metin, 2007).

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak fenil sefroz CL4B ve kolon olarak 16 mL yatak hacmine sahip 1x20 cm'lik kolon (Sigma)

kullanılmıştır. Kolondan çıkan fraksiyonlar 5mL'lik hacimlerde toplanmış ve akış hızı 60 mL/saat olarak ayarlanmıştır. Kolon önce 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8,00, 4°C) tamponu ile dengeye getirilmiştir. Kolona uygulanacak diyalizata da aynı konsantrasyonda $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenmiştir. Örnek kolona yüklendikten sonra, önce 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8,00, 4°C) tamponu ile yıkanarak kolona bağlanmayan proteinlerin çıkması sağlanmıştır. Bu işleme 280 nm'de absorbans düşene kadar devam edilmiştir. Daha sonra kolona 0,2 M-0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradienti uygulanmış ve gradientin bitiminin hemen ardından 280 nm'de absorbans düşene kadar tamponla yıkamaya devam edilmiştir. Son olarak kolon % 30 propanol içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8,00, 4°C) tamponu ile yıkanmıştır. Propanol yıkaması ile elde edilen fraksiyonlar içinden aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirilmiş ve 20 mM Tris-HCl (pH 8,00, 4°C) tamponuna karşı 20-24 saat diyaliz edilmiştir. Diyalizat 10.000 MWCO ultrafiltrasyon membranı (Sartorius) ile konsantre edilmiştir. Konsantre edilen örnekte aktivite ve protein tayini yapılmış ve bir sonraki adım olan jel filtrasyon kolonuna uygulanmıştır.

3.2.6.4. Jel filtrasyon kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi farklı molekül büyüklüğündeki proteinlerin ayrımını sağlayan bir kromatografi şeklidir. Kolon dolgu maddesi olarak ticari olarak üretilen küresel yapılı ve belirli boyutta gözeneklere sahip inert jeller kullanılmaktadır. Örnek kolona yüklendikten sonra belirli bir akış hızında tamponla yıkama yapılır. Farklı boyutta molekülleri içeren çözeltilerde, büyük olan moleküller gözeneklerden ve küresel jeller arası boşluklardan geçerek, kolonda hızla ilerler ve kolonu öncelikle terk ederler. Moleküller küçüldükçe kolonda alıkonma süreleri uzar yani moleküller kolondan azalan büyüklük sırasına göre çıkarak, protein karışımlarının birbirinden ayrılması sağlanır.

Bu uygulamada kolon dolgu maddesi olarak Sefadex G-100 (medium) ve kolon olarak 100 mL yatak hacmine sahip 1x100 cm'lik cam kolon kullanılmıştır. Kolondan çıkan fraksiyonlar 5mL'lik hacimlerde toplanmış ve akış hızı 13 mL/saat olarak ayarlanmıştır. Kolon 0,15 M NaCl içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8,00, 4°C) tamponu ile dengeye getirilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinden elde

edilerek konsantre edilen diyalizata da 0,15 M NaCl eklenmiş ve kolona uygulanmıştır. Örnek kolona uygulandıktan sonra kolon 0,15 M NaCl içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8,00, 4°C) tamponu ile yıkanarak fraksiyonlar toplanmıştır. Bütün fraksiyonların 280 nm’ de absorbanları ölçülmüş ve aktiviteleri tayin edilmiştir.

3.2.6.5. SDS-PAGE ve PAGE yöntemi ile enzimin molekül ağırlığı tayini ve zimogram

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonlar toplanarak enzimin saflığının ve moleküler ağırlığının saptanması için Laemmli yöntemine (1970) göre PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) ve SDS–PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Standart olarak miyozin (205.000 Da), β-galaktozidaz (116.000 Da), fosforilaz B (97.400 Da), sığır albumini (66.000 Da), yumurta albumini (45.000 Da) ve karbonik anhidraz (29.000 Da) kullanılmıştır. Lipazın görüntülenmesi için PAGE ve SDS–PAGE kullanılarak zimogram yapılmıştır. SDS-PAGE, PAGE ve zimogram aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Çözeltiler

% 30’luk akrilamid / N,N’- metilenbisakrilamid stok çözeltisi: 30 g akrilamid ve 0.8 g N,N’- metilenbisakrilamid 100 mL ultra saf suda çözülmüştür. Hazırlanan çözelti koyu renkli şişede ve + 4 °C’de saklanmıştır.

Ayırma tamponu (separating tamponu): 1,875 M Tris-baz hazırlandıktan sonra, konsantre HCl kullanılarak pH’sı 8.8’e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Yoğunlaştırma tamponu (Stacking tamponu): 0,6 M Tris-baz hazırlandıktan sonra konsantre HCl kullanılarak pH’sı 6.8’e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Amonyum persülfat: % 10’luk amonyum persülfat ultra saf su içerisinde taze olarak hazırlanmıştır.

Sodyum dodesil sülfat (SDS): % 10'luk SDS ultra saf su içerisinde yavaş yavaş karıştırılarak hazırlanmıştır.

Örnek tamponu: 0,6 M Tris-baz (pH 6.8) 5 mL, SDS 0,5 g, sukroz 5 g, β -merkaptetanolden 0,25 mL ve % 0,5'lik stok brom fenol mavisi çözeltisinden 5 mL alınarak karıştırılmış ve hacmi ultra saf su ile 50 mL' ye tamamlanmıştır. PAGE için hazırlanan yükleme tamponunda SDS ve β -merkaptetanol kullanılmamıştır. Örnek tamponu kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklanmıştır. β -merkaptetanol'ün etkisi zamanla kaybolduğundan gerektiği zaman hazırlanan tampona aynı oranda ilave edilmiştir.

Elektroforez tamponu (Yürütme tamponu): 12 g Tris-baz ve 57,6 g glisin ve 2 g SDS karıştırılarak hacmi ultra saf su ile 2L'ye tamamlanmıştır. Bu tampon için pH ayarlaması gerekmemektedir. PAGE için hazırlanan elektrot tamponunda SDS kullanılmamıştır. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklanmıştır. Tampon 2-3 kez kullanıldıktan sonra yenilenmiştir.

Coomassie Blue G-250 Çözeltisi: 0,10 g Coomassie blue % 50 metanol ve % 10 asetik asit kullanılmıştır. Boya önce metanol ve su karışımında çözülmüş daha sonra asetik asit eklenmiştir.

Yıkama Çözeltisi: % 10 metanol ve % 7 asetik asit çözeltisinden oluşmaktadır.

Yöntem

Jelin hazırlanışı: Protein kontaminasyonunu ve her türlü kirliliği önlemek için bütün işlemler eldiven giyilerek yapılmıştır. Elektroforez camları % 70'lik etanolle iyice temizlendikten sonra jelin sızmasını önlemek için standına yerleştirilmiştir. Cam levhalar arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, hava kabarcığı kalmayacak şekilde degaze edilmiş % 10'luk ayırma jeli TEMED ve amonyum persülfat ilave edildikten sonra karıştırılmıştır. Hazırlanan jeller mini elektroforez (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, U.S) camları arasına dökülmüştür. Ayırma jelinin içeriği çizelge 3.13'de verilmiştir.

Jelin havayla temasını kesmek için, üzeri % 70'lik etanolle kapatılmış ve jelin polimerleşmesi için 30-40 dakika beklenmiştir. Süre sonunda ayırma jelinin üzerindeki alkol kurutma kâğıdı ile jele temas etmeden yavaş yavaş alınmış ve üzerine % 4'lük yoğunlaştırma jeli dökülmüştür. Tarak, jelle arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jele yerleştirilmiş ve polimerleşmesi için 1-2 saat beklenmiştir. Yoğunlaştırma jelinin içeriği çizelge 3.14'de verilmiştir.

Çizelge 3.13 % 10' luk ayırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme	Miktar (mL)
Distile su	2.26
Ayırma tamponu (pH 8.8)	1
% 30'luk akrilamid/bis acrilamid	1,66
% 10' luk SDS (SDS-PAGE için)	0,05
% 10'luk amonyum persülfat	0,025
TEMED	0,00175

Çizelge 3.14 % 4' lük yoğunlaştırma jelinin içeriği

Kullanılan malzeme	Miktar (mL)
Distile su	1,875
Yoğunlaştırma tamponu (pH 8.8)	0,25
% 30'luk akrilamid/bis acrilamid	0.3375
% 10' luk SDS (SDS-PAGE için)	0,025
% 10'luk amonyum persülfat	0.0125
TEMED	0.0035

Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı: Jele uygulanacak örnekler ve standart, örnek tamponuyla uygun seyreltmeleri yapıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatılmıştır (PAGE ve zimogram için örnekler kaynatılmamıştır). Tarak jele zarar vermeden çekilmiş ve jel elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen jel uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kuyucuklar elektroforez tamponu ile doldurulmuş ve uygun seyreltmeleri yapılan örneklerden 15 µL yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirilmiş ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde elektroforez tamponu eklenmiştir. Güç kaynağı (UVP,

Germany) ile üst jele 100 V, alt jele 200 V elektrik akımı verilerek proteinlerin ayırma işlemi yapılmıştır.

Jelin boyanması: Cam plaklar arasından çıkarılan jelden üst jel ayrılmıştır. Boyanın aldığı yol elektronik kumpasla ölçüldükten sonra, ayırma jeli zimogram ve protein boyaması yapılmak üzere ikiye ayrılmıştır. Protein boyaması Commasie Brilliant mavisi ile 1 saat 100 rpm'de çalkalanarak boyanmıştır. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak uzaklaştırılmış ve bantlar görünür hale gelmiştir.

Zimogram: Lipazın zimogramı için tribütirin içeren agar plaklar kullanılmıştır. Bu amaçla cam plaklar arasından çıkarılarak ayrılan jel ikiye bölünmüş ve bir yarısı zimogram diğer yarısı da protein boyaması için kullanılmıştır. Bunun için % 1 tribütirin, 20 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ ve % 0,5 gum arabicden oluşan çözelti homojenizatörde (IKA T25B, Germany) 3 dakika emülsifiye edilmiş ve daha sonra üzerine % 1,5 oranında agar eklenerek karışım kaynatılmıştır. Zimogram için ayrılan jel petri kabına yerleştirilmiş ve üzerine hazırlanan tribütirin agar ~50 °C'ye soğutulduktan sonra dökülmüştür. Agar katılaştıktan sonra petri 50 °C'deki etüvde şeffaf bant oluşana kadar inkübe edilmiştir (Oh *et al.*, 1999).

Lipazın molekül ağırlığının belirlenmesi: Elektroforez sonucunda PAGE ve SDS-PAGE sonuçları karşılaştırılarak lipaz bantı belirlenmiştir. SDS-PAGE jeline boyanın, standartların ve enzimin kat ettikleri mesafeler elektronik kumpas (Mitutoyo, CD-15CP, U.K.) yardımı ile ölçülmüştür. Standartların ve enzimin R_f değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$R_f = \frac{\text{örneğin aldığı yol}}{\text{boyanın aldığı yol}}$$

Daha sonra standartların molekül ağırlıklarının logaritması alınmış ve R_f değerlerine karşı grafik çizilmiştir. Elde edilen standart grafiğin denkleminde yararlanılarak enzimin molekül ağırlığı saptanmıştır.

3.2.7. *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 Lipazının Karakterizasyonu

3.2.7.1. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH' nın etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için pH-Stat yöntemi kullanılmıştır. Substrat olarak kullanılan triolein % 1 gum arabic ve 0,1 M NaCl içeren ultra saf suda 1 mM konsantrasyonda hazırlanmış ve 5 dakika boyunca homojenize edilerek emülsifiye edilmiştir. Hazırlanan bu substrat çözeltisinden 15 mL alınarak pH-Stat'ın (Radiometer, France) 65 °C'ye ayarlanan sıcaklık kontrollü kabına aktarılmış ve substrat çözeltisinin pH'ı denenecek pH'a ayarlanmıştır. pH-Stat'ın da pH'ı aynı değere ayarlandıktan sonra 10 µL enzimin eklenmesiyle reaksiyon başlatılmış ve 1 dakika boyunca 0,01 N NaOH ile titrasyonu sonucu elde edilen grafiğin eğiminden oluşan yağ asiti miktarı tayin edilmiştir.

Bir ünite lipaz aktivitesi, reaksiyon koşulları altında 1 dakikada trioleinden 1µmol yağ asidi oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak belirtilmiştir.

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için, pH 6,00-7,00 arası McIlvaine (sitrik asit-Na₂HPO₄) tamponu, pH 8,00'de Tris-HCl tamponu, pH 9,00-10,00 arası Glisin-NaOH tamponu ve pH 11,00'de fosfat (Na₂HPO₄-NaOH) tamponu kullanılmıştır. Enzim çözeltisi bu tamponlarla 5 kat seyreltilmiş ve 25°C'deki su banyosunda (Poly science 911, USA) 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca belirli aralıklarla örnekler alınmış ve optimum koşullarda spektrofotometrik olarak aktiviteleri tayin edilmiştir. Her deney serisinin 0. saatteki enzim aktiviteleri 100 olarak kabul edilmiş ve geri kalan aktiviteleri % değer olarak belirtilmiştir.

3.2.7.2. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 5-95°C arasındaki sıcaklıklarda pH 8,00 olarak hazırlanan Tris-HCl tamponları kullanılmıştır. Enzim aktivitesi sadece sıcaklık parametresi değiştirilerek standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için enzim çözeltisi stabilitenin belirleneceği sıcaklıklar olan 25 °C, 40 °C, 50 °C, 65 °C, 80 °C ve 95 °C’ de hazırlanan pH 9,00, 50 mM Glisin-NaOH tamponu ile 5 kat seyreltilmiştir. Enzim çözeltisi bu sıcaklıklardaki su banyosunda (LAUDA AQUA Line AL12, Germany) 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyon boyunca belirli aralıklarda örnekler alınarak optimum koşullarda spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.7.3. Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini incelemek için enzim optimum pH (pH 9,00) ve sıcaklıkta (50 °C) sabit substrat konsantrasyonunda (final konsantrasyon 1 mM) farklı sürelerde inkübe edilerek spektrofotometrik olarak aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.7.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi optimum sıcaklık ve pH’ da (50 °C ve pH 9,00) sabit inkübasyon süresinde (30 dk) farklı konsantrasyonlarda (5-120 µM) substrat (pNPL) kullanılarak enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir. Enzimin Km ve Vmax değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır.

3.2.7.5. Enzimin sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi

Enzimin sıcaklık stabilitesini artırmak amacıyla çeşitli polihidrik alkollerin (etilen glikol, gliserol, sorbitol, mannitol) etkisi incelenmiştir. Polihidrik alkoller 65 °C’de pH’ı 9,00 olarak ayarlanmış glisin-NaOH tamponu içerisinde 1M, 2M ve 3M konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmışlardır. Daha önceden konsantre edilen enzim bu çözeltilerle 5 kat seyreltilmiş ve 65 °C’deki su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. Hiçbir katkı içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri standart deney koşullarında tayin edilmiştir. Her bir tüpün 0. saatteki enzim aktiviteleri 100 olarak kabul edilmiş ve 1 saat sonunda geri kalan aktiviteleri % değer olarak belirlenmiştir.

3.2.7.6. Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisini belirlemek için etanol, metanol, isopropanol, hekzan, siklohekzan, asetonitril, bütanol, dietileter, ksilol, aseton, etilasetat, dimetilsülfoksit (DMSO), 1,4-dioksan, benzen, toluen ve kloroform kullanılmıştır. Organik çözücüler enzimle final konsantrasyonları % 10 ve % 50 olacak şekilde karıştırılmış ve 50 °C'deki inkübatörde 200 rpm hızda çalkalamalı olarak 1 saat inkübe edilmiştir. Hiçbir organik çözücü içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 100 µL karışımın üzerine 800 µL 50 mM glisin-NaOH, (pH 9,00, 50 °C) tamponu ve 100 µL substrat eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon karışımı 50 °C'deki inkübatörde 200 rpm hızda çalkalamalı olarak 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 0,1 M 250 µL Na₂CO₃ eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve tüpler 10.000 x g de 15 dakika santrifüjlenerek 410 nm'de köre karşı absorbansları okunmuştur. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir.

3.2.7.7. Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi

İnhibe edici ajanlar ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin inhibitörü olan fenil metil sülfonil florür (PMSF); SH-grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan β-merkaptetanol; SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan 1,4- dithiothreitol (DTT); triptofan inhibitörü olan N-bromo suksinamid (NBS); bir asetilkolin esterase inhibitörü olan eserin, karboksil grubu inhibitörü olan Sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC) ve protein denatürantları olan üre ve SDS kullanılmıştır. β-merkaptetanol, 1,4-dithiothreitol, NBS, eserin, CMC, üre ve SDS ultra saf suda, PMSF ise n-propanolde hazırlanmıştır.

Yukarıda adı geçen inhibitörler ve denatürantlar final konsantrasyonları 1mM ve 5mM olacak şekilde deney ortamına eklenmiş ve 50 °C'deki su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. Hiçbir inhibitör veya denatürant içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonunda deney karışımlarına substrat eklenerek reaksiyon başlatılmış ve standart koşullarda aktiviteleri tayin edilmiştir. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir.

3.2.7.8. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için LiCl, NaCl, KCl, NH₄Cl, MgCl₂, Na₂O₃Se, CaCl₂, BaCl₂, MnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, AlCl₃, HgCl₂, FeCl₃, PbCl₂ ve EDTA kullanılmıştır. Enzim 1 mM, 5 mM ve 10 mM final konsantrasyonlarda metal iyonları ve EDTA içeren deney ortamlarında 50 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. Hiçbir metal içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda standart koşullarda aktivite tayini yapılmıştır. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir.

3.2.7.9. Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine deterjanların ve beyazlatıcıların etkisi

Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine deterjanların ve beyazlatıcıların etkisini belirlemek amacıyla iyonik deterjan olarak sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat ve sodyum dodesil sülfat, non-iyonik deterjan olarak n-oktil-β-D-glukopiranozit, triton X-100, tween 20, tween 80 ve brij 35, zwitteriyonik deterjan olarak CHAPS ve beyazlatıcı olarak hidrojen peroksit ve sodyum hipoklorit kullanılmıştır. Bunlara ek olarak ticari olarak satılan OMO, ARIEL ve PERSİL marka deterjanların etkisi de incelenmiştir. Deterjanların ve beyazlatıcıların 50 mM glisin-NaOH (pH 9,00; 50°C) tamponunda % 10' luk stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Enzim aktivitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek için her birinden final konsantrasyonları % 0,1 olacak şekilde deney ortamına eklenmiş ve standart koşullarda aktiviteleri tayin edilmiştir. Hiçbir deterjan içermeyen deney ortamı

kontrol olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir.

Enzim stabilitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek için enzim çözeltisi % 0,1 ve % 1 oranında deterjan içeren tamponla 5 kat seyreltilmiştir. Kontrol olarak kullanılacak deterjansız enzim de tamponla 5 kat seyreltilmiştir. Deney ortamları 50 °C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda standart koşullarda aktivite tayini yapılmıştır. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir.

3.2.7.10. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi

Enzimin gerçek substratlara karşı spesifitesini belirlemek amacıyla triaçilgliseroller 1 mM, yağlar ise % 1 oranında kullanılmıştır. Kullanılan bütün substratlar enzimle muamele edilmeden önce % 1 gum arabic ve 0,1 M NaCl içeren distile suda homojenizatör ile 5 dakika emülsifiye edilmiştir. Enzim aktivitesi pH-Stat yöntemi ile tayin edilmiştir. Hazırlanan substrat çözeltilerinden 15 mL alınarak pH-Stat'ın sıcaklık kontrollü kabına aktarılarak sıcaklık 50 °C'ye ve pH 9,00'a ayarlanmıştır. pH-Stat'ın da pH değeri 9,00'a ayarlandıktan sonra 10 µL enzimin eklenmesiyle reaksiyon başlatılmış ve 1 dakika boyunca oluşan yağ asidi miktarından enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

Enzimin yapay substratlara karşı spesifitesini belirlemek için kullanılan substratların (p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil kaprilat, p-nitrofenil kaprat, p-nitrofenil laurat, p-nitrofenil palmitat) etanolde 10 mM'lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi 50 °C'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Final substrat konsantrasyonu standart deneyden farklı olarak 1 mM yerine 0,2 mM ve pH ise 9,00 yerine 7,00 olarak kullanılmıştır. Standart lipaz aktivite tayininden farklı olarak substrat konsantrasyonu ve pH'daki bu değişikliğin nedeni p-nitrofenil bütirat ve p-nitrofenil kaprilatın yüksek pH'da kendiliğinden hidroliz olarak sararması nedeniyle sağlıklı bir aktivite ölçümü yapılamamasından dolayıdır. Kullanılan substratlardan p-nitrofenil palmitat dışındakilerde aktivite tayini için 50

mM'lık pH 7,00 Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. p-Nitrofenil palmitat (pNPP) için ise bu tampona % 0,4 Triton X-100 ve % 0,1 Gum arabic eklenmiştir. Stok pNPP çözeltisi final konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde bu tampona eklenmiş ve 5 dakika sonike edilmiştir.

Enzim çözeltisi yukarıda belirtilen substratları içeren tampon çözeltiler ile 50 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler -20 °C'de 10 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuş ve daha sonra 10.000 x g de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Örneklerin 410 nm'de enzimsiz körlerine karşı absorbanları okunmuştur. Reaksiyon durdurma işleminin standart Na₂CO₃ eklemek yerine -20 °C'de bekletilerek yapılmasının nedeni pNPP'ın Na₂CO₃ ile bozularak kendiliğinden sararmasıdır.

3.2.7.11. Enzimin pozisyon spesifitesinin belirlenmesi

Lipazın pozisyon spesifitesini belirlemek için, Lesuisse (1993) tarafından bildirilen yöntem kısmen modifiye edilerek kullanılmıştır. Gliseril trioleat, 1 mM CaCl₂ içeren 0,1 M Glisin-NaOH (pH 9,00, 50 °C) tamponuna % 2 oranında eklenmiş ve karışım homojenizatörde 3 dakika emülsifiye edilmiştir. Bu karışımdan 3 ayrı tüpe 1'er mL aktarılmıştır. Tüplerden biri kontrol grubu olarak ayrılmış, diğer ikisinin üzerine 100'er µL konsantre enzim çözeltisi eklenerek 50 °C'deki inkübatörde 200 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Tüplerden biri 1 saat diğeri 6 saat sonra alınmış ve kontrol tüpüyle birlikte üzerlerine 5'er mL dietil eter eklenerek iyi bir şekilde karıştırılmış ve üstte kalan eter fazı ayrı bir tüpte toplanmıştır. Bu şekilde elde edilen ekstraktlar ince tabaka kromatografisinde (TLC) görüntüleninceye kadar - 20 °C'de saklanmışlardır.

İnce tabaka kromatografisinde (TLC) silica gel-60 (Fluka) plakları kullanılmıştır. Standart olarak gliseril trioleat, oleik asit, 1,3-diolein, 1,2-dioleoil gliserol ve 1 oleoil gliserol kullanılmıştır. Standartların eterde % 2'lik çözeltileri hazırlanmıştır. TLC plağının alt kısmından 0,5 cm'lik bir boşluk olacak şekilde çizgi çizilmiştir. Daha sonra standartlar ve yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan ekstraktlar, aralarında 2 cm boşluk olacak şekilde çizgilerin üzerinden mikropipet yardımıyla 10'ar µL

uygulanmıştır. TLC’de hareketli faz olarak kloroform:aseton:asetik asit (96:4:1) karışımı kullanılmıştır. Hareketli faz plağın üzerinden ~ 0,5 cm’ye gelene kadar örneklerin yürümesi sağlanmıştır. Daha sonra TLC plağı doygun iyot buharı ile muamele edilerek standartların ve hidroliz ürünlerinin görüntülenmesi sağlanmıştır.

3.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Her deney üç tekrar üzerinden yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkın ve bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (Duncan Testi) yapılmıştır (STATISTICA 7.0). Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde eşlenmiş örneklerde t-testi uygulanmıştır (STATISTICA 7.0).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. LİPOLİTİK AKTİVİTEYE SAHİP İZOLATLARIN SEÇİMİ

4.1.1. Lipolitik Aktiviteye Sahip İzolatların Kalitatif Olarak Seçimi

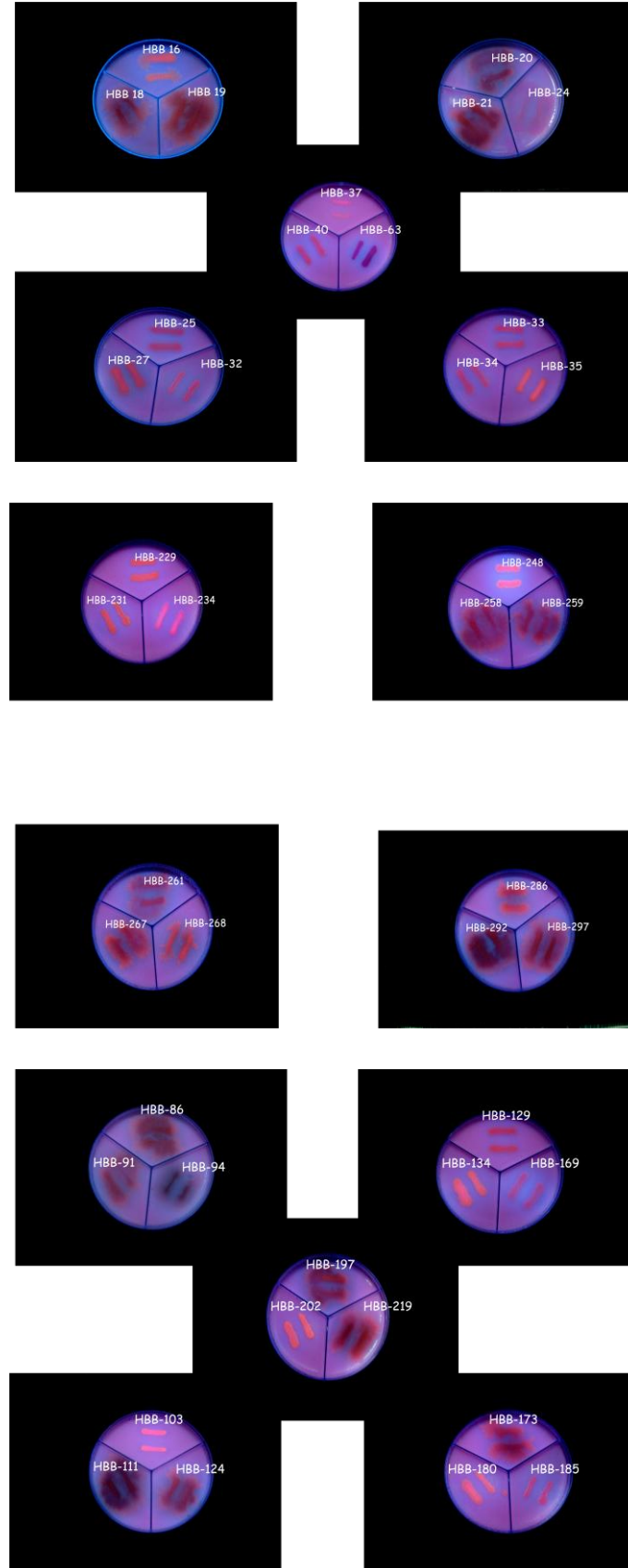
ADÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Stokları'na kayıtlı bulunan çeşitli doğal kaynaklardan izole edilmiş 201 adet termofilik bakteri lipolitik aktiviteleri açısından taranmış, pozitif olanlar çizelge 4.1 de sunulmuştur. Bu amaçla öncelikle Tween 80 içeren agar plakları kullanılmıştır. Bu yöntemle göre lipolitik aktiviteye sahip bakteriler Tween 80'i substrat olarak kullandığında açığa çıkan oleik asit ortamdaki Ca^{+2} ile birleşip çökelerek besiyerindeki kolonilerin çevresinde opak bir zon oluşturmaktadır. Bu prensibe dayanarak değerlendirilen 201 bakteriden 43 tanesinin lipolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Pozitif sonuç veren bu 43 izolat bir sonraki aşamada lipaz aktiviteleri açısından taranmıştır. Bu amaçla Rhodamin-B ve zeytinyağı içeren agar plakları kullanılmıştır. Lipaz aktivitesine sahip koloniler zeytinyağını substrat olarak kullanmış ve açığa çıkan yağ asitleri katyonik Rhodamin-B ile floresan turuncu renkli kompleksler oluşturmuşlardır. Denenen 43 bakteri izolatından 22 tanesi lipaz aktivitesi açısından pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.1).

4.1.2. Lipolitik Aktiviteye Sahip İzolatların Kantitatif Olarak Seçimi

En iyi lipaz üreten izolatu seçmek için Rhodamin-B plaklarında pozitif sonuç veren 22 bakteri izolatu 20 mL LB broth içeren 100 mL'lik erlenlerde 65°C'de 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür ortamlarının 600 nm'de absorbanları ölçülmüş ve lipaz aktivitesi ayrıntıları "Materyal ve Yöntem" de belirtilen yöntemle kantitatif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). HBB 134, 19,925 U/mL ile en iyi aktivite gösteren izolat olarak seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalara bu izolatla devam edilmiştir.

Çizelge 4.1 Lipolitik aktiviteye sahip izolatların lipolitik aktivite tarama sonuçları

İzolat No	Tween 80	Rhodamin B
HBB-16	+	+
HBB-18	+	-
HBB-19	+	-
HBB-20	+	-
HBB-21	+	-
HBB-24	+	-
HBB-25	+	+
HBB-27	+	+
HBB-32	+	+
HBB-33	+	+
HBB-34	+	+
HBB-35	+	+
HBB-37	+	+
HBB-40	+	+
HBB-63	+	-
HBB-86	+	-
HBB-91	+	-
HBB-94	+	-
HBB-103	+	+
HBB-111	+	-
HBB-124	+	-
HBB-129	+	+
HBB-134	+	+
HBB-169	+	-
HBB-173	+	-
HBB-180	+	+
HBB-185	+	+
HBB-197	+	-
HBB-202	+	+
HBB-205	+	+
HBB-219	+	-
HBB-229	+	+
HBB-231	+	+
HBB-234	+	+
HBB-248	+	+
HBB-258	+	-
HBB-259	+	-
HBB-261	+	-
HBB-267	+	-
HBB-268	+	+
HBB-286	+	+
HBB-292	+	-
HBB-297	+	-



Şekil 4.1 Rhodamin B plaklarında kalitatif lipolitik aktivite tarama sonuçları

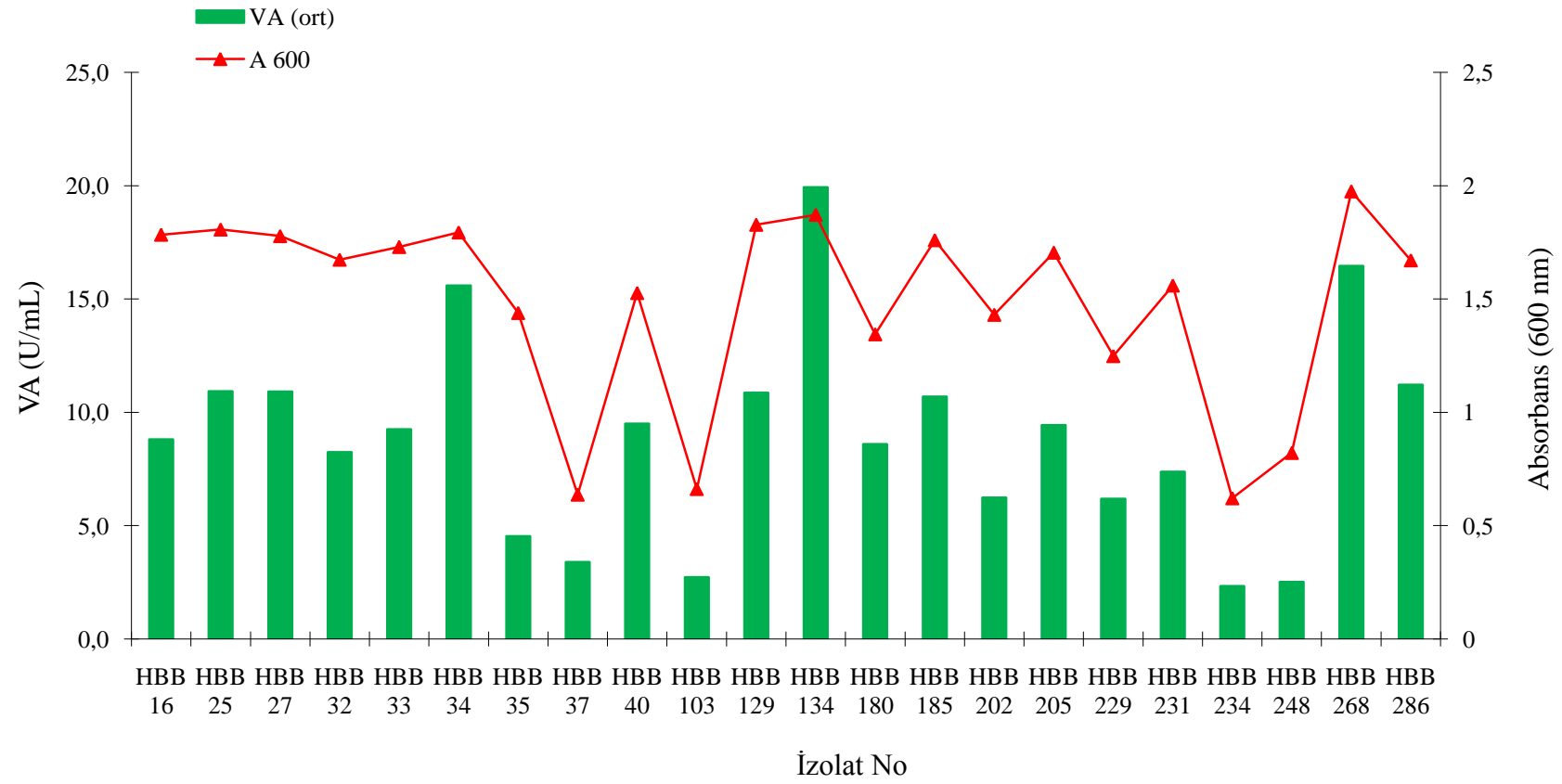
Çizelge 4.2 Kantitatif lipolitik akivite tayini ile en iyi lipolitik aktiviteye sahip izolatın seçimi

İzolat No	Absorbans (600 nm)	Lipolitik Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x
HBB 16	1,783	8,801 ± 0,52	b
HBB 25	1,806	10,929 ± 0,56	b
HBB 27	1,777	10,910 ± 0,35	b
HBB 32	1,673	8,237 ± 0,22	b
HBB 33	1,729	9,250 ± 0,52	b
HBB 34	1,793	15,589 ± 0,39	b
HBB 35	1,438	4,532 ± 0,11	b
HBB 37	0,637	3,397 ± 0,06	b
HBB 40	1,526	9,500 ± 0,23	b
HBB 103	0,662	2,731 ± 0,04	b
HBB 129	1,827	10,859 ± 0,46	b
HBB 134	1,871	19,925 ± 0,21	a
HBB 180	1,344	8,589 ± 0,07	b
HBB 185	1,759	10,698 ± 0,47	b
HBB 202	1,43	6,231 ± 0,89	b
HBB 205	1,704	9,429 ± 0,43	b
HBB 229	1,248	6,186 ± 0,24	b
HBB 231	1,559	7,378 ± 0,11	b
HBB 234	0,621	2,333 ± 0,04	b
HBB 248	0,821	2,519 ± 0,16	b
HBB 268	1,974	16,454 ± 0,56	b
HBB 286	1,67	11,211 ± 0,12	b

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: HBB 134'den farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 4.2 Kantitatif lipolitik aktivite tayini

4.2. HBB-134 İZOLATININ 16S rRNA ANALİZİ İLE TANILANMASI

HBB-134 izolatının 16S rRNA'yı kodlayan yaklaşık 1300 bp'lik gen bölgesi PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve BLAST analizi yapılmıştır. Sekans sonuçları Bioedit programı kullanılarak birleştirilmiş ve HBB-134 suşuna ait konsensus dizi elde edilmiştir. Konsensus dizi www.pubmed.com adresinde yer alan nükleotid blast programı aracılığıyla veritabanında yer alan diğer 16S rRNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. Veritabanında kayıtlı ve tür tanısı yapılmış olan bakteriler arasında en yüksek benzerlik oranı (% 99) *Anoxybacillus flavithermus* ile saptanmıştır. Veritabanında yer alan *Anoxybacillus flavithermus*'a ait 16S rRNA dizisi ile HBB 134'e ait olanlar karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.3'de verilmiştir. Ayrıca, izolat için, yine BLASTn programında yer alan ve Fast Minimum Evolution metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.3'de sunulmuştur. 16S rDNA sekans analizi yapıldıktan sonra, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html> adresinde bulunan Sequin programı kullanılarak, HBB-134 izolatının sekansı için Genbank'tan **GQ342689** kayıt numarası alınmıştır.

Çizelge 4.3 HBB-134 izolatına ait 16S rRNA konsensus sekans ve BLAST karşılaştırma sonucu

```
5'CAAGTCGAGCGGACGATTCAAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGTAGACGGGATAACACCGAGAAATC
GGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCGCATGATCTTTCGTTGAAAGGCGGC
GCAAGCTGTCGCTACAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCG
GGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTTAC
GATGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGG
CGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGT
```

GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG
 TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
 GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTATCCACCCTTTA
 GTGCTGTAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTG
 AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
 TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAACCCGAGA
 GATCGGGCGTTCCCCCTTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG
 TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGA
 CCTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGCTAAAAGTC
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
 CACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGTCGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAA
 TCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 CCGGAATCGCTAGTAATCGCG'3

>[gb|CP000922.1|](#) Anoxybacillus flavithermus WK1, complete genome
 Length=2846746

Sort alignments for this subject sequence by: E value Score Percent
identity

Query start position Subject start position

Features in this part of subject sequence:rRNA-16S ribosomal RNA

Score = 2364 bits (1280), Expect = 0.0

Identities = 1303/1313 (99%), Gaps = 5/1313 (0%) Strand=Plus/Minus

Query 1 CAAGTCGAGCGGACGATTCAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGACGGGTGAGTA60
 |||
 Sbjct2345212CAAGTCGAGCGGACGATTCAAAGCTTGCTTTTGAATCGTTAGCGGCGACGGGTGAGTA2345153

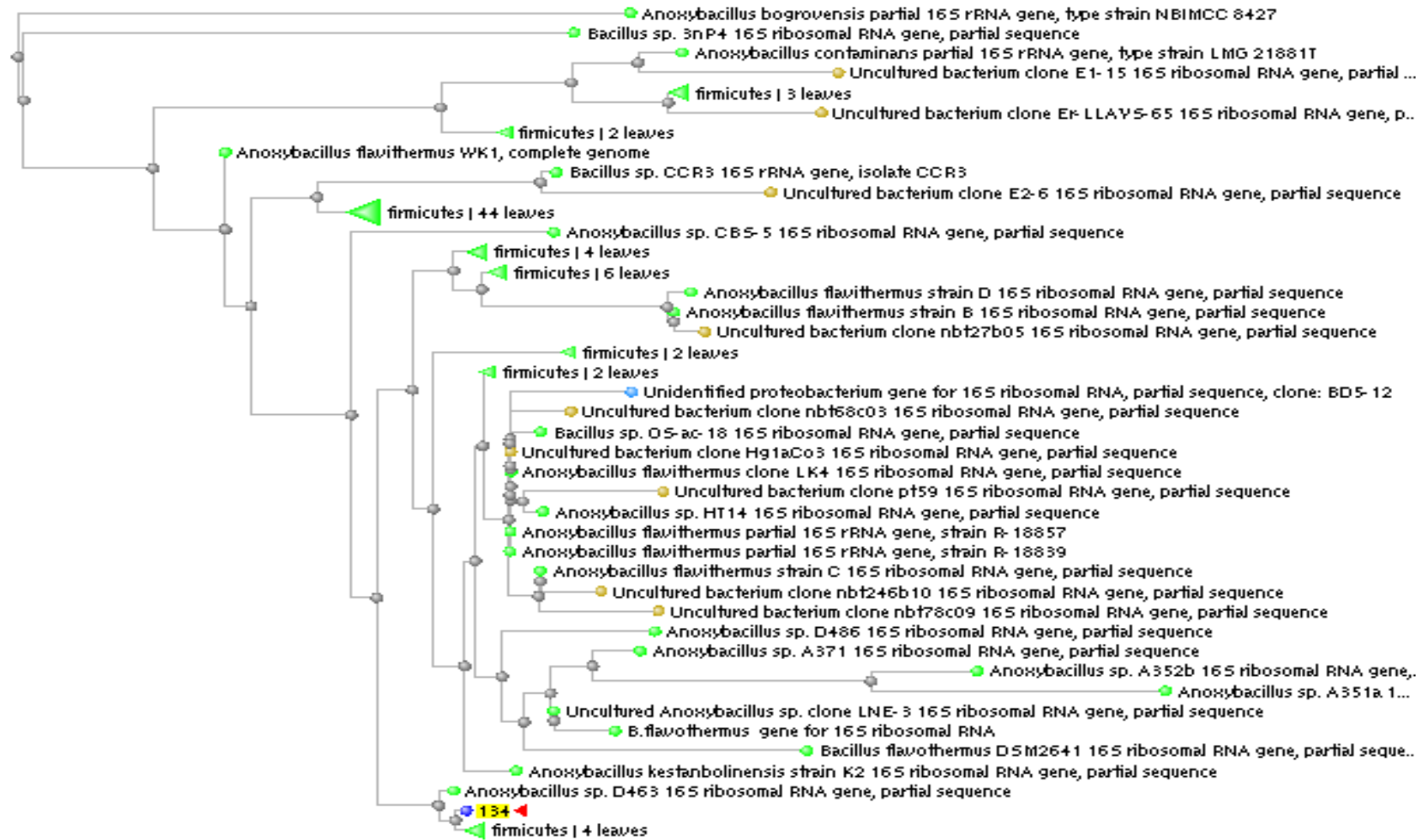
Query 61 ACACGTGGGCAACCTGCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGG120
 |||
 Sbjct2345152ACACGTGGGCAACCTGCCCTGTAGACGGGGATAACACCGAGAAATCGGTGCTAATACCGG2345093

Query 121 ATAATACGAAAGGTGCGCATGATC-TTTCGTTGAAAGCGGCGCAAGCTGTCGCTACAGGA179
 |||
 Sbjct2345092ATAACACGAAATGTCGATGA-CGTTTCGTTGAAAGACGGCGCAAGCTGTCGCTACAGGA2345034

Query 180 TGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTA239
 |||
 Sbjct2345033TGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTA2344974

Query 240 GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG299
 |||
 Sbjct2344973GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG2344914

Query 300 AGGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAG359
 |||
 Sbjct2344913AGGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAG2344854



Şekil 4.3 HBB 134 izolatına ait filogenetik ağaç

4.3. *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ÜN LİPAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE KÜLTÜR KOŞULLARININ ETKİSİ

4.3.1. Lipaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

HBB 134, % 0,1, 0,5 ve 1 final konsantrasyonlarda karbon kaynakları içeren ortamlarda 65 °C'de, pH 7,00'de 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları ve hücre içi aktiviteleri tayin edilmiş, sonuçlar çizelge 4.4 ve çizelge 4.5'de sunulmuştur.

Zeytin kara suyu, organik madde, askıda katı madde ve yağ içeriği oldukça yüksek olan bir atıktır (Şengül *et al.*, 2000). Zeytin kara suyunun yapısında bulunan organik bileşiklerin başında şeker, azot bileşikleri, uçucu asitler, polialkoller, pektin, yağ, polifenoller ve karasuya rengini veren taninler bulunmaktadır (Rozzi ve Malpei, 1996). Zeytin kara suyunun hücre gelişimi üzerine çok fazla bir etkisi görülmemiştir. Enzim üretimlerine bakıldığında % 0,1 ve 0,5'lik konsantrasyonlarda elde edilen aktivite değerlerinin kontrole aralarındaki fark önemsiz çıkmıştır. Enzim üretimi % 0,1'lik konsantrasyonda kontrole göre biraz düşük iken, % 1'lik konsantrasyona doğru kademeli bir artış gözlenmiştir. Bu aktivite artışının zeytin kara suyunun içeriğindeki yağdan kaynaklandığı ileri sürülebilir. Bu nedenle zeytin kara suyunun % 1,5'lik konsantrasyonu da denenmiştir ancak bu konsantrasyonda bakteri gelişimi gözlenmemiştir. Zeytin kara suyunun içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin bakteri gelişimini inhibe etmiş olabileceği düşünülmektedir.

Lipazlar genellikle triaçilgliseroller, yağ asitleri, gliserol veya tweenler gibi lipid yapısındaki karbon kaynakları kullanılarak üretilirler. Bununla beraber şekerler, şeker alkoller, polisakkaritler ve peynir altı suyu gibi diğer kompleks kaynaklar da lipazların üretimini artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Gupta, *et al.*, 2004).

Gliserol, % 0,1'den % 1'e doğru artan konsantrasyonda enzim üretimini de artırmıştır. Bu nedenle % 1,5'lik konsantrasyonu da denenmiştir ve % 1'lik konsantrasyona göre bir düşüş görülmüştür. Ancak yine de enzim üretimi kontrole

göre daha yüksek bulunmuştur. Gliserolün genel anlamda enzim üretimini artırdığı söylenebilir. Dalmau *et al.* (2000) *Candida rugosa*'dan lipaz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada gliserolün hücre gelişimini artırdığını ancak lipaz aktivitesi gözlenmediğini bildirmişlerdir. Gliserolün *Aspergillus terreus* (Gulati, *et al.*, 1999) lipazı ve *Bacillus circulans* MAS2 (Kademi *et al.*, 1999b) esterazının üretimlerini artırmadığı bildirilmiştir.

Denenen karbon kaynaklarından Tween 20 gelişimi tamamen inhibe ederken Tween 40, 60 ve 80 içeren ortamlarda bakteri gelişimi çok zayıf olduğu için aktivite hesabı yapılamamıştır. Kültür ortamına Tween 80 gibi sürfaktanların eklenmesinin ekstraselüler lipaz aktivitesini artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Li, *et al.*, 2004; Kumar, *et al.*, 2005; Tan, *et al.*, 2004). Bu durum, hücrenin geçirgenliğinin değişmesine veya hücreye bağlı lipaz üzerine sürfaktanların etkisine bağlanmıştır. Ancak sürfaktanların lipolitik enzim üretimini artırmadığı durumlar da mevcuttur (Kademi, *et al.*, 2000; Dominguez, *et al.*, 2003).

Denenen şekerlerden glukoz, fruktoz ve sukroz tüm konsantrasyonlarda bakterinin gelişimini azaltmıştır. Bununla beraber glukozun % 0,1 ve 0,5'lik, fruktozun ise % 0,5'lik konsantrasyonlarının enzim üretimini artırdığı saptanmıştır. Etkisi denenen şekerler içinde en yüksek aktivite ortama laktoz eklendiğinde elde edilmiştir. Laktozun konsantrasyonu artırıldıkça hücre gelişimini artırdığı görülmüştür, ancak enzim üretimi aynı oranda artmamıştır. Bu nedenle en yüksek aktivite değeri % 0,1'lik laktoz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Kademi *et al.* (1999b), *B. circulans* MAS2'nin kültür ortamına glukoz, fruktoz, sukroz veya asetat eklemenin hem hücre gelişimini hem de esteraz üretimini büyük oranda stimüle ettiğini bulmuşlardır. Choi ve Lee (2001) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus casei* CL96'dan esteraz üretiminde % 1'lik laktozun en uygun karbon kaynağı olduğunu bildirmişlerdir. Tan *et al.* (2004)'da yaptıkları çalışmada *Penicillium camembertii* Thom PG-3'den lipaz üretiminde etkisi denenen karbohidratlardan üretimi en çok artıranların laktoz ve mannitol olduğunu bildirmişlerdir.

Enzim üretimini indüklemek amacıyla ortama eklenen yağların etkisi organizmadan organizmaya değişiklik göstermektedir. Ancak yağların genel olarak lipolitik enzim

üretimini artırdıkları bilinmektedir. Denenen yağların genel anlamda enzim üretimini artırdıkları görülmüştür. Keten tohumu yağı % 0,5 ve 1'lik konsantrasyonlarda bakteri gelişimini inhibe etmiştir. Pamuk yağı % 0,1'lik konsantrasyonda bakteri gelişimini yaklaşık 2 kat artırmıştır ancak enzim üretimi aynı oranda artmadığı için spesifik aktivitesi kontrolün altında kalmıştır. Ticari yağlar denenen tüm konsantrasyonlarında genel olarak enzim üretiminde hafif bir artış sağlamışlardır. Bunlardan ruşeym yağı (21,59 U/mg), zeytinyağı (23,35 U/mg), mısır yağı (21,48 U/mg) ve fındık yağı (24,38 U/mg) % 0,1'lik konsantrasyonda, pamuk yağı (22,16 U/mg), soya yağı (20,41 U/mg) ve ayçiçek yağı (21,48 U/mg) da % 0,5'lik konsantrasyonda en iyi üretimi sağlamışlardır. En iyi lipaz üretimi 40,38 U/mg (kontrolün 2,4 katı) ile % 0,5 zeytinyağı içeren besi ortamında gerçekleşmiştir. Bunu 32,44 U/mg ile % 0,1 triolein içeren ortam izlemektedir (Çizelge 4.5). Benzer şekilde *Aspergillus* sp.'den (Cihangir ve Sarıkaya, 2004), *Penicillium restrictum*'dan (de Azeredo, *et al.*, 2007) ve *Bacillus* sp. LBN 4'den (Bora ve Kalita, 2007) lipaz üretiminde de en iyi lipolitik aktivite zeytinyağı içeren ortamda elde edilmiştir. Ertuğrul *et al.* (2007) *Bacillus* sp.'den lipaz üretiminde en iyi sonucu triolein içeren ortamda elde etmişlerdir. *Fusarium solani*'den (Maia *et al.*, 2001) lipaz üretiminde en iyi aktivitenin sırasıyla susam yağı ve triolein içeren ortamlarda *Aspergillus terreus*'den (Gulati, *et al.*, 1999) ve *Bacillus coagulans* BTS-3'den (Kumar *et al.* 2005) lipaz üretiminde ise en iyi aktivitenin sırasıyla mısır yağı ve rafine hardal yağı içeren ortamlarda elde edildiği bildirilmiştir. *P. camembertii* Thom PG3'ün ise en iyi lipaz üretimini jojoba yağı içeren ortamda gerçekleştirdiğini ve bunu zeytinyağı içeren ortamın izlediği bildirilmiştir (Tan *et al.*, 2004).

4.3.2. Lipaz Üretimi Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi

Organik ve inorganik azot kaynakları enzimlerin sentezinde önemli bir yere sahiptirler. Çünkü inorganik azot kaynakları hızlı bir şekilde kullanılırken, organik azot kaynakları hücre metabolizması ve enzim sentezi için gerekli olan pek çok hücre büyüme faktörleri ve amino asitleri sağlamaktadır. Bu nedenle hem organik hem de inorganik kaynaklar lipaz üretiminde kullanılmaktadırlar (Tan, *et al.*, 2004).

Çizelge 4.4 Lipaz üretimi üzerine çeşitli karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynağı	Kuru ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT. ± S.H.)	x
Kontrol (LB)	0,680	13,44 ± 0,12	a
Zeytin kara suyu (% 0,1)	0,760	12,68 ± 0,11	a
Gliserol (% 0,1)	0,900	14,76 ± 0,11	a
Tween 20 (% 0,1)	0	-	-
Tween 40 (% 0,1)	0,060	-	-
Tween 60 (% 0,1)	0,090	-	-
Tween 80 (% 0,1)	0,065	-	-
Glukoz (% 0,1)	0,225	16,27 ± 0,54	b
Fruktoz (% 0,1)	0,175	11,72 ± 0,53	b
Sukroz (% 0,1)	0,265	5,80 ± 0,52	b
Laktoz (% 0,1)	0,565	19,01 ± 0,71	b
Zeytin kara suyu (% 0,5)	0,610	14,36 ± 0,09	a
Gliserol (% 0,5)	0,700	16,72 ± 0,24	b
Tween 20 (% 0,5)	0	-	-
Tween 40 (% 0,5)	0,050	-	-
Tween 60 (% 0,5)	0,100	-	-
Tween 80 (% 0,5)	0,095	-	-
Glukoz (% 0,5)	0,240	14,58 ± 0,24	a
Fruktoz (% 0,5)	0,190	14,41 ± 0,39	a
Sukroz (% 0,5)	0,240	11,14 ± 0,41	b
Laktoz (% 0,5)	0,630	16,09 ± 0,34	b
Zeytin kara suyu (% 1)	0,670	18,56 ± 0,18	b
Gliserol (% 1)	0,745	21,22 ± 0,19	b
Tween 20 (% 1)	0	-	-
Tween 40 (% 1)	0,085	-	-
Tween 60 (% 1)	0,095	-	-
Tween 80 (% 1)	0,085	-	-
Glukoz (% 1)	0,135	10,68 ± 1,50	b
Fruktoz (% 1)	0,275	3,03 ± 0,16	b
Sukroz (% 1)	0,250	9,10 ± 0,56	b
Laktoz (% 1)	0,880	16,11 ± 0,18	b
Zeytin kara suyu (% 1,5)	0	-	-
Gliserol (% 1,5)	0,550	18,20 ± 0,51	b
Laktoz (% 1,5)	1,040	12,76 ± 0,18	a

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Kontrole göre farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05)

Çizelge 4.5 Lipaz üretimi üzerine çeşitli yağların etkisi

	Karbon kaynağı	Kuru ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT. ± S.H.)	x
	Kontrol (LB + gum arabic)	0,585	16,73 ± 0,17	a
	Zeytin yağı (% 0,1)	0,740	17,67 ± 0,11	b
	Pamuk yağı (% 0,1)	1,015	12,26 ± 0,07	b
	Mısır yağı (% 0,1)	0,995	16,88 ± 0,09	a
	Soya yağı (% 0,1)	0,800	18,82 ± 0,05	b
	Keten tohumu yağı (% 0,1)	0,590	28,71 ± 0,09	b
	Badem yağı (% 0,1)	0,625	27,03 ± 0,04	b
	Triolein (% 0,1)	0,365	32,44 ± 0,43	b
Ticari yağlar	Ruşeym yağı (% 0,1)	0,230	21,59 ± 0,20	b
	Zeytin yağı (% 0,1)	0,605	23,35 ± 0,42	b
	Mısır yağı (% 0,1)	0,665	21,48 ± 0,28	b
	Pamuk yağı (% 0,1)	0,670	21,72 ± 0,09	b
	Soya yağı (% 0,1)	0,800	18,25 ± 0,02	b
	Fındık yağı (% 0,1)	0,585	24,38 ± 0,23	b
	Ayçiçek yağı (% 0,1)	0,660	20,73 ± 0,17	b
	Zeytin yağı (% 0,5)	0,360	40,38 ± 0,46	b
	Pamuk yağı (% 0,5)	0,705	16,55 ± 0,10	a
	Mısır yağı (% 0,5)	0,530	26,79 ± 0,09	b
	Soya yağı (% 0,5)	0,795	15,80 ± 0,18	b
	Badem yağı (% 0,5)	0,775	22,09 ± 0,12	b
	Triolein (% 0,5)	0,480	28,83 ± 0,16	b
Ticari yağlar	Ruşeym yağı (% 0,5)	0,870	11,31 ± 0,12	b
	Zeytin yağı (% 0,5)	0,570	22,41 ± 0,23	b
	Mısır yağı (% 0,5)	0,735	19,06 ± 0,32	b
	Pamuk yağı (% 0,5)	0,755	22,16 ± 0,15	b
	Soya yağı (% 0,5)	0,755	20,41 ± 0,11	b
	Fındık yağı (% 0,5)	0,725	20,99 ± 0,13	b
	Ayçiçek yağı (% 0,5)	0,705	21,48 ± 0,12	b
	Zeytin yağı (% 1)	0,690	20,03 ± 0,17	b
	Pamuk yağı (% 1)	0,620	17,89 ± 0,03	b
	Pamuk yağı (% 1,5)	0,750	15,85 ± 0,20	b
	Mısır yağı (% 1)	0,675	22,46 ± 0,12	b
	Soya yağı (% 1)	0,780	14,83 ± 0,13	b
	Badem yağı (% 1)	0,760	21,95 ± 0,12	b
	Triolein (% 1)	0,695	15,50 ± 0,15	b
Ticari yağlar	Ruşeym yağı (% 1)	0,540	13,60 ± 0,18	b
	Zeytin yağı (% 1)	0,740	19,47 ± 0,31	b
	Mısır yağı (% 1)	0,805	21,39 ± 0,05	b
	Mısır yağı (% 1,5)	1,07	20,23 ± 0,18	b
	Pamuk yağı (% 1)	0,810	18,68 ± 0,21	b
	Soya yağı (% 1)	0,810	19,21 ± 0,16	b
	Fındık yağı (% 1)	0,800	17,84 ± 0,25	b
	Ayçiçek yağı (% 1)	0,895	13,81 ± 0,20	b

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H. : Standart hata x: Kontrole göre farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05)

HBB 134'den lipaz üretimi üzerine çeşitli azot kaynaklarının etkisini araştırmak için karbon kaynağı olarak % 0,5 zeytinyağı içeren ortama çeşitli organik ve inorganik azot kaynakları eklenmiş ve kültürler 65 °C'de, pH 7,00'de 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları ve hücre içi lipaz aktiviteleri tayin edilmiştir, sonuçlar çizelge 4.6 da sunulmuştur.

İnorganik azot kaynakları (üre, amonyum sülfat, amonyum nitrat) bakteri gelişimini büyük ölçüde artırmıştır, fakat enzim üretimini aynı şekilde artırmamışlardır. Bulunan aktivite değerleri kontrolün çok altındadır. Daha zengin bir içeriğe sahip olan organik azot kaynakları yeast ekstrakt ve triptonu birlikte içeren kontrol ile benzer sonuçlar vermiştir. Yeast ekstrakt ve kazein hidrolizat içeren ortamların enzim üretimleri kontrole göre biraz daha düşük, pepton ve tripton içeren ortamların ise biraz daha yüksek çıkmıştır. Bulunan değerlerin kontrole aralarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. Pepton 22,57 U/mg ile enzim üretimini en çok artıran azot kaynağı olarak saptanmıştır. Bulunan bu değer % 1 tripton ve % 0,5 yeast ekstrakt içeren kontrolden (LB) daha yüksektir. Peptonun % 1 ve 1,5'lik konsantrasyonları da denenmiş ve % 1'lik konsantrasyonda 20,71 U/mg lipaz aktivitesi elde edilirken % 1,5'lik konsantrasyonda bakteri gelişimi çok zayıf olduğu için aktivite hesabı yapılmamıştır. Kontrole göre daha düşük konsantrasyonda azot kaynağı (% 0,5 pepton) kullanılarak daha iyi bir verim elde edilmesi daha az besin kullanılarak daha çok enzim üretimi anlamına gelmekte ve ekonomik açıdan avantaj sağlamaktadır. Tan *et al.* (2004), *Penicillium camembertii* Thom PG-3'den lipaz üretiminde en iyi azot kaynağının yağı alınmış soya olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca NH_4^+ veya NO_3^- formunda bulunan inorganik azot kaynaklarının lipaz üretimini artırırken, üre gibi diğer inorganik kaynakların lipaz sentezini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Literatürde yer alan çalışmalarda lipolitik enzim üretiminde genellikle organik azot kaynaklarının kullanıldığı görülmektedir. *Bacillus circulans* MAS2'den esteraz üretimi üzerine çeşitli azot kaynaklarının etkisi araştırılmış ve en iyi sonucun yeast ekstrakt ve triptonun birlikte kullanıldığı LB ortamında elde edildiği bildirilmiştir (Kademi *et al.*, 1999b). *Aspergillus terreus*'dan lipaz üretiminde % 0,1'lik kazein (Gulati *et al.*, 1999), *Acinetobacter radioresistens*'den

lipaz üretiminde % 0,75'lik yeast ekstrakt (Li *et al.*, 2004), *Aspergillus* sp.'den lipaz üretiminde % 1'lik pepton (Cihangir ve Sarıkaya, 2004) ve *Bacillus coagulans* BTS-3'den lipaz üretiminde ise % 0,5 pepton ve % 0,5 yeast ekstrakt (Kumar *et al.*, 2005) en iyi azot kaynakları olarak bildirilmiştir.

Karbon ve azot kaynaklarının etkisi incelenerek elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde % 0,5 pepton, % 0,5 zeytinyağı, % 0,5 gum arabic ve % 1 NaCl'den oluşan besi ortamı “enzim üretim ortamı” olarak belirlenmiştir.

4.3.3. Lipaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH'sının Etkisi

HBB 134'den lipaz üretimi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için izolat pH 5,50-8,50 arasında enzim üretim ortamında 65°C'de, 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları ve hücre içi aktiviteleri tayin edilmiştir (Çizelge 4.7). Ortam pH'ındaki küçük farklar bakteri gelişimini ve enzim üretimini etkileyebilmektedir. HBB 134 pH 6,00'nın altındaki ve 8,50'in üzerindeki pH'larda gelişim gösterememiştir, bununla birlikte pH'ı 8,50 olan ortamda gelişim çok zayıf olduğu için aktivite hesaplanamamıştır. En iyi enzim aktivitesi 19,51 U/mg ile organizma pH'ı 6,50 olan ortamda geliştirildiğinde elde edilmiştir. Benzer şekilde Fakhreddine *et al.* (1998) LCB 40 straininden lipaz üretiminde optimum pH'ın 6,4 olduğunu bildirmişlerdir. Bunun dışında lipaz üretimi için *B. circulans* MAS2 için pH 8,1 (Kademi, *et al.*, 1999), *B. coagulans* BTS-3 için pH 8,5 (Kumar, *et al.*, 2005), *Aspergillus terreus* (Gulati, *et al.*, 1999) ve *Geobacillus* sp. (Abdel-Fattah, 2002) için pH 9,0 ve *Lactobacillus casei* CL96 için pH 7,0 (Choi ve Lee, 2001) en uygun pH'lar olarak bildirilmiştir.

4.3.4. Lipaz Üretimi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

HBB 134'den lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için izolat 30-85°C arasındaki sıcaklıklarda pH'ı 6,50 olan enzim üretim ortamında 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru

Çizelge 4.6 Lipaz üretimi üzerine çeşitli azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynağı	Kuru ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT. ± S.H.)	x
Kontrol (LB)	0,68	20,71 ± 0,180	a
Pepton	0,64	22,57 ± 0,150	b
Tripton	0,61	22,42 ± 0,260	b
Yeast ekstrakt	0,66	19,18 ± 0,280	b
Beef ekstrakt	0,55	20,80 ± 0,370	a
Kazein hidrolizat	0,55	17,61 ± 0,210	b
Jelatin	0,74	0,78 ± 0,080	b
Üre	5,38	0,55 ± 0,004	b
Amonyum sülfat	3,70	0,43 ± 0,040	b
Amonyum nitrat	4,03	0,35 ± 0,020	b

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H. : Standart hata
x: Kontrole göre farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05)

Çizelge 4.7 Lipaz üretimi üzerine başlangıç pH'nın etkisi

İlk pH	Kuru ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT. ± S.H.)	x	Son pH
5,00	0	-	-	-
5,50	0	-	-	-
6,00	0,5	6,86 ± 0,16	a	5,72
6,50	0,90	19,51 ± 0,32	b	8,32
7,00	0,65	13,50 ± 0,18	c	8,06
7,50	0,47	11,03 ± 0,09	d	7,28
8,00	0,39	8,81 ± 0,07	e	7,87
8,50	0,01	-	-	8,70
9,00	0	-	-	-

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05)

ağırlıkları ve hücre içi aktiviteler tayin edilmiştir (Çizelge 4.8). HBB 134, 30 °C'de gelişim gösterememiş ve en iyi gelişim 50 °C'de elde edilmiştir. İzolatın 30 °C'de gelişmemesi termotolerant bir bakteri değil de termofil bir bakteri olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar *Bacillus circulans* MAS2 ile yapılan çalışmada da elde edilmiştir. Bakteri 35-55 °C arasında gelişim göstermiş ve maksimum gelişim hızı 50 °C olarak belirlenmiştir (Kademi, *et al.*, 1999b). HBB 134'ün gelişimi 35 °C'den itibaren sıcaklığın artmasıyla birlikte artmış ve 50 °C'den sonra ise düşüşe geçmiştir. En iyi hücre gelişimi 50 °C'de elde edilirken, en iyi enzim üretimi 79,69

U/mg ile 45 °C’de elde edilmiştir. Her ne kadar bulunan değerler diğer sıcaklıklarda elde edilen değerler ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmış olsa da 40 °C (72,14 U/mg hücre) ve 50 °C (71,03 U/mg hücre)’de elde edilen spesifik aktivite sonuçları 45 °C’deki sonuçlara oldukça yakındır. Bu nedenle HBB 134’den 40-50 °C arasındaki sıcaklıklarda enzim üretimi yapılabilir. HBB 134’den lipaz üretimi (45 °C) ile hücre gelişimi (50 °C) bire bir paralellik göstermemiştir. Benzer sonuçlar farklı çalışmalarda da görülmüştür. *Bacillus thermoleovorans* ID-1’in en iyi gelişim sıcaklığı 65 °C iken en iyi lipaz üretimini 50 °C’de gerçekleştirmiştir (Lee *et al.*, 1999). *Thermus thermophilus*’dan lipaz üretiminde en uygun gelişim sıcaklığı 60°C olarak belirlenirken enzim üretimi için en uygun sıcaklığın 70 °C olduğu bildirilmiştir (Dominguez, *et al.*, 2005). HBB 134’ den lipaz üretiminde 65 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda belirgin bir düşüş görülmüştür.

Çizelge 4.8 Lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Kuru ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT. ± S.H.)	x
30	0	-	-
35	1,14	62,52 ± 0,09	a
40	1,20	72,14 ± 0,86	b
45	1,23	79,69 ± 1,13	c
50	1,59	71,03 ± 0,68	b
55	1,28	48,88 ± 0,81	d
60	1,27	40,52 ± 0,10	e
65	1,11	18,93 ± 0,12	f
70	0,86	2,76 ± 0,07	g
75	0,73	3,09 ± 0,18	g
80	0,45	4,31 ± 0,07	g

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05)

4.3.5. HBB 134’ün Zamana Bağlı Gelişimi, Lipaz Üretimi Ve Lipazın Lokalizasyonu

HBB 134 suşunun optimum koşullarda zamana bağlı gelişimi, lipaz üretimi ve lipazın lokalizasyonunu belirlemek için öncelikle stok kültürden LB broth içeren tüpe inoküle edilerek bir gece inkübe edilmiştir. Gecelik kültürün absorbansı 600

nm'de 0,1 olacak şekilde ayarlanmış ve pH'ı 6,50 olan 200 mL enzim üretim ortamı içeren 1 L'lik erlene % 1 oranında inoküle edilmiştir. Kültür 45 °C'de 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. Kültürden her 3 saatte bir örnek alınmıştır. Alınan örneklerin final pH'ları ölçülüp kuru ağırlıkları tayin edildikten sonra ayrıntıları "Materyal ve Yöntem" de verilen S1, P1, S2 ve P2 fraksiyonları elde edilmiştir. S1 fraksiyonu hücre dışı enzim aktivitesini, P1 fraksiyonu parçalanmamış hücrelerdeki aktiviteyi, S2 fraksiyonu hücre içi enzim aktivitesini ve P2 fraksiyonu da membrana bağlı enzim aktivitesini göstermektedir.

HBB 134 suşu optimum koşullarda geliştirildiğinde enzim üretiminin log fazının başlarında başlayıp, ortasında (12. saatte) maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.4). Enzim aktivitesinin büyük bir kısmı hücre içi fraksiyonda (S2) görülmüştür. Bununla beraber parçalanmamış hücre fraksiyonunda da (P1) enzim aktivitesi hücre içi fraksiyonda gözlenen aktivite değerlerine oldukça yakın çıkmıştır. Bu durum substratın hidrolizlenmeden önce hücre duvarının içinden geçtiğini göstermektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Kademi *et. al.*, 1999; Kakariari *et. al.*, 2000). S2 fraksiyonunda 12. saatten sonra zamana bağlı olarak aktivitede düşüş olmakla beraber 24. saatte bile aktivitenin büyük bölümü (maksimum aktivitenin % 81'i) korunmuştur.

Bütün fraksiyonlarda 15. saatte aktivitede bir düşüş gözlenmiştir. Bu aktivite kaybının ortamdaki proteazların aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. S1 fraksiyonunda 15. saatteki düşüşten sonra 18. saatte aktivitede bir artış gözlenmiş ve sonraki saatlerde aktivitede yeniden hafif bir düşüş olmuştur; ancak bulunan değerler istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. Aktivitedeki bu artışın nedeni hücrelerin lizise uğraması sonucu hücre içi enzimin bir kısmının dışarı salınmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir. Benzer bir durum *Bacillus circulans* MAS2'den esteraz üretiminde de bildirilmiştir. MAS2'nin intraselüler esteraz aktivitesi hücre gelişimine paralel olarak 10 saat boyunca artmış ve daha sonra inkübasyon süresi uzadıkça hücre lizisine paralel olarak ekstraselüler enzim aktivitesinde artış görülmüştür (Kademi *et al.*, 1999). S1 fraksiyonunda 18. saatten sonra aktivitedeki hafif kaybın enzimin hücre dışı şartlarda stabilitesini koruyamamasından kaynaklandığı

düşünülmektedir. Chen *et al.* (1998) lipaz üretiminin hücre gelişimi dışında üç faktöre bağlı olduğunu bildirmişlerdir: (i) proteaz oluşumu, (ii) lipazın pH stabilitesi, (iii) lipazın farklı pH'lardaki reaktivitesi. P2 fraksiyonunda enzim aktivitesi 15. saatteki düşüşünden sonra tekrar artmaya başlamış ve 21. saatte bir çıkış yaptıktan sonra tekrar düşüşe geçmiştir. Bu durum membrana bağlı ikinci bir enzim olabileceğini düşündürmektedir.

Kültür ortamının pH'ı gelişimin başladığı 3. saatten itibaren yavaş ama devamlı bir şekilde artarak 24. saat sonunda 8,28'e ulaşmıştır. Bu durum organizmanın ortamdaki bileşenleri kullanarak alkali ürünler oluşturduğunu göstermektedir. İzolatın hücre dışı enzim aktivitesi yeterli olsaydı ortamdaki zeytinyağının hidrolizlenerek yağ asitlerinin açığa çıkması ve dolayısıyla ortam pH'ının düşmesi beklenirdi. Ancak lipaz aktivitesinin büyük bölümü hücre içi olduğu için daha çok ortamdaki azot kaynakları kullanılmış ve sonuç olarak alkali ürünler oluşmuştur.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında *A. flavithermus* HBB 134, pH'ı 6,50 olan "enzim üretim ortamı" nda 45 °C'de 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 12 saat geliştirilmiş ve hücre içi enzim fraksiyonu (S2) saflaştırma ve karakterizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

4.3. *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 LİPAZININ SAFLAŞTIRILMASI

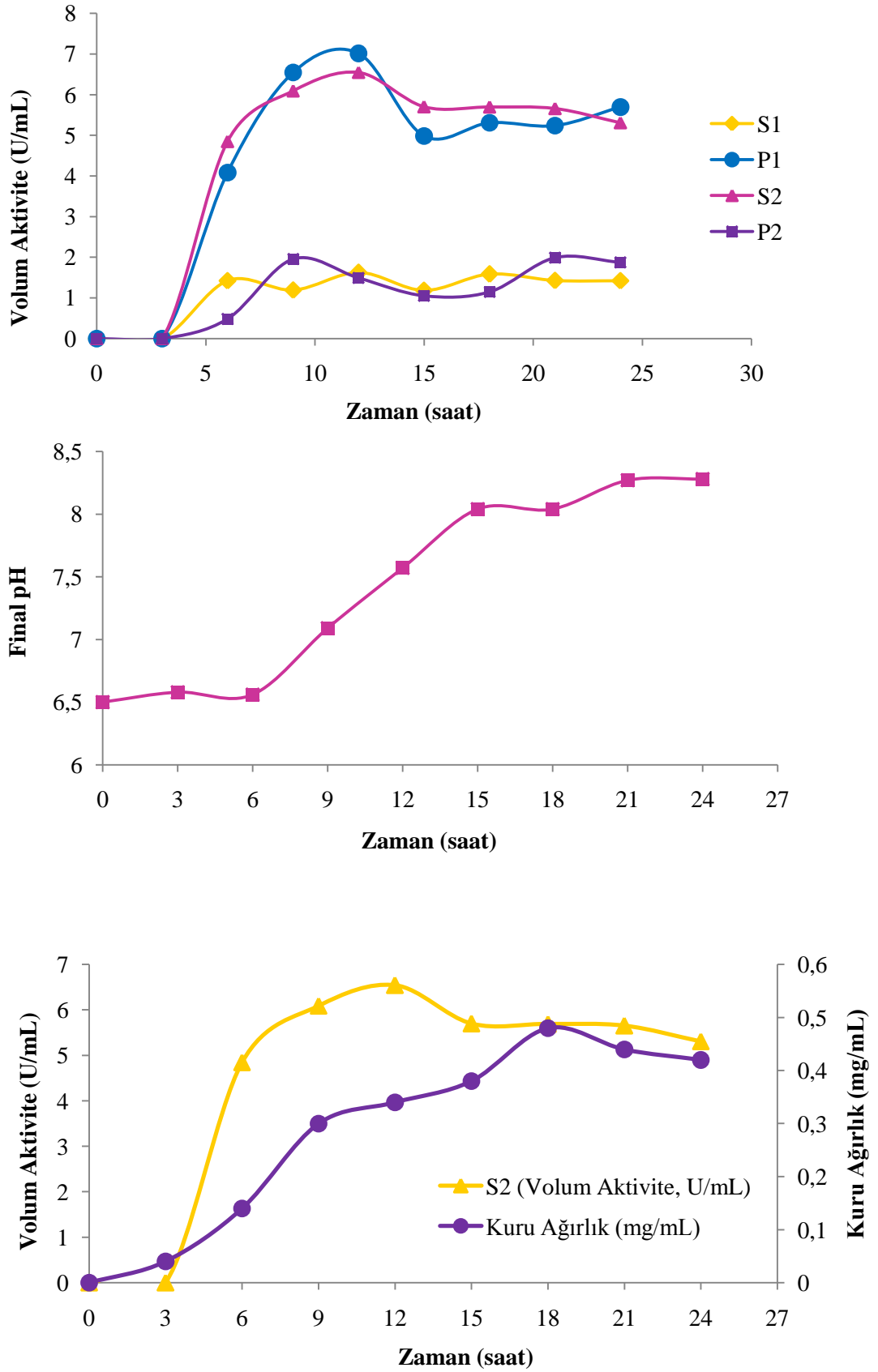
Enzimin saflaştırma işlemine geçilmeden önce *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 suşu optimum üretim koşullarında geliştirilmiştir. Daha sonra hücre içi enzim fraksiyonu elde edilmiş ve "ham ekstrakt" olarak adlandırılmıştır. Ham ekstrakt sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, hidrofobik etkileşim kromatografisi, diyaliz, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografisi işlemlerinden geçirilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırma adımlarında elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein tayinleri standart koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Son olarak fraksiyonlar sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile zimografi yapılarak görüntülenmiş ve standart proteinler kullanılarak enzimin molekül ağırlığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.9 A. *hidirlerensis* HBB 134'den lipaz üretimi ve lipazın lokalizasyonu

Zaman (saat)	Kuru Ağırlık (mg/mL)	Final pH	Volum Aktivite (U/mL)							
			S1 (ORT. ± S.H.)	x	P1 (ORT. ± S.H.)	x	S2 (ORT. ± S.H.)	x	P2 (ORT. ± S.H.)	x
0	0	6,50	0	a	0	a	0	a	0	a
3	0,04	6,58	0	a	0	a	0	a	0	a
6	0,14	6,56	1,173 ± 0,07	b	4,083 ± 0,21	b	4,846 ± 0,19	b	0,481 ± 0,12	b
9	0,30	7,09	1,192 ± 0,05	b	6,545 ± 0,12	c	6,090 ± 0,31	cd	1,955 ± 0,15	c
12	0,34	7,57	1,455 ± 0,02	c	7,013 ± 0,43	c	6,545 ± 0,16	d	1,487 ± 0,10	d
15	0,38	8,04	1,186 ± 0,08	b	4,981 ± 0,17	d	5,698 ± 0,29	ce	1,051 ± 0,12	e
18	0,48	8,04	1,583 ± 0,08	c	5,307 ± 0,13	d	5,692 ± 0,18	ce	1,147 ± 0,04	e
21	0,44	8,27	1,429 ± 0,08	c	5,237 ± 0,38	d	5,654 ± 0,21	ce	1,987 ± 0,14	c
24	0,42	8,28	1,423 ± 0,03	c	5,692 ± 0,11	d	5,307 ± 0,10	be	1,872 ± 0,10	c

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H. :** Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 4.4 *A. flavithermus* HBB 134'den lipaz üretimi ve lipazın lokalizasyonu

Saflaştırma işlemlerinin yaklaşık % 80'inde ilk basamak olarak çöktürme işlemi kullanılmaktadır ve bu amaçla da en çok amonyum sülfat tuzu (% 60) kullanılır. Saflaştırma işlemlerinde çöktürme işleminden sonra kromatografi adımlarına geçilir. Bu amaçla en çok iyon değişim (% 67), jel filtrasyon (% 60) ve hidrofobik etkileşim (%18) kromatografileri kullanılmaktadır (Saxena, *et al.*, 2003a).

4.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Enzim için en uygun amonyum sülfat doygunluk yüzdesini belirlemek için ham ekstrakta sırasıyla 0 °C'de % 20, 40, 60 ve 70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve sırasıyla P1, P2, P3, P4 ve S4 fraksiyonları elde edilmiştir. Bütün fraksiyonlarda aktivite ve protein tayinleri yapılmış ve saflaştırma katsayıları ile % verimleri hesaplanmıştır (çizelge 4.10).

Buna göre % 40 ve 60'luk çöktürmelerden elde edilen enzimin saflaştırma katsayıları 1'in üzerinde ve verimleri iyi olduğu için bundan sonraki aşamalarda % 60'luk amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve elde edilen pellet 20 mM Tris-HCl tamponuna karşı bir gece diyaliz edilmiştir. Diyalizat bir sonraki saflaştırma adımı olan fenil sefaroze CL-4B kolonuna uygulanmıştır.

4.3.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.5'de özetlenmiştir. Kolon dolgu maddesi olarak Fenil Sefaroz CL-4B kullanılmıştır. Kolon önce 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8,00; 4°C) tamponu ile dengeye getirilmiştir. Diyalizata da 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenmiş ve kolona uygulanmıştır. Kolon önce bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren tamponla yıkanmıştır. Daha sonra kolona ters $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradienti uygulanarak proteinlerin ve lipazın çıkması amaçlanmıştır. Fraksiyonlarda aktivite tayini yapılmış ve ancak gradientin sonunda bir miktar enzim çıkışının olduğu görülmüştür. Bu nedenle kolon tuz içermeyen tamponla yıkanmaya devam edilmiştir. Tamponla yıkama ile elde edilen ilk fraksiyonlarda da bir miktar aktivite belirlenmekle birlikte istenilen aktivite piki sağlanamamıştır. HBB 134 lipazının ters gradient ve tamponla yıkama sonucu

tamamının geri elde edilememesi, bu lipazın hidrofobik karakterde olduğunu düşündürmektedir. Lipazı kolondan geri kazanabilmek için kolon % 30'luk propanol ile yıkanmış çıkan fraksiyonlarda aktivite tayin edilmiştir. İstenilen aktivite çıkışı 86 ve 87. fraksiyonlarda elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar birleştirilmiş ve 20 mM Tris-HCl (pH 8,00, 4°C) tamponuna karşı 20-24 saat diyaliz edilmiştir. Diyalizat 10.000 MWCO ultrafiltrasyon membranı ile konsantre edilmiş ve örnekte aktivite ve protein tayini yapılmıştır. Buradan elde edilen fraksiyonda % 21'lik bir verimle 5,4 katlık bir saflaştırma elde edilmiştir (Çizelge 4.11). Literatürde de hidrofobik etkileşim kromatografisinde ters gradient sonucu kolondan çıkarılamayan örneklerin çeşitli deterjanlar veya çözücüler kullanılarak kolondan çıkarıldığı çalışmalar mevcuttur. Brush *et al.* (1999) *Ophistoma piliferum*'dan lipaz saflaştırmada ilk kromatografi adımı olarak hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanmışlardır. Araştırmacılar, lipazın kolon dolgu maddesi olarak kullanılan oktil sefaroza çok sıkı bağlandığını ve bu nedenle enzimi kolondan çıkarmak için % 0,2'lik Triton X-100 kullandıklarını bildirmişlerdir. Ogino *et al.* (2000) *Pseudomonas aeruginosa* LST-03'ün lipazını saflaştırırken amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisinden sonra üçüncü adım olarak hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanmışlardır. Kolonda dolgu maddesi olarak kullanılan fenil sefaroze 6 fast flow jelden enzimi ayırmak için % 45'lik isopropanol ile kolonu yıkamışlardır. Saxena *et al.* (2003b) *Aspergillus carneus*'dan lipaz saflaştırırken amonyum sülfat çöktürmesini takiben hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulamışlar ve kolon dolgu maddesi olarak oktil sefaroze CL-4B kullanmışlardır. Kolona bağlanan enzimi ayırmak için % 30'luk izopropanol kullanmışlardır.

4.3.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.6'da özetlenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Sefadeks G-100 kullanılmıştır. Fenil sefaroze CL4B kolonundan çıkan örnek konsantre edilerek kolona uygulanmıştır. Kolon tamponla yıkanarak proteinler kolondan çıkarılmışlardır. Fraksiyonlarda aktivite tayini yapılmış ve 9. fraksiyonda aktivite piki elde edilmiştir. Bu fraksiyonda protein tayini de yapılarak saflaştırma katsayısı

ve verimi hesaplanmıştır (Çizelge 4.11). Enzim % 3' lük bir verimle 7,4 kat saflaştırılmıştır.

4.3.4. SDS-PAGE ve PAGE İle Enzimin Molekül Ağırlığı Tayini ve Zimogram

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonlar toplanarak enzimin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlığının saptanması için PAGE ve SDS-PAGE yapılmıştır (Şekil 4.7 ve 4.8). PAGE ile elde edilen jel ikiye bölünmüş ve bir yarısı protein boyaması diğer yarısı da zimogram için kullanılmıştır. Zimogramda görüntülenen şeffaf bantın karşılığı olan protein bandı belirlenmiştir. Daha sonra SDS-PAGE yapılarak aynı bantın ve standartların Rf değerleri hesaplanmış ve standart grafik çizilmiştir (Şekil 4.9). Grafiğin denkleminde yararlanılarak enzimin moleküler ağırlığı ~ 64 kDa olarak bulunmuştur. Mikrobiyal lipazların moleküler ağırlıkları 11 kDa-76 kDa arasında değişmektedir (Castro-Ochoa *et al.*, 2005). Schmidt-Dannert *et al.* (1997) termofilik *Bacillus thermocatenulatus*'dan moleküler ağırlıkları 16 ve 43 kDa olan iki lipaz saflaştırmışlardır. Castro-Ochoa *et al.* (2005) termoalkalofilik *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazının 11 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu ve bu lipazın bakteriyal lipazlar arasında bilinen en küçük lipaz olduğunu bildirmişlerdir. Bunun dışında *Bacillus subtilis* 168 lipazının 19 kDa (Lesuisse, *et al.*, 1993), *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 lipazının 27,1 kDa (Ogino, *et al.*, 2000), *Pseudomonas fluorescens* HU380 lipazının 64 kDa (Kojima ve Shimizu, 2003), *Bacillus cereus* C71 lipazının 42 kDa (Chen, *et al.*, 2007), *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 metallolipazının 74,8 kDa (Chakraborty ve Raj, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipazının 60 kDa (Gaur, *et al.*, 2008) ve *Serratia marcescens* ECU1010 lipazının 65 kDa (Zhao, *et al.*, 2008) moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 4.10 Amonyum sülfat çöktürme basamakları

Amonyum sülfat (%)	Fraksiyon	Total hacim (mL)	Total Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	Total Protein (mg/mL) (ORT. ± S.H.)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ORT. ± S.H.)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
	Ham ekstrakt	10	1249,42 ± 27,61	25,03 ± 0,58	49,92 ± 0,33	1	100
20	P1	1,5	21,15 ± 0,24	1,26 ± 0,05	16,93 ± 0,88	0,34	1,69
40	P2	1,5	314,54 ± 1,81	3,35 ± 0,17	94,46 ± 4,14	1,89	25,17
60	P3	1,5	463,93 ± 14,78	8,10 ± 0,82	58,06 ± 3,91	1,16	37,13
70	P4	1,5	11,75 ± 0,05	2,00 ± 0,02	5,87 ± 0,06	0,12	0,94
70 süpernatantı	S4	9	23,23 ± 0,72	1,50 ± 0,13	15,69 ± 1,35	0,31	1,86

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H. :** Standart hata

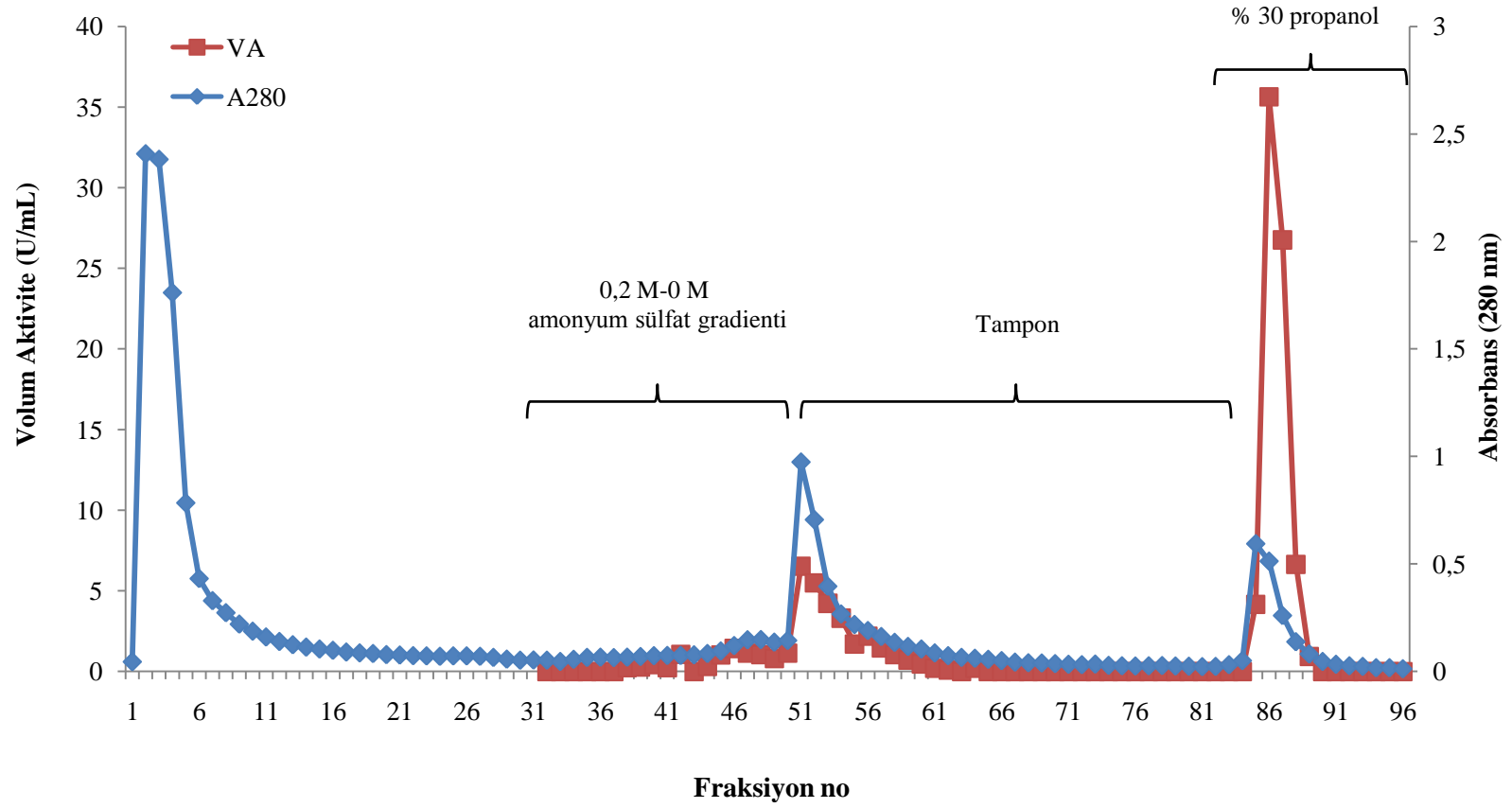
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)

Çizelge 4.11. *A. flavithermus* HBB 134 lipazının saflaştırma adımları

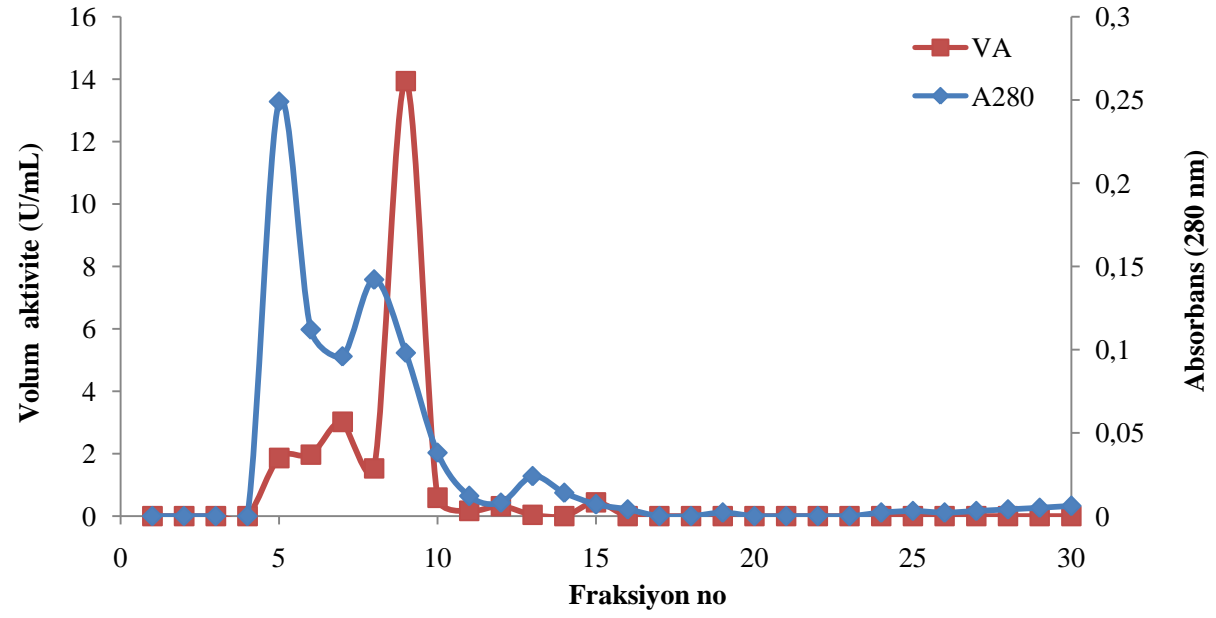
Fraksiyon	Total hacim (mL)	Volum Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	Total Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	Protein (mg/mL) (ORT. ± S.H.)	Total Protein (mg/mL) (ORT. ± S.H.)	Spesifik Aktivite (U/mg) (ORT. ± S.H.)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Ham ekstrakt	40	82,97 ± 1,21	2489,03 ± 36,26	1,61 ± 0,01	48,44 ± 0,27	51,38 ± 0,73	1	100
Diyalizat	3,9	417,54 ± 16,83	2045,94 ± 82,47	6,51 ± 0,07	31,88 ± 0,34	64,14 ± 2,03	1,2	82
Fenil sefaroza CL4B (86-87)	3	174,34 ± 2,35	523,03 ± 7,05	0,63 ± 0,01	1,88 ± 0,03	279,17 ± 7,60	5,4	21
Sefadeks G-100 (9)	5	13,91 ± 0,07	69,53 ± 0,35	0,04 ± 0,0003	0,18 ± 0,002	378,35 ± 1,57	7,4	3

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H. :** Standart hata

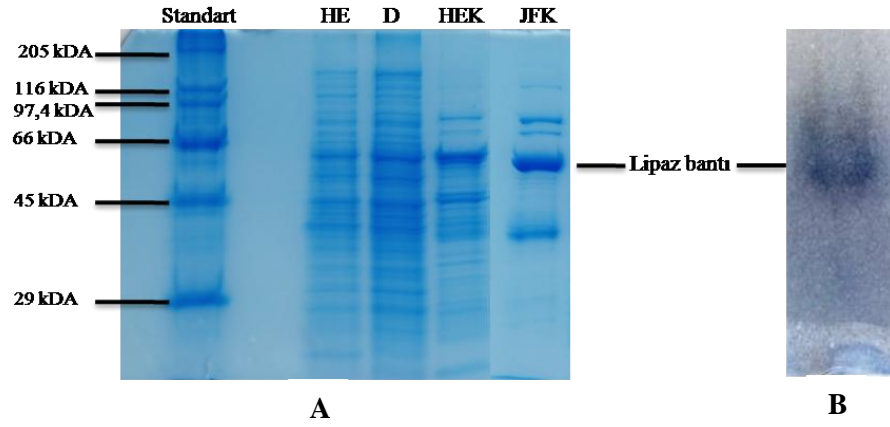
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



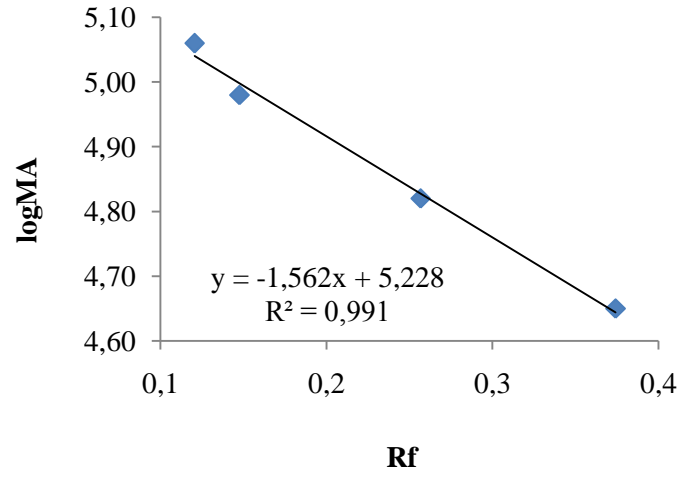
Şekil 4.5 Hidrofobik etkileşim kromatografisi



Şekil 4.6 Jel filtrasyon kromatografisi



Şekil 4.7 Lipazın SDS-PAGE ile molekül ağırlığı tayini (A) ve zimogram ile görüntülenmesi (B); **HE**: ham ekstrakt; **D**: diyalizat; **HEK**: hidrofobik etkileşim kromatografisinden elde edilen fraksiyon; **JFK**: jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen fraksiyon



Şekil 4.8 SDS-PAGE protein standart eğrisi

4.4. ENZİMİN KARAKTERİZASYONU

Saflaştırma adımlarının sonuncusu olan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonun verimi çok düşük olduğu için enzimin karakterizasyon çalışmaları hidrofobik etkileşim kromatografisinden elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimle gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Enzim Aktivitesi Ve Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine pH'nın etkisi incelenmeden önce p-nitrofenolün farklı pH'lardaki molar absorptans katsayıları belirlenmiştir. Bunun için p-nitrofenolün pH 5,00-11,90 arasındaki tamponlarda 0,01-0,05 M arası çözeltileri hazırlanmış ve 410 nm'de absorptansları okunmuştur. Daha sonra absorptansa karşı konsantrasyon grafiği çizilerek grafiğin eğiminden molar absorptans katsayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi, substrat olarak triolein kullanılarak pH-stat yöntemi ile belirlenmiştir. Enzim pH 6,50'in altında ve 10,50'in üzerinde aktivite gösterememiştir. Enzim maksimum aktivitesini pH 9,00'da göstermiş ve bu aktivite değerinin diğerleriyle arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bununla beraber pH 9,00'un 0,5 birim altında ve üstündeki pH'larda dikkate değer bir aktivite görülmüştür (Çizelge 4.13, Şekil 4.9). Lipazların genellikle alkali pH'larda aktivite gösterdikleri bilinmektedir (Fojan, *et al.*, 2000). *Bacillus subtilis* 168'in alkali-tolerant lipazının optimum aktivitesini pH 10,00'da gösterdiği ve aktivitenin pH 10,50'in üstünde ve 6,50'in altında hızla düştüğü bildirilmiştir (Lesuisse, *et al.*, 1993). *Bacillus* sp. J 33 lipazının optimum pH 8,00-8,50 arasında (Nawani *et al.*, 1998), *Pseudomonas* sp.'den elde edilen alkali-tolerant termostabil lipazın optimum pH 9,60'da (Kulkarni ve Gadre, 1999), *Pseudomonas* sp. AG-8 lipazının optimum pH 8,00-8,50'de (Sharma, *et al.*, 2001a), *Acinetobacter* sp. RAG-1 lipazının optimum pH 9,00'da (Snellman *et al.*, 2002) *Aspergillus carneus*'dan elde edilen alkali termostabil lipazın optimum pH 9,00'da (Saxena, *et al.*, 2003b), *Bacillus thermoleovorans* CCR11'in termoalkalofilik lipazının optimum pH 9,00-

10,00 arasında (Castro-Ochoa, *et al.*, 2005), *Bacillus* sp.'den elde edilen lipolitik enzimnin optimum pH 8,50'de (Nawani, *et al.*, 2006) ve *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 lipazının optimum pH 9,00'da (Zhang *et al.*, 2009) aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 lipazının optimum aktivitesini pH 8,00'de gösterdiği ve pH 7,00'nin altında ve 9,00'un üstünde aktivitenin önemli oranda düştüğü bildirilmiştir (Chakraborty ve Raj, 2008).

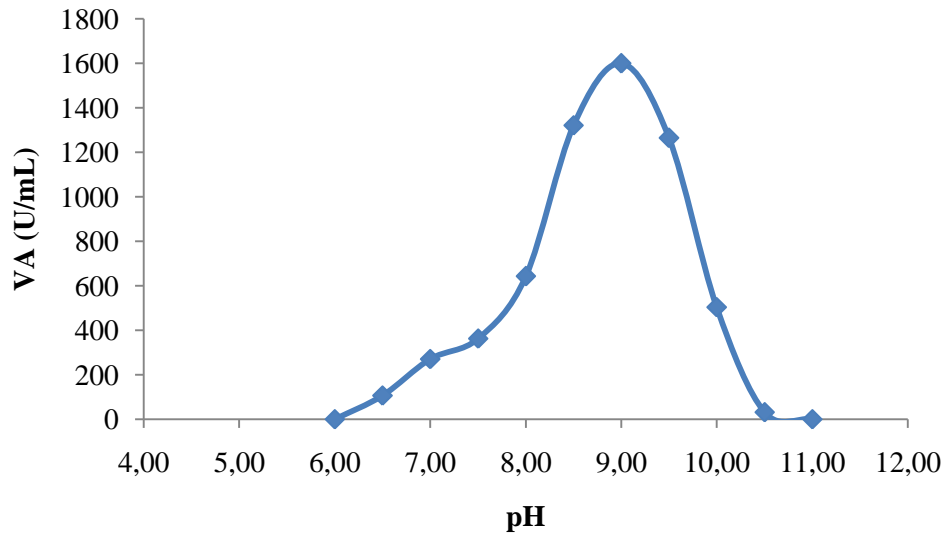
Ancak maksimum aktivitesini nötrale yakın pH'larda gösteren lipazlar da mevcuttur. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 lipazının pH 6,00-7,00 arasında (Ogino *et al.*, 2000), *Bacillus megaterium* lipazının pH 6,00'da (Lima *et al.*, 2004) ve *Acinetobacter* sp. ES-1 lipazının ise pH 7,0'de (Lee *et al.*, 2006) optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Enzimnin geniş bir pH aralığında (pH 6,00-11,00) oldukça stabil olduğu görülmüştür. pH 8,00-11,00 arasında 24 saat sonunda aktivitenin tamamen korunduğu ve bu değerlerin kontrole arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. pH 6,00 ve pH 7,00'de 6. saatten itibaren aktivitenin kontrol grubuyla arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Bununla birlikte aktivitenin en azından % 94'ten fazlası korunmuştur (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.10). Enzimnin geniş bir pH aralığında stabil olması ve özellikle alkali pH'larda stabilitesini korumuş olması nedeniyle deterjan endüstrisi için önemli bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir. HBB 134 lipazı diğer pek çok lipazdan daha geniş bir pH aralığında stabilitesini korumuştur. Örneğin, *Pseudomonas* sp. lipazı pH 5,00-9,00 arasında 2 saat sonunda aktivitesinin ancak % 70'ini (Kulkarni ve Gadre, 1999) ve *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 lipazı da pH 5,00-9,50 arasında 20 saat sonunda aktivitesinin yaklaşık % 80'ini korumuştur (Zhang *et al.*, 2009). Bunun dışında *Aspergillus carneus* lipazı pH 8,00-10,00 arasında 24 saat (Saxena, *et al.*, 2003b), *Bacillus* sp. J 33 lipazı pH 7,00-9,50 arasında 30 dakika (Nawani *et al.*, 1998), *Acinetobacter* sp. RAG-1 lipazı pH 5,80-9,00 arasında 24 saat (Snellman *et al.*, 2002) ve *Pseudomonas* sp. S5 lipazı da pH 7,00-9,00 arasında 30 dakika (Rahman *et al.*, 2005) stabilitesini koruyabilmiştir.

Bunun dışında *Bacillus sphaericus* 205y lipazının pH 5,00-13,00 arasında 30 dakika (Sulong *et al.*, 2006), *Staphylococcus aureus*'dan elde edilen lipazın ise pH 5,00-12,00 arasında 24 saat stabil kaldığı bildirilmiştir (Horchani *et al.*, 2009).

Çizelge 4.12 pNP' ün farklı pH' lardaki molar absorbans katsayıları

pH	Molar Absorbans Katsayısı ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
5,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na_2HPO_4)	0,2
5,50 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na_2HPO_4)	0,58
6,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na_2HPO_4)	1,57
6,50 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na_2HPO_4)	4,57
7,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit- Na_2HPO_4)	8,71
7,50 (Tris-HCl)	16,03
8,00 (Tris-HCl)	17,34
8,50 (Tris-HCl)	18,26
9,00 (Glisin-NaOH)	18,11
9,50 (Glisin-NaOH)	18,15
10,00 (Glisin-NaOH)	18,04
10,50 (Glisin-NaOH)	18,56
11,00 (Fosfat Tamponu- Na_2HPO_4 -NaOH))	18,14
11,50 (Fosfat Tamponu- Na_2HPO_4 -NaOH))	18,42
11,90 (Fosfat Tamponu- Na_2HPO_4 -NaOH))	18,49



Şekil 4.9 Enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi

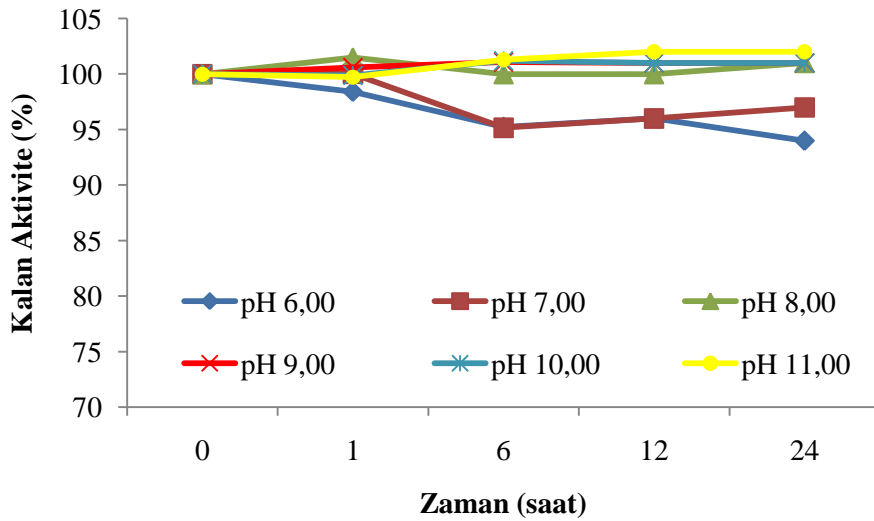
Çizelge 4.13 Enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi

pH	x	VA ($\mu\text{mol/dk.mL}$) (ORT. \pm S.H.)
6,00	a	0
6,50	b	106,61 \pm 14,97
7,00	c	270,69 \pm 21,03
7,50	c	362,76 \pm 18,29
8,00	d	642,30 \pm 15,42
8,50	e	1321,80 \pm 27,79
9,00	f	1599,87 \pm 73,74
9,50	e	1264,27 \pm 46,18
10,00	g	504,02 \pm 37,51
10,50	ab	31,28 \pm 3,04
11,00	a	0

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 4.10 Enzim stabilitesi üzerine pH' nın etkisi

Çizelge 4.14 Enzim stabilitesi üzerine pH' nın etkisi

Zaman	Kalan Aktivite (%)											
	pH 6 (ORT. ± S.H.)	x	pH 7 (ORT. ± S.H.)	x	pH 8 (ORT. ± S.H.)	x	pH 9 (ORT. ± S.H.)	x	pH 10 (ORT. ± S.H.)	x	pH 11 (ORT. ± S.H.)	x
0	100 ± 0,14	a	100 ± 0,06	a	100 ± 0,09	a	100 ± 0,28	a	100 ± 0,04	a	100 ± 0,14	a
1	98 ± 0,08	a	100 ± 0,07	a	101 ± 0,02	a	101 ± 0,13	a	100 ± 0,24	a	100 ± 0,18	a
6	95 ± 0,09	b	95 ± 0,18	b	100 ± 0,05	a	101 ± 0,07	a	101 ± 0,28	a	101 ± 0,10	a
12	96 ± 0,06	b	96 ± 0,16	b	100 ± 0,07	a	101 ± 0,03	a	101 ± 0,11	a	102 ± 0,07	a
24	94 ± 0,09	b	97 ± 0,11	b	101 ± 0,06	a	101 ± 0,08	a	101 ± 0,04	a	102 ± 0,03	a

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)

4.4.2. Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 5-95°C arasındaki sıcaklıklarda pH 8,00 olarak hazırlanan Tris-HCl tamponları kullanılarak enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Sıcaklığın 5°C'den itibaren kademeli şekilde artırılmasıyla enzim aktivitesinin de doğrusal olarak arttığı ve 50°C'de maksimuma ulaştıktan sonra 60°C'den itibaren düşüşe geçtiği görülmüştür. Maksimum enzim aktivitesi 50 °C'de görülmekle birlikte, 55°C'deki aktivite değeri de maksimum değere oldukça yakın bulunmuştur ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.15, Şekil 4.11). Bu sonuçlara göre, HBB 134 lipazı 55°C'de rahatlıkla kullanılabilir. Benzer olarak *Streptomyces rimosus* (Abramić *et al.*, 1999), *Acinetobacter* sp. RAG-1 (Snellman *et al.*, 2002), *Bacillus megaterium* (Lima *et al.*, 2004), *Bacillus sphaericus* 205y (Sulong *et al.*, 2006), *Staphylococcus aureus* (Horchani *et al.*, 2009) ve *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 (Zhang *et al.*, 2009)'den elde edilen lipazlar da maksimum aktivitelerini 55 °C'de göstermişlerdir.

HBB 134 lipazının optimum sıcaklık değeri, optimum aktivitesini 37 °C'de gösteren *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 (Ogino *et al.*, 2000) ve *Pseudomonas mendocina* PK-12CS (Jinwal *et al.*, 2003) lipazlarından, 40 °C'de gösteren *Acinetobacter* sp. ES-1 (Lee *et al.*, 2006), *Yarrowia lipolytica* (Yu *et al.*, 2007) ve *Pseudomonas aeruginosa* PseA (Gaur, *et al.*, 2008) lipazlarından, 45 °C'de gösteren *Pseudomonas* sp. S5 (Rahman *et al.*, 2005) ve *Serratia marcescens* ECU1010 (Zhao *et al.*, 2008) lipazlarından daha yüksektir. Buna karşın maksimum aktivitelerini daha yüksek sıcaklıklarda gösteren lipazlar da mevcuttur. *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Izumi, *et al.*, 1990), *Bacillus* sp. J 33 (Nawani *et al.*, 1998), *Bacillus thermoleovorans* CCR11 (Castro-Ochoa, *et al.*, 2005) ve *Bacillus* sp. (Nawani ve Kaur, 2007) lipazlarının optimum aktivitelerini 60°C'de, *Bacillus* sp. H-257'nin monoaçilgliserol lipazının ise optimum aktivitesini 75°C'de (Imamura ve Kitaura 2000) gösterdiği bildirilmiştir.

Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için enzim çözeltisi 25°C, 40°C, 50°C, 65°C, 80°C ve 95°C'lerde ve pH 9,00'da 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyon boyunca belirli aralıklarda örnekler alınarak optimum koşullarda spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin 25°C'de 24

saat boyunca aktivitesinin tamamını koruduğu ve bulunan değerlerin 0. saatle arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür. Enzimin 40°C ve 50°C sıcaklıklarda 1 saat sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin daha sonraki saatlerde düştüğü ve bu düşüşün 0. saate göre istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Bununla beraber 24 saat sonunda aktivitenin en azından % 85'inden fazlası korunmuştur (Çizelge 4.16). Enzimin bu sıcaklıklardaki yüksek stabilitesi endüstriyel işlemlerde kullanımı açısından uygun bir enzim olduğunu göstermektedir. Enzim 65°C, 80°C ve 95°C'de 1 saat sonunda aktivitesinin sırasıyla % 50, 42 ve 39'unu koruyabilmiştir (Çizelge 4.16, Şekil 4.12). HBB 134'ün bu stabilite derecesi diğer bazı bakteriyal lipazlardan daha üstündür. Örneğin, *Streptomyces rimosus*'dan elde edilen lipazın 50°C'de 30 dakika stabil kaldığı, 90°C'de ise 30 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık % 30'unu koruduğu bildirilmiştir (Abramić *et al.*, 1999). *Pseudomonas mendocina* PK-12CS'den elde edilen lipaz 45 ve 57°C sıcaklıklarda 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin sırasıyla % 50 ve 25'ini koruyabilmiştir (Jinwal *et al.*, 2003). *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazının 50-60 °C'lerde 1 saat sonunda aktivitesinin % 75'ini korurken, 70°C'de aktivitesini tamamen kaybettiği bildirilmiştir (Castro-Ochoa, *et al.*, 2005). *Pseudomonas* sp. S5 lipazının 45°C'nin altında 30 dakika boyunca stabil olduğu, 50°C'de 30 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık % 80'ini korurken, 55 °C'de 2 saat inkübasyon sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu bildirilmiştir (Rahman *et al.*, 2005). *Acinetobacter* sp. ES-1 lipazı 50°C'de 30 dakika sonunda aktivitesinin yaklaşık % 50'sini koruyabilmiştir (Lee *et al.*, 2006). *Bacillus sphaericus* 205y'nin lipazı 45°C'de 30 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin ancak yaklaşık % 50'sini (Sulong *et al.*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipazının ise 50°C'de 4 saat sonunda aktivitesinin ancak % 40'ını koruyabildiği (Gaur, *et al.*, 2008) bildirilmiştir. *Serratia marcescens* ECU1010 lipazının 50°C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin % 71'ini (Zhao *et al.*, 2008), *Staphylococcus aureus* lipazının da 60°C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin % 50'sini koruduğu bildirilmiştir (Horchani *et al.*, 2009).

Buna karşın 60°C'de 24 saat sonunda aktivitesinin % 96'dan fazlasını koruyan *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi, *et al.*, 1990) ve 60°C'de 1 saat stabil kalan

Bacillus sp. (Nawani ve Kaur, 2007) lipazları HBB 134 lipazından daha iyi bir sıcaklık stabilitesine sahiptirler.

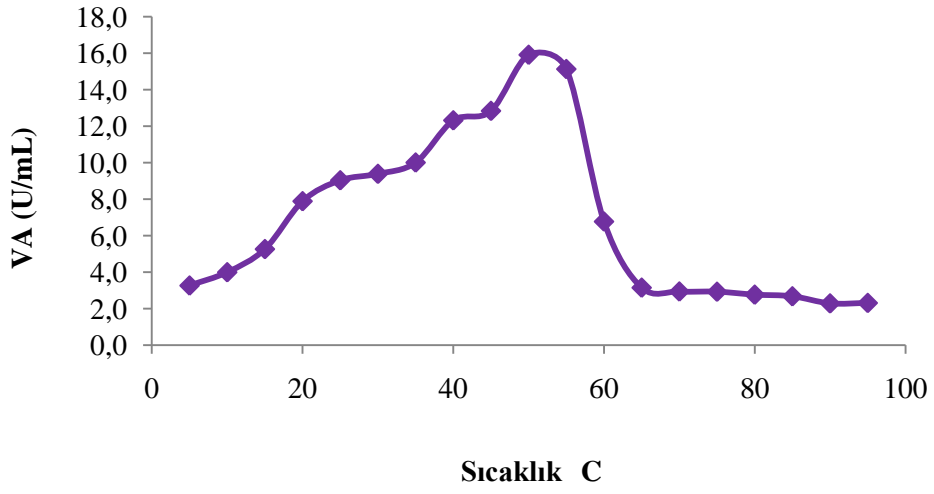
Çizelge 4.15 Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	x	VA ($\mu\text{mol/dk.mL}$) (ORT. \pm S.H.)
5	a	3,26 \pm 0,64
10	ab	3,99 \pm 0,15
15	c	5,26 \pm 0,19
20	e	7,89 \pm 0,57
25	f	9,04 \pm 0,14
30	fg	9,39 \pm 0,18
35	g	10,01 \pm 0,42
40	h	12,32 \pm 0,13
45	h	12,84 \pm 0,35
50	ı	15,92 \pm 0,33
55	ı	15,14 \pm 0,47
60	i	6,77 \pm 0,12
65	abj	3,15 \pm 0,08
70	aj	2,94 \pm 0,05
75	aj	2,92 \pm 0,02
80	aj	2,76 \pm 0,05
85	ajk	2,67 \pm 0,07
90	jm	2,28 \pm 0,04
95	jm	2,31 \pm 0,09

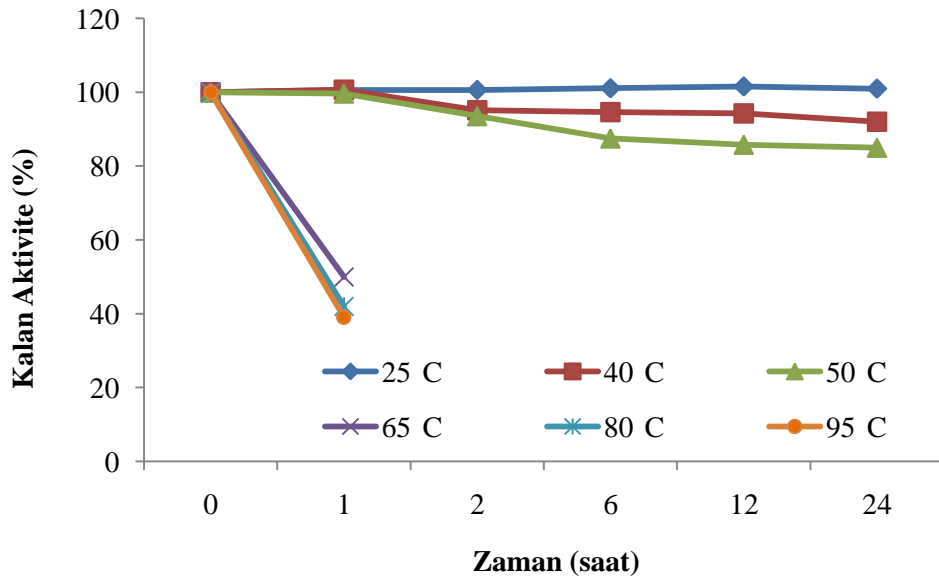
ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 4.11 Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



Şekil 4.12 Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Çizelge 4.16 Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Zaman	Kalan Aktivite (%)											
	25 °C (ORT. ± S.H.)	x	40 °C (ORT. ± S.H.)	x	50 °C (ORT. ± S.H.)	x	65 °C (ORT. ± S.H.)	x	80 °C (ORT. ± S.H.)	x	95 °C (ORT. ± S.H.)	x
0	100 ± 0,15	a	100 ± 0,12	a	100 ± 0,06	a	100 ± 0,52	a	100 ± 0,39	a	100 ± 0,16	a
1	101 ± 0,03	a	101 ± 0,01	a	100 ± 0,12	a	50 ± 0,13	b	42 ± 0,09	b	39 ± 0,15	b
6	101 ± 0,15	a	95 ± 0,23	b	87 ± 0,06	b	-		-		-	
12	102 ± 0,08	a	94 ± 0,19	b	86 ± 0,07	c	-		-		-	
24	101 ± 0,12	a	92 ± 0,12	b	85 ± 0,02	c	-		-		-	

ORT. : Her veri üç tekrarin ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)

4.4.3. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini incelemek için enzim optimum pH ve sıcaklıkta sabit substrat konsantrasyonunda farklı sürelerde inkübe edilerek aktivitesi tayin edilmiştir.

Enzim ve substrat farklı sürelerde inkübe edildiğinde oluşan ürün miktarı zamana bağlı olarak artmıştır. Bununla birlikte ilk 30 dakikalık artışın doğrusal olduğu ve 45 dakika sonundaki aktivite değeri ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.17). Bu nedenle bundan sonraki standart enzim aktivite deneyleri 30 dakikalık inkübasyonlarla yapılmıştır.

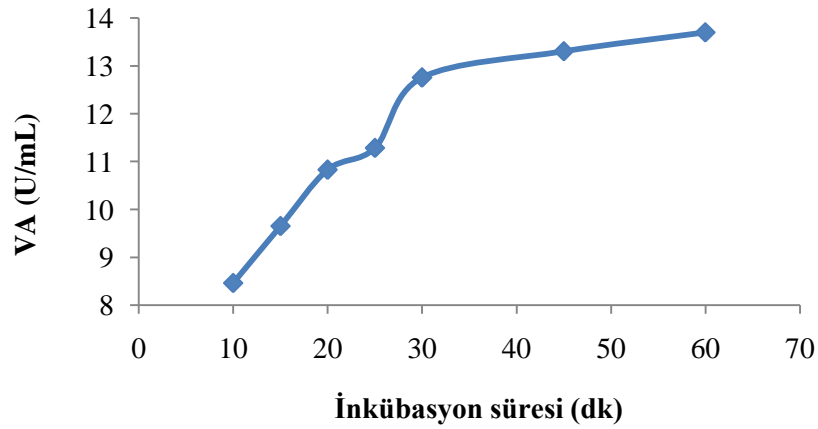
Çizelge 4.17 Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

İnkübasyon süresi	x	VA ($\mu\text{mol/dk.mL}$) (ORT. \pm S.H.)
10	a	8,46 \pm 0,41
15	b	9,65 \pm 0,06
20	c	10,83 \pm 0,09
25	c	11,29 \pm 0,28
30	d	12,76 \pm 0,18
45	de	13,31 \pm 0,09
60	e	13,70 \pm 0,16

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 4.13 Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

4.4.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi optimum sıcaklık ve pH' da (50 °C ve pH 9,00) sabit inkübasyon süresinde farklı konsantrasyonlarda (5-120 µM) substrat (pNPL) kullanılarak enzim aktivitesinin ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Substrat konsantrasyonunun 5 µM'dan 80 µM'a kadar kademeli olarak artırılmasıyla birlikte enzim aktivitesinin de arttığı ve bu değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Substrat konsantrasyonu 80 µM'dan 120 µM'a kadar artırıldığında ise enzim aktivitesindeki artışın durduğu görülmüş ve bu değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır (çizelge 4.18, şekil 4.14).

Enzimin maksimum hızı (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabiti (K_m) Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiği $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak çizilmiştir (Şekil 4.15). Bu grafiğin doğru denklemi $y = 0,167x + 0,002$ ve tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise 0,989 olarak bulunmuştur. Denklemin dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0,002$ değerini verdiğinden, V_{max} değeri 500 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Doğrunun yatay eksenini kestiği nokta ise, $-1/K_m = -0,1198$ olup K_m değeri 83,47 µM olarak bulunmuştur. HBB 134'ün K_m değeri daha önce yapılan bazı çalışmalarda elde edilen K_m değerlerinden çok daha düşük bulunmuştur. Bu durum enzimin bu substrata karşı spesifitesinin diğerlerine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Substrat olarak pNPL kullanıldığında, *Bacillus* sp.'den elde edilen lipazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,5 mM ve 0,139 µM/min/mL (Nawani, *et al.*, 2006), diğer bir *Bacillus* sp. lipazının K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,19 mM ve 0,032 µM/min/mL (Nawani ve Kaur, 2007) ve bir maya olan *Rhodotorula glutinis*'den elde edilen lipazın K_m değeri ise 0,7 mM olarak bildirilmiştir (Hatzinikolaou, *et al.*, 1999).

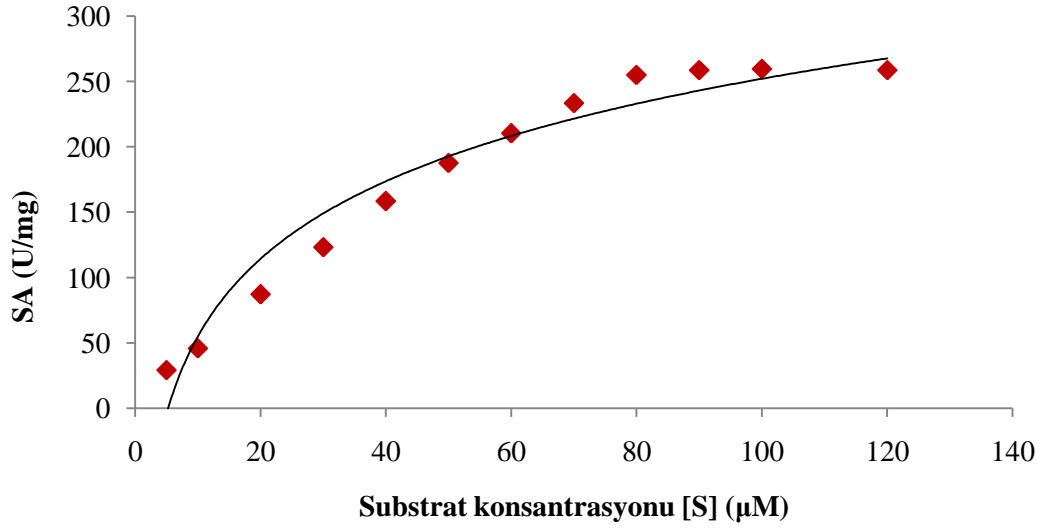
Çizelge 4.18 Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Substrat konsantrasyonu (μM)	x	SA ($\mu\text{mol/dk.mg}$) (ORT. \pm S.H.)
5	a	29,27 \pm 1,11
10	b	45,87 \pm 1,18
20	c	87,14 \pm 2,43
30	d	123,19 \pm 1,51
40	e	158,35 \pm 1,21
50	f	187,59 \pm 1,61
60	g	210,33 \pm 2,00
70	h	233,46 \pm 2,60
80	i	254,99 \pm 1,91
90	i	258,60 \pm 2,36
100	i	259,71 \pm 1,28
120	i	258,60 \pm 1,48

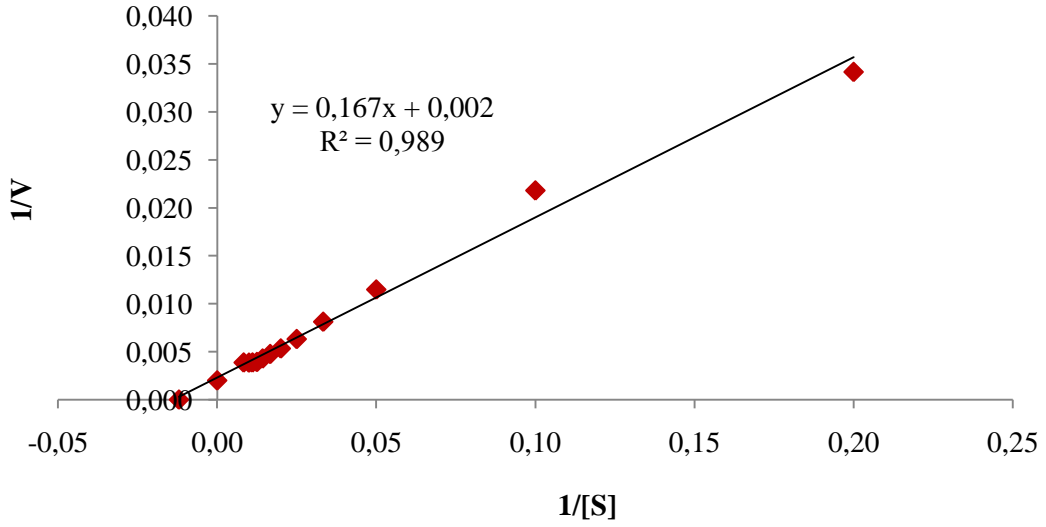
ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 4.14 Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten grafiği)



Şekil 4.15 Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

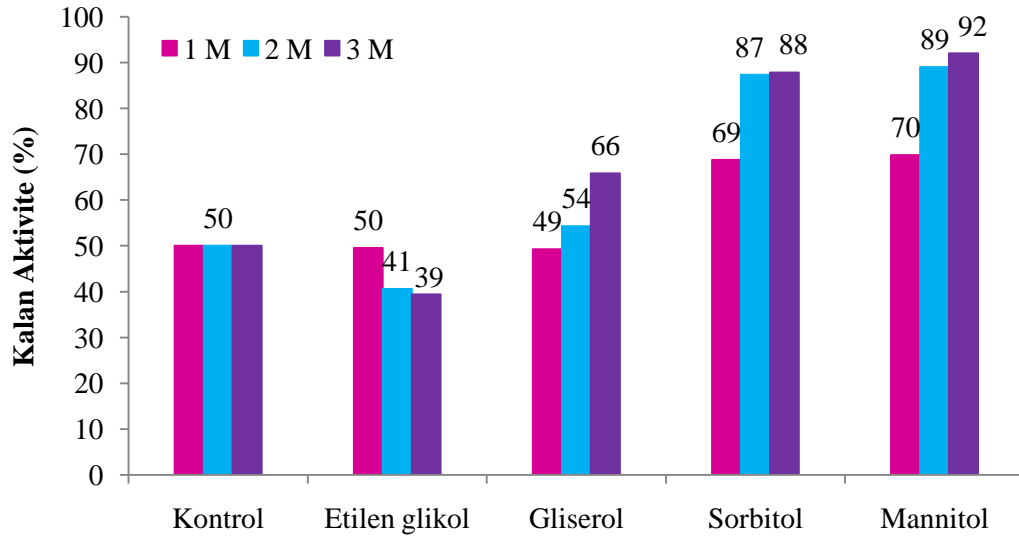
4.4.5. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi

Enzimin sıcaklık stabilitesini artırmak amacıyla çeşitli polihidrik alkollerin (etilen glikol, gliserol, sorbitol, mannitol) etkisi incelenmiştir. Enzim 1,0 M, 2,0 M ve 3,0 M konsantrasyonlarda polihidrik alkol içeren pH 9,00 glisin-NaOH tamponunda 65 °C’de 1 saat inkübe edilmiş ve kalan aktiviteleri 0. saate göre % değer olarak belirlenmiştir. Hiçbir katkı içermeyen enzimin de aynı koşullarda aktivitesi tayin edilmiş ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Kontrol grubu 65 °C’de 1 saat sonunda aktivitesinin % 50’sini koruyabilmiştir. Etilen glikolün (2 –OH grubu) stabiliteyi artırıcı bir etkisi gözlenmemiştir. Gliserol (3 –OH grubu) 3,0 M konsantrasyonda kullanıldığında kalan aktivite % 66’ya çıkmıştır. Sorbitol (6 –OH grubu) ve mannitolün (6 –OH grubu) de artan konsantrasyonlarında kalan aktivite değerlerinin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Sorbitol ve mannitol 3,0 M konsantrasyonda kullanıldıklarında aktivitenin sırasıyla % 88 ve % 92’si korunmuştur ve mannitolün 0. saatle arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.19, Şekil 4.16). Polihidrik alkollerin hidroksil grubu sayısı arttıkça stabiliteyi de daha çok artırdığı gözlenmiştir.

Aynı sayıda hidroksil grubu içeren sorbitol ve mannitol ile elde edilen sonuçların çok benzer çıkması bu görüşü desteklemektedir.

Bacillus sp. J33 (Nawani ve Kaur, 2000), *Bacillus stearothermophilus* MC 7 (Kambourova, et al., 2003), *Rhizomucor miehei* (Noel ve Combes, 2003) ve *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 (Chakraborty ve Raj, 2008)'den elde edilen lipazlarla da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Nawani ve Kaur (2000), dielektrik katsayısı suyunkinden düşük olan çözeltilerin dielektrik katsayılarının düştüğü oranda (su 78, gliserol 42, etilen glikol 37 ve sorbitol 33,5) enzimin termostabilitesini artırdığını bildirmişlerdir. Bu çözeltilerin proteinlerin tersiyer yapılarının korunmasında çok önemli olan hidrofobik etkileşimleri kuvvetlendirdikleri ve böylece daha yüksek sıcaklıklarda enzimin yarı ömrünü artırdıkları bildirilmiştir (Nawani ve Kaur, 2000). Chakraborty ve Raj (2008) ise enzim stabilitesinin, polihidrik alkollerdeki serbest hidroksil (-OH) grubu sayısı ile doğru orantılı olarak arttığını yani daha fazla hidroksil grubu içerenlerin stabiliteyi daha çok artırdığını söylemişlerdir.



Şekil 4.16 Enzimin sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi

Çizelge 4.19 Enzimin sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi

		Konsantrasyon (M)	Kalan Aktivite (%)									
			Kontrol (ORT. ± S.H.)	x	Etilen glikol (ORT. ± S.H.)	x	Gliserol (ORT. ± S.H.)	x	Sorbitol (ORT. ± S.H.)	x	Mannitol (ORT. ± S.H.)	x
Zaman (saat)	0	1,0 M	100 ± 0,15	a	100 ± 0,11	a	100 ± 0,11	a	100 ± 0,17	a	100 ± 0,13	a
	1	1,0 M	50 ± 0,13	b	50 ± 0,09	b	49 ± 0,04	b	69 ± 0,09	b	70 ± 0,07	b
	0	2,0 M	100 ± 0,15	a	100 ± 0,13	a	100 ± 0,19	a	100 ± 0,62	a	100 ± 0,09	a
	1	2,0 M	50 ± 0,13	b	41 ± 0,13	b	54 ± 0,13	b	87 ± 0,15	b	89 ± 0,05	b
	0	3,0 M	100 ± 0,15	a	100 ± 0,26	a	100 ± 0,28	a	100 ± 0,12	a	100 ± 0,46	a
	1	3,0 M	50 ± 0,13	b	39 ± 0,14	b	66 ± 0,15	b	88 ± 0,11	b	92 ± 0,57	a

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)

4.4.6. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisini belirlemek için organik çözücüler enzimle final konsantrasyonları % 10 ve % 50 olacak şekilde karıştırılmış ve 50 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Hiçbir organik çözücü içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir.

Lipaz aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisinin lipazdan lipaza değiştiği iyi bilinmektedir (Rahman, *et al.*, 2005; Zhao, *et al.*, 2008). HBB 134 lipazının bütanol, ksilol ve toluen dışındaki organik çözücülerin düşük konsantrasyonlarına karşı aktivitesinin en azından % 75'ini koruduğu görülmüştür. Aseton ve etil asetat % 10'luk konsantrasyonda, dietileter ise hem % 10 hem de % 50'lik konsantrasyonda enzimle muamele edildiğinde aktivitenin tamamının korunduğu ve bu değerler ile kontrol arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.20, Şekil 4.17). HBB 134 lipazının bu çözücülerle gerçekleştirilecek çeşitli organik sentezlerde potansiyel bir kaynak oluşturduğu söylenebilir. Bunun dışında, metanol, DMSO, hekzan, siklohekzan ve benzenin %10'luk konsantrasyonunda enzim aktivitesinin en azından % 90'ı korunmuştur.

Lipazların organik çözücüler karşısındaki hassasiyetleri farklılık göstermektedir. Ancak, Nawani *et al.* (1998) tarafından bildirildiğine göre Klivanov (1986) genel olarak suyla karışan polar çözücülerin suyla karışmayan çözücülere göre stabiliteyi daha çok azalttığını söylemiştir. Bu görüşü destekleyen çalışmalar mevcuttur. *Bacillus* sp. J 33 lipazı suyla karışan organik çözücüler karşısında aktivitesinin yaklaşık yarısını kaybederken benzen ve hekzan gibi suyla karışmayan organik çözücüler tarafından aktive edilmiştir (Nawani *et al.*, 1998). Benzer şekilde *Rhizopus oryzae* lipazı siklohekzan, hekzan ve bütanol gibi suyla karışmayan organik çözücüler karşısında oldukça stabil iken, aseton ve kısa zincirli alkoller (metanol, etanol ve propanol) gibi suyla karışan organik çözücüler tarafından denatüre edilmiştir (Hiol *et al.*, 2000). *Bacillus* sp. lipazının benzen ve hekzan tarafından

büyük oranda stimüle edildiği buna karşın etanol, metanol ve propanolün yaklaşık % 40 inaktivasyona yol açtığı bildirilmiştir (Nawani ve Kaur, 2007).

Ancak bu görüşlere uymayan çalışmalar da vardır. *Bacillus thermoleovorans* CCR11'den elde edilen lipazın suyla karışan organik çözücüler karşısında yüksek bir stabilite gösterdiği buna karşın bütanol karşısında aktivitesini tamamen kaybettiği bildirilmiştir (Castro-Ochoa, *et al.*, 2005). *Aspergillus niger* MYA 135 lipazının da suyla karışan organik çözücüler karşısında aktivitesinin yaklaşık % 70'ini korurken suyla karışmayan organik çözücülerle aktivitede düşüş olduğu bildirilmiştir (Romero *et al.*, 2007). *Pseudomonas fluorescens* JCM5963'den elde edilen lipazın suyla karışan organik çözücülerle aktive olduğu buna karşın sikloheksan, kloroform ve benzen gibi suyla karışmayan organik çözücüler karşısında enzimin farklı oranlarda inaktive olduğu bildirilmiştir (Zhang *et al.*, 2009).

HBB 134 lipazıyla yapılan bu çalışmada organik çözücünün çözünürlüğü ile lipazın stabilitesi arasında belirgin bir korelasyon olmadığı görülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 (Ogino, *et al.*, 2000) ve *Bacillus megaterium* (Lima *et al.*, 2004) lipazları ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

4.4.7. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi

İnhibe edici ajanlar ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin inhibitörü olan PMSF, SH-grubu (tiyol grubu) inhibitörü olan β -merkaptoetanol, SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan DTT, triptofan inhibitörü olan NBS, bir asetilkolin esteraz inhibitörü olan eserin, karboksil grubu inhibitörü olan CMC ve protein denatürantları olan üre ve SDS final konsantrasyonları 1mM ve 5mM olacak şekilde deney ortamına eklenmiş ve 50 °C'deki su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. Hiçbir inhibitör veya denatürant içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.21, Şekil 4.18).

Çizelge 4.20 Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

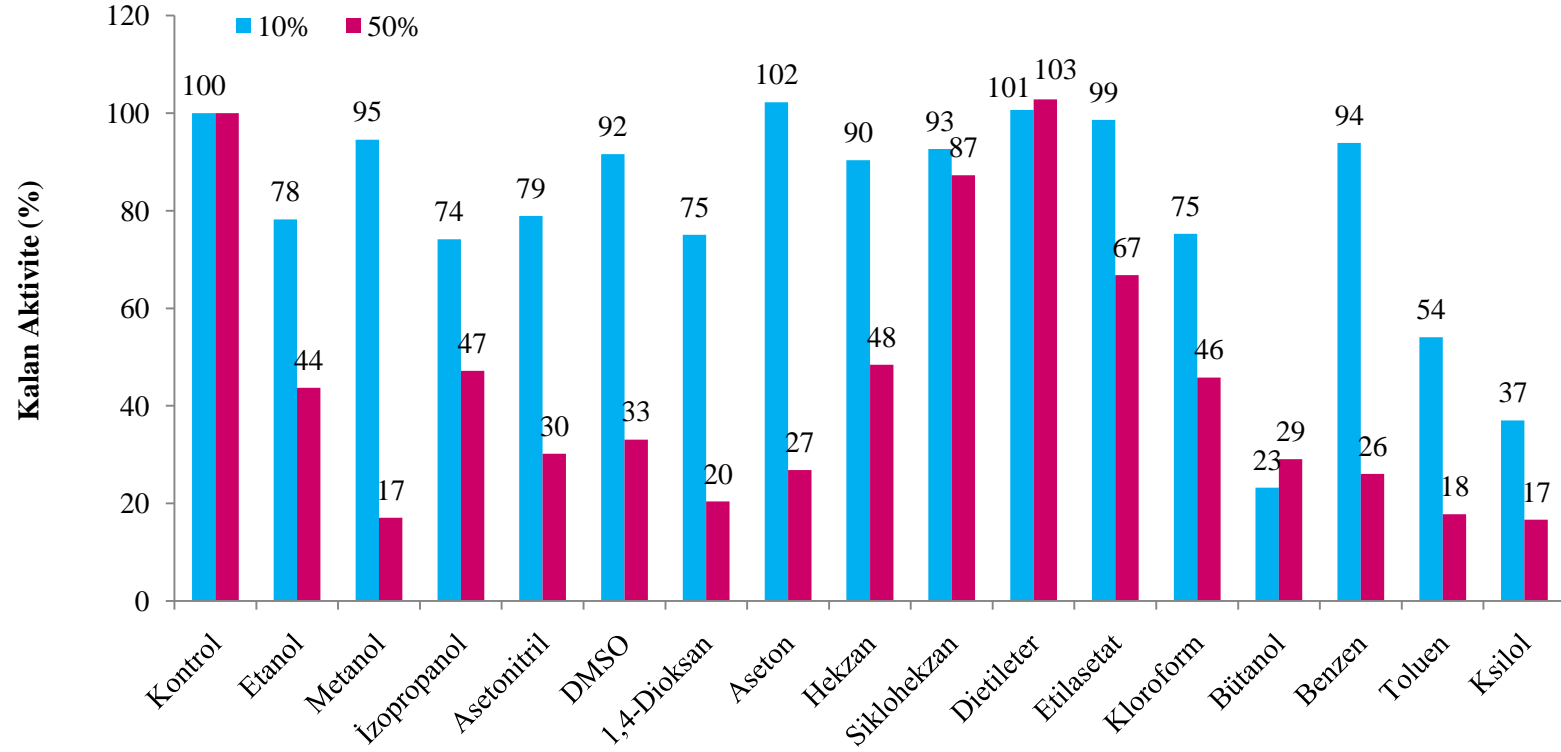
Organik Çözücü	Kalan Aktivite (%)			
	% 10 (ORT. ± S.H.)	x	% 50 (ORT. ± S.H.)	x
Kontrol	100 ± 0,17	a	100 ± 0,016	a
Etanol	78 ± 0,05	b	44 ± 0,29	b
Metanol	95 ± 0,21	b	17 ± 0,11	b
İzopropanol	74 ± 0,12	b	47 ± 0,08	b
Asetonitril	79 ± 0,11	b	30 ± 0,09	b
DMSO	92 ± 0,11	b	33 ± 0,13	b
1,4-Dioksan	75 ± 0,16	b	20 ± 0,02	b
Aseton	102 ± 0,04	a	27 ± 0,04	b
Hekzan	90 ± 0,04	b	48 ± 0,05	b
Sikloheksan	93 ± 0,14	b	87 ± 0,03	b
Dietileter	101 ± 0,13	a	103 ± 0,06	a
Etilasetat	99 ± 0,08	a	67 ± 0,17	b
Kloroform	75 ± 0,17	b	46 ± 0,09	b
Bütanol	23 ± 0,05	b	29 ± 0,04	b
Benzen	94 ± 0,16	b	26 ± 0,13	b
Toluen	54 ± 0,23	b	18 ± 0,11	b
Ksilol	37 ± 0,06	b	17 ± 0,12	b

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)

Enzimin NBS ile büyük oranda inhibe olduğu ve aktivitesinin yaklaşık olarak % 70'ini kaybettiği görülmüştür. Bu sonuç enzimin aktif merkezinde katalizden sorumlu bir triptofan amino asidinin olabileceğini düşündürmektedir. NBS'den sonra en büyük inhibisyon bir protein denatüranti olan SDS kullanıldığında görülmüştür. SDS 1 mM konsantrasyonda % 61'lik bir inhibisyona yol açarken 5 mM konsantrasyonda % 43 oranında inhibisyon görülmüştür. *Pseudomonas aeruginosa* (Singh ve Banerjee, 2007) ve *Yarrowia lipolytica* (Yu *et al.*, 2007)'dan elde edilen lipazların da SDS tarafından inhibe oldukları bildirilmiştir. Diğer bir protein denatüranti olan üre ise çok fazla bir inhibisyona yol açmamıştır. Benzer olarak *Bacillus sp.*'nin lipazının da SDS tarafından inhibe olurken, üre karşısında aktivitesini



Şekil 4.17 Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

koruduğu bildirilmiştir (Nawani *et al.*, 2006). *Geobacillus* sp. *TW1* lipazının ise SDS karşısında aktivitesini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir (Li ve Zhang, 2005).

PMSF 1 mM konsantrasyonda yaklaşık % 30 oranında inhibisyona yol açarken 5 mM konsantrasyonda yaklaşık % 75'lik bir inhibisyona neden olmuştur. Bu sonuç enzimin aktif merkezinde triptofanın yanında serin amino asidinin de olabileceğini düşündürmektedir. Esterazlar ve lipazların çoğu merkez aktif bölgelerinde bir serin amino asidi içermektedirler (Fojan *et al.*, 2000). Ancak lipazlar ara-yüzey aktivasyonuyla ilgili olarak aktif merkezlerini örten bir kapak yapısına sahiptirler. Bu nedenle bazı lipazlar PMSF tarafından inhibe olmaz veya çok az inhibisyon görülür (Snellman *et al.*, 2002; Li ve Zhang, 2005; Gaur *et al.*, 2008). HBB 134 lipazına benzer olarak, *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 (Hong ve Chang, 1998), *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee, *et al.*, 1999), *Bacillus licheniformis* (Nthangeni, *et al.*, 2001), *Bacillus stearothermophilus* P1 (Sinhaikul, *et al.*, 2001), *Bacillus thermoleovorans* CCR11 (Castro-Ochoa, *et al.*, 2005), *Bacillus sphaericus* 205y (Sulong, *et al.*, 2006) ve *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 (Chakraborty ve Raj, 2008) lipazlarının da PMSF tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir.

DTT, 5 mM'lık konsantrasyonunda yaklaşık % 50'lik bir aktivite kaybına yol açarken, β -merkaptöetanol ile % 30'luk bir aktivite kaybı gözlenmiştir. Bu sonuca göre, HBB 134 lipazının konformasyonunun stabilizasyonunda -SH grubundan çok S-S köprülerine ihtiyaç duyduğu söylenebilir. Benzer şekilde *Streptomyces rimosus* lipazının DTT ile kısmen inhibe olduğu (Abramić, *et al.*, 1999) bildirilmiştir. *Bacillus sphaericus* 205y (Sulong *et al.*, 2006) ve *Pseudomonas aeruginosa* PseA (Gaur *et al.*, 2008) lipazları da β -merkaptöetanol ile aktivitelerinin % 50'den fazlasını kaybetmişlerdir. *Bacillus* sp. lipazı ise β -merkaptöetanol ve DTT ile neredeyse tamamen inhibe olmuştur (Nawani *et al.*, 2006). Buna karşın *Acinetobacter* sp. RAG-1 lipazının (LipA) DTT ve β -merkaptöetanol tarafından inhibe edilmediği bildirilmiştir (Snellman *et al.*, 2002).

Karboksil grubu inhibitörü olan CMC enzim üzerinde dikkate değer bir inhibisyona yol açmamıştır. Enzimin aktif bölgesinde karboksil ucunun yer almadığını veya katalizden sorumlu olmadığını söyleyebiliriz. Asetilkolin esteraz inhibitörü olan

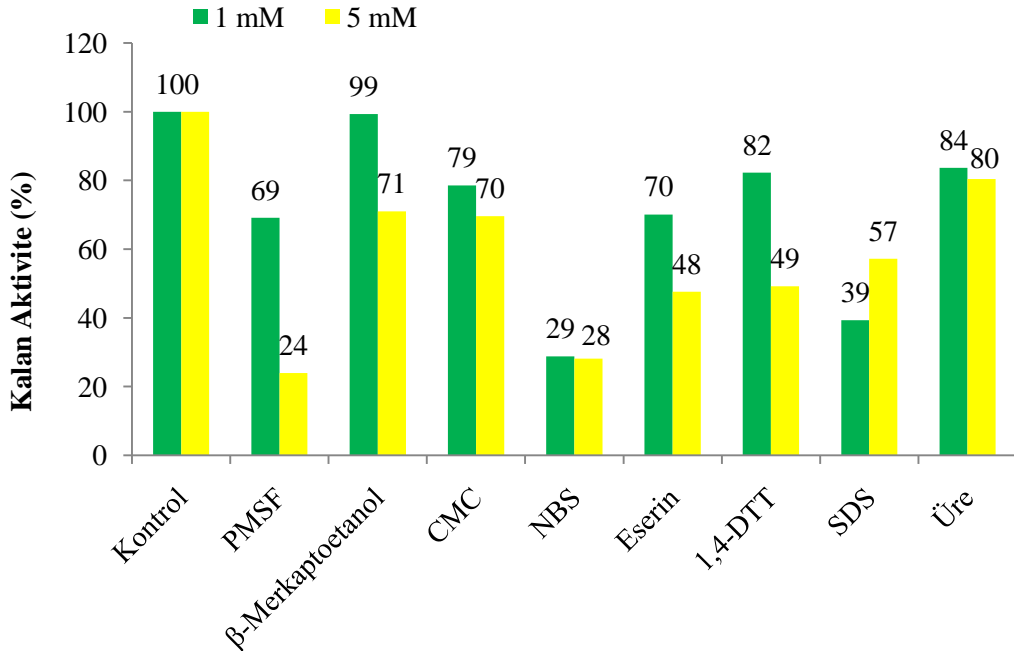
eserin 5 mM konsantrasyonda yaklaşık % 50'lik bir inhibisyona yol açmıştır. *Bacillus* sp.'den elde edilen lipazın eserin ile neredeyse tamamen inhibe olduğu bildirilmiş ve bu nedenle lipazın tercihen esteraz aktivitesine sahip olduğu ileri sürülmüştür (Nawani *et al.*, 2006).

Çizelge 4.21 Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi

İnhibitör	Kalan Aktivite (%)			
	1 mM (ORT. ± S.H.)	x	5 mM (ORT. ± S.H.)	x
Kontrol	100 ± 0,19	a	100 ± 0,19	a
PMSF	69 ± 0,21	b	24 ± 0,04	b
β-Merkaptoetanol	99 ± 0,10	a	71 ± 0,18	b
CMC	79 ± 0,10	b	70 ± 0,25	b
NBS	29 ± 0,29	b	28 ± 0,05	b
Eserin	70 ± 0,31	b	48 ± 0,08	b
DTT	82 ± 0,28	b	49 ± 0,19	b
SDS	39 ± 0,03	b	57 ± 0,12	b
Üre	84 ± 0,13	b	80 ± 0,27	b

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H. :** Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).



Şekil 4.18 Enzim aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi

4.4.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için, enzim 1 mM, 5 mM ve 10 mM final konsantrasyonlarda metal iyonları (LiCl, NaCl, KCl, NH₄Cl, MgCl₂, Na₂O₃Se, CaCl₂, BaCl₂, MnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, AlCl₃, HgCl₂, FeCl₃, PbCl₂) ve EDTA içeren deney ortamlarında 50°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. Hiçbir metal içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.22).

Li⁺, Na⁺, K⁺ ve NH₄⁺ iyonları gibi alkali metallerin veya bir değerlikli katyonların enzim üzerinde hafif bir aktivasyona yol açtığı gözlenmiştir. Bu iyonların ya enzimin yapısında bulunan negatif yüklü yan zincirlere sahip amino asitlere bağlanıp enzimin konformasyonunu değiştirerek yapısını stabilize ettiği; yada substrata bağlanarak reaksiyon için onun doğru yönelimini sağladığı düşünülmektedir. Mg⁺², Ba⁺², Ni⁺² ve Cu⁺² iyonları 1 mM konsantrasyonda enzimi sırasıyla % 8, 3, 15 ve 4 oranlarında aktive ederken 10 mM konsantrasyonda inhibisyona yol açmışlardır ve aktivitenin sırasıyla % 88, 66, 29 ve 18'i korunmuştur. Ca⁺², Mn⁺² ve Se⁺⁴ genel olarak enzimde yüksek bir inhibisyona yol açmazken Co⁺² yüksek konsantrasyonlarda enzimin yaklaşık % 50'sini inhibe etmiştir. Zn⁺², Hg⁺², Al⁺³ ve Fe⁺³ artan konsantrasyonlarda enzimde kuvvetli bir inhibisyona yol açmışlardır ve 10 mM konsantrasyonda aktivitenin sırasıyla % 23, 11, 15, ve 7'si korunabilmiştir. Pb⁺² 1 mM konsantrasyonda yaklaşık % 50 inhibisyona neden olmuştur. Kambourova *et al.* (2003)'nın bildirdiğine göre metaller tarafından inhibisyonla ilgili olarak, Lee ve Rhee (1993) iki mekanizma ileri sürmüşlerdir; ya katalitik bölge direk olarak inhibisyona uğruyor olabilir ya da metal iyonları açığa çıkan yağ asitleri ile kompleks oluşturarak onların çözünürlüklerini ve ara yüzeydeki davranışlarını değiştirerek bu inhibisyona yol açıyor olabilirler. Bunun dışında, bu metal iyonlarının enzime bağlanarak onun konformasyonunu Li⁺, Na⁺, K⁺ ve NH₄⁺ iyonlarının aksine destabilize edici yönde değiştirmiş olabileceği düşünülmektedir.

Diğer bazı çalışmalarda da lipazın Hg⁺² tarafından inhibisyona uğradığı bildirilmiştir (Gao ve Breuil, 1998; Snellman, *et al.*, 2002; Nawani *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Bunun aksine *Bacillus coagulans* BTS-3 (Kumar *et al.*, 2005) ve *Bacillus coagulans* MTCC-6375 (Kanwar *et al.*, 2006) lipazlarının Hg^{+2} ve Fe^{+3} tarafından aktivite edildiği bildirilmiştir.

EDTA 1 mM konsantrasyonda enzimde hafif bir aktivasyona yol açmıştır ve kontrole arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu aktivasyonun ortamdaki proteazların EDTA tarafından inhibisyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir. EDTA'nın 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında aktivitenin sırasıyla % 96 ve 67'si korunmuştur (Çizelge 4.22). Enzimin EDTA tarafından inhibe edilmemesi aktivitesi için bir metal iyonuna ihtiyacı olmadığını yani metalloenzim olmadığını göstermektedir. Benzer olarak *Aspergillus carneus* (Saxena *et al.*, 2003b), *Geobacillus* sp. *TW1* (Li ve Zhang 2005), *Yarrowia lipolytica* (Yu *et al.*, 2007) ve *Pseudomonas aeruginosa* PseA (Gaur *et al.*, 2008)'dan elde edilen lipazların da EDTA tarafından inhibe olmadıkları bildirilmiştir. Ancak EDTA tarafından kuvvetle inhibe edilen lipazlarla ilgili çalışmalar da mevcuttur (Dharmstithi ve Luchai, 1999; Snellman *et al.*, 2002; Kanwar *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Nawani *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008).

4.4.9. Enzim Aktivitesi Ve Stabilitesi Üzerine Deterjanların Ve Beyazlatıcıların Etkisi

Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine deterjanların ve beyazlatıcıların etkisini belirlemek amacıyla çeşitli iyonik (sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat ve sodyum dodesil sülfat), non-iyonik (n-oktil- β -D-glukopiranozit, triton X-100, tween 20, tween 80 ve brij 35) ve zwitteriyonik (CHAPS) deterjanlarla beyazlatıcılar (hidrojen peroksit ve sodyum hipoklorit) kullanılmıştır. Bunlara ek olarak ticari olarak satılan OMO, ARIEL ve PERSİL marka deterjanların etkisi de incelenmiştir.

Çizelge 4.22 Enzim aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi

Metal İyonu	Kalan Aktivite (%)					
	1 mM (ORT. ± S.H.)	x	5 mM (ORT. ± S.H.)	x	10 mM (ORT. ± S.H.)	x
Kontrol	100 ± 0,12	a	100 ± 0,12	a	100 ± 0,12	a
LiCl	102 ± 0,18	a	110 ± 0,09	b	106 ± 0,20	b
NaCl	112 ± 0,17	b	106 ± 0,14	b	104 ± 0,15	b
KCl	112 ± 0,21	b	103 ± 0,17	b	100 ± 0,13	a
NH₄Cl	105 ± 0,05	b	114 ± 0,18	b	103 ± 0,19	b
MgCl₂	108 ± 0,34	b	103 ± 0,04	a	88 ± 0,03	b
Na₂O₃Se	98 ± 0,20	a	90 ± 0,04	b	87 ± 0,09	b
CaCl₂	93 ± 0,19	b	77 ± 0,11	b	69 ± 0,08	b
BaCl₂	103 ± 0,14	a	95 ± 0,08	b	66 ± 0,04	b
MnCl₂	78 ± 0,07	b	69 ± 0,12	b	61 ± 0,20	b
CoCl₂	98 ± 0,15	a	53 ± 0,15	b	44 ± 0,09	b
NiCl₂	115 ± 0,16	b	48 ± 0,13	b	29 ± 0,05	b
ZnCl₂	69 ± 0,02	b	26 ± 0,07	b	23 ± 0,02	b
CuCl₂	104 ± 0,06	a	41 ± 0,09	b	18 ± 0,04	b
AlCl₃	71 ± 0,11	b	30 ± 0,02	b	15 ± 0,04	b
HgCl₂	44 ± 0,17	b	19 ± 0,06	b	11 ± 0,07	b
FeCl₃	55 ± 0,28	b	19 ± 0,01	b	7 ± 0,07	b
PbCl₂	49 ± 0,10	b	*	-	*	-
EDTA	111 ± 0,25	b	96 ± 0,08	b	67 ± 0,09	b

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

***:** enzim aktivitesi ölçülemedi.

Enzim aktivitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek için her birinden final konsantrasyonları % 0,1 olacak şekilde deney ortamına eklenmiş ve standart koşullarda aktivite tayin edilmiştir. Hiçbir deterjan içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.23, Şekil 4.19).

İyonik deterjanlardan sodyum deoksikolat ve sodyum taurokolat enzim aktivitesinde inhibisyona yol açmamıştır, ancak sodyum dodesil sülfat % 60'dan fazla aktivite kaybına yol açmıştır. Enzim, non-iyonik deterjan olan n-oktil-β-D-glukopiranozit, zwitter iyonik deterjan olan CHAPS ve bir beyazlatıcı olan sodyum hipoklorit karşısında aktivitesinin sırasıyla % 72, 95 ve 61'ini korumuştur. Bunlar dışındaki

deterjanlar ise enzim aktivitesinin yaklaşık % 60'dan fazla aktivite kaybına neden olmuştur (Çizelge 4.23, Şekil 4.19). HBB 134 lipazının non-iyonik deterjan n-oktil- β -D-glukopiranozit ve beyazlatıcı olarak kullanılan sodyum hipoklorit karşısında aktivitesinin % 60'dan fazlasını koruması deterjan endüstrisinde kullanımı açısından önemlidir.

Enzim stabilitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek için enzim çözeltisi % 0,1 ve % 1 oranında deterjan içeren tamponla 50 °C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda standart koşullarda aktivite tayini yapılmıştır. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.23, Şekil 4.20).

Enzim, iyonik deterjanlardan sodyum deoksikolat ve sodyum dodesil sülfatın % 0,1'lik konsantrasyonlarında aktivitesinin sırasıyla % 56 ve 44'ünü korurken % 1'lik konsantrasyonlarına karşı biraz daha stabil olduğu görülmüştür (aktivitenin sırasıyla % 62 ve 65'i korunmuştur). Bu iyonik deterjanların enzimin üç boyutlu yapısını koruyan kuvvetlerle etkileşime girerek enzimi denatüre ettiği ve bu nedenle enzimin stabilitesini koruyamadığı düşünülmektedir. Diğer yandan bu deterjanların daha yüksek konsantrasyonları karşısında geri kalan aktivite daha yüksektir. Bu durumun lipazın ara yüzey aktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu deterjanların yüksek konsantrasyonları lipazın ara yüzey alanını genişleterek substratıyla daha rahat buluşmasını sağlıyor olabilir. Ancak Mozaffar *et al.* (1994), sürfaktanların etkisinin daha geniş yüzey alanı sağlamaktan çok enzimle yağ-su ara yüzeyinde etkileşime girmeleriyle ilgili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Enzim diğer bir iyonik deterjan olan sodyum taurokolatın % 0,1'lik konsantrasyonunda aktivitesinin % 92'sini korurken % 1'lik konsantrasyonda % 73'ünü korumuştur.

Enzim non-iyonik deterjanların % 0,1'lik konsantrasyonlarında stabilitesinin % 50'den fazlasını korurken % 1'lik konsantrasyonlarında Triton X-100 dışındakilerde düşüş gözlenmiştir. Bu deterjanlardan n-oktil- β -D glukopiranozitin % 0,1'lik konsantrasyonunda aktivitenin % 93'ü korunurken % 1'lik konsantrasyonunda % 60'ı korunmuştur. Triton X-100 % 0,1'lik konsantrasyonda yaklaşık % 50'lik bir aktivite kaybına yol açarken, % 1'lik konsantrasyonda enzimin stabilitesini % 30

oranında artırmıştır. Bu deterjanın düşük konsantrasyonda enzimin stabilitesini azaltacak şekilde konformasyonunu değiştirdiği buna karşın yüksek konsantrasyonda bu konformasyonel değişikliğin stabiliteyi artırıcı yönde olduğu düşünülmektedir. Enzimin üç boyutlu yapısının açığa çıkarılması ile bu ilginç durum aydınlatılabilir. Zwitteriyonik deterjan olan CHAPS ise % 0,1'lik konsantrasyonda enzim stabilitesinde hafif bir artışa yol açarken % 1'lik konsantrasyonda % 35'lik bir düşüş gözlenmiştir. *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazının da % 1'lik Triton X-100 ile aktivitesinde hafif bir artış olduğu, buna karşın % 1 Tween 20 ve Tween 80'in enzimi tamamen inaktive ettiği bildirilmiştir (Castro-Ochoa, *et al.*, 2005). *Bacillus thermocatenuatus* lipazı da SDS, Tween 20 ve Tween 80 tarafından inaktive edilmiş, bununla beraber, Triton X-100 aktiviteyi % 80, CHAPS ise % 40 oranında artırmıştır (Rua *et al.*, 1997). *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazının non-iyonik deterjanlara karşı oldukça stabil olduğu belirlenmiş ve Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 ile orijinal aktivitenin sırasıyla % 100, 92 ve 82'sinin korunduğu bildirilmiştir. Buna karşın enzimin anyonik deterjanlara karşı daha az stabil olduğu ve deoksikolat ile aktivitenin % 54'ünün korunduğu bildirilmiştir (Sharma *et al.*, 2002). *Bacillus* sp. GK8 lipazıyla yapılan çalışmada enzimin, % 0,1'lik Brij 35, setrimid ve Triton X-100 ile aktivitesini tamamen kaybettiği, % 1'lik SDS'nin ise aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir (Dosanj and Kaur, 2002). *Bacillus* sp. J 33 lipazıyla yapılan çalışmada enzim aktivitesinin, % 0,1'lik Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 varlığında sırasıyla % 40, 20 ve 60 oranında arttığı, SDS'nin ise enzimi tamamen inaktive ettiği bildirilmiştir (Nawani *et al.*, 1998).

HBB 134 lipazı sodyum hipoklorit karşısında stabilitesini koruyamazken H_2O_2 'in % 0,1' lik konsantrasyonunda aktivitenin % 57'si korunmuştur (Çizelge 4.23, Şekil 4.20). Ticari deterjanların enzimi inaktive ettikleri gözlenmiştir. Bunun yanında ticari deterjanların enzim stabilitesi üzerine etkisi incelendiğinde % 0,1'lik konsantrasyonda aktivitenin yaklaşık % 60'dan fazlası korunmuştur (çizelge 4.24). *Staphylococcus aureus* lipazının ise % 1'lik ticari deterjanlar (Ariel, Axion, Omio Bianco) karşısında aktivitesinin tamamını korurken okside edici ajan olan H_2O_2 'in % 10'luk konsantrasyonunda aktivitesinin % 60'ını koruyarak yüksek bir stabilite gösterdiği bildirilmiştir (Horchani *et al.*, 2009).



Şekil 4.19 Enzim aktivitesi üzerine deterjanların etkisi

4.4.10. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Enzimin gerçek substratlara karşı spesifitesini belirlemek amacıyla enzimin farklı substratlara karşı aktivitesi pH-Stat yöntemi ile pH 9,00'da tayin edilmiştir. Substrat olarak triolein kullanıldığında elde edilen enzim aktivitesi 100 kabul edilmiş ve diğer substratların trioleine göre % aktiviteyi hesaplanmıştır (Çizelge 4.24, Şekil 4.21).

Lipazın çok geniş bir substrat aralığında aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte en düşük enzim aktivitesi substrat olarak triasetin ve span 40 kullanıldığında gözlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi substrat olarak Span 80 kullanıldığında elde edilmiştir. Lipaz eşit karbon zinciri uzunluğuna sahip olan triolein ve tristearin arasından tristearine karşı daha yüksek aktivite göstermiştir. Bunun sonucunda lipazın doymuş yağ asitlerini tercih ettiğini söyleyebiliriz. Lipazın kullanılan yağlar arasında en yüksek aktiviteyi doymuş yağ asidi içeriği en yüksek olan pamuk yağına karşı göstermiş olması da bu görüşü desteklemektedir (Çizelge 4.24, Şekil 4.22).

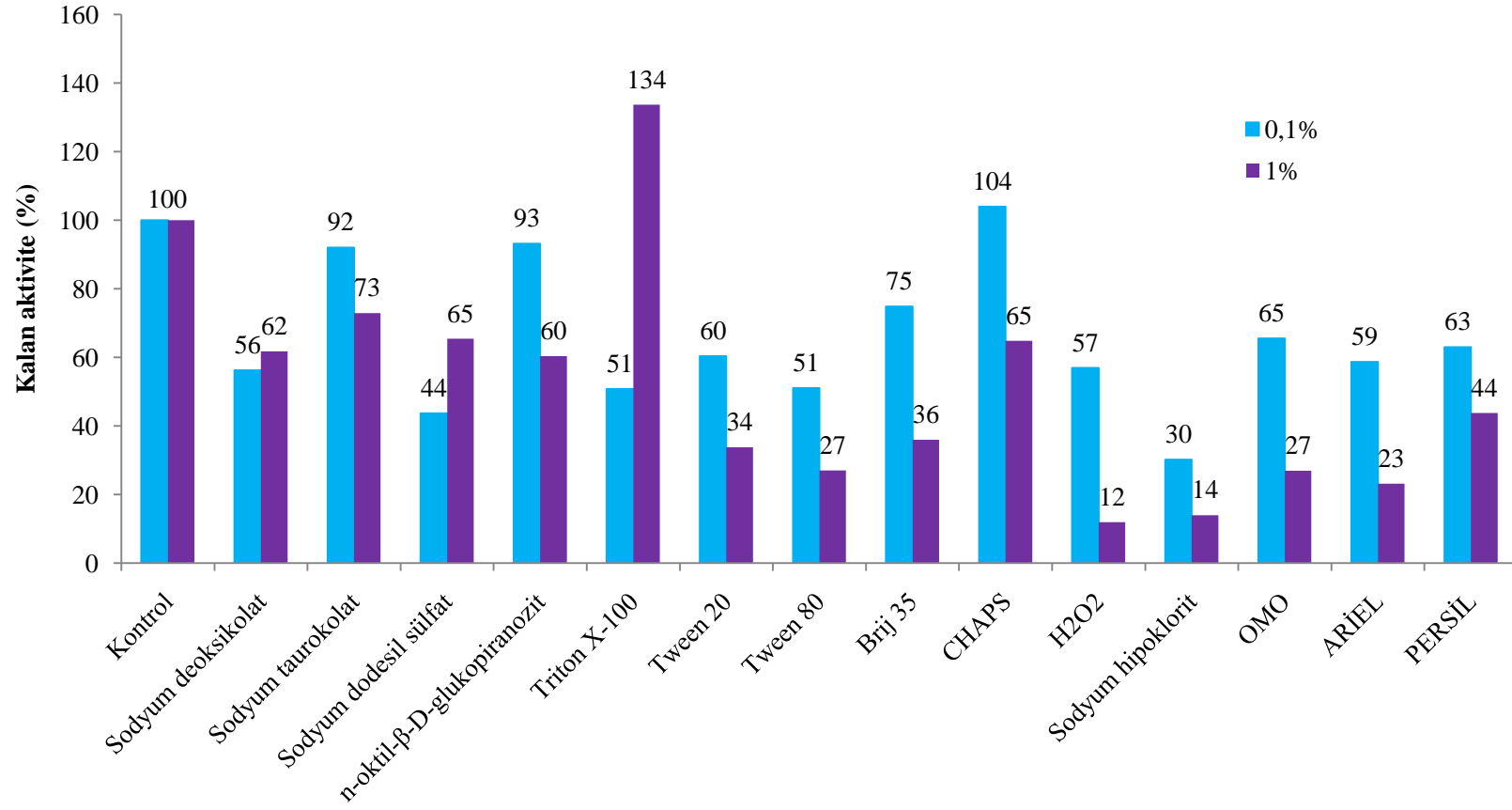
Çizelge 4.23 Enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine deterjanların ve beyazlatıcıların etkisi

	Deterjan	Konsantrasyon (%)					
		% 0,1 (aktivite)	x	% 0,1 (stabilite)	x	% 1 (stabilite)	x
	Kontrol	100 ± 0,57	a	100 ± 0,23	a	100 ± 0,28	a
İyonik deterjanlar	Sodyum deoksikolat	96 ± 0,27	b	56 ± 0,10	b	62 ± 0,21	b
	Sodyum taurokolat	103 ± 0,19	b	92 ± 0,36	b	73 ± 0,28	b
	Sodyum dodesil sülfat	36 ± 0,12	b	44 ± 0,07	b	65 ± 0,23	b
Non-iyonik deterjanlar	n-oktil-β-D glukopiranozit	72 ± 0,27	b	93 ± 0,17	b	60 ± 0,11	b
	Triton X-100	30 ± 0,19	b	51 ± 0,17	b	134 ± 0,57	b
	Tween 20	33 ± 0,14	b	60 ± 0,15	b	34 ± 0,14	b
	Tween 80	30 ± 0,04	b	51 ± 0,03	b	27 ± 0,21	b
	Brij 35	32 ± 0,06	b	75 ± 0,16	b	36 ± 0,34	b
Zwitter iyonik deterjan	CHAPS	95 ± 0,33	b	104 ± 0,37	b	65 ± 0,18	b
Beyazlatıcılar	H₂O₂	25 ± 0,16	b	57 ± 0,23	b	12 ± 0,33	b
	Sodyum hipoklorit	61 ± 0,17	b	30 ± 0,09	b	14 ± 0,01	b
Ticari deterjanlar	OMO	34 ± 0,19	b	65 ± 0,24	b	27 ± 0,15	b
	ARIEL	22 ± 0,21	b	59 ± 0,05	b	23 ± 0,11	b
	PERSİL	42 ± 0,07	b	63 ± 0,08	b	44 ± 0,11	b

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).



Şekil 4.20 Enzim stabilitesi üzerine deterjanların etkisi

HBB 134 lipazının aksine *Streptomyces rimosus* lipazının doymamış yağ asidi esterlerini hidrolizleme hızının aynı uzunluktaki doymuş yağ asidi esterlerine göre çok fazla olduğu bildirilmiştir (Lešćić *et al.*, 2001).

Enzimin yapay substratlara (p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil kaprilat, p-nitrofenil kaprat, p-nitrofenil laurat, p-nitrofenil palmitat) karşı spesifitesi spektrofotometrik olarak standart koşullarda tayin edilmiştir. Substrat olarak pNPL kullanıldığında elde edilen aktivite değeri 100 olarak kabul edilmiş ve diğer substratların pNPL'a göre % aktiviteleri hesaplanmıştır.

Lipazın yapay substratlar karşısında da geniş bir substrat spesifitesine sahip olduğu görülmüştür. En düşük enzim aktivitesi genellikle esterazların tercih ettiği bir substrat olan pNPA (% 18) kullanıldığında saptanmıştır. Enzim en yüksek aktiviteyi p-nitrofenil kaprilat karşısında göstermiştir (% 270). Bu da enzimin orta zincir uzunluğundaki substratları tercih ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.25, Şekil 4.23). Benzer şekilde *Streptomyces rimosus* (Abramić, *et al.*, 1999) ve *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 (Zhang, *et al.*, 2009) lipazlarının da en yüksek aktivitesini p-nitrofenil kaprilat (C8) karşısında gösterdiği bildirilmiştir. *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazının da orta zincir uzunluğundaki substratları tercih ederek, en yüksek aktivitesini p-nitrofenil kaprata (C10) karşı gösterdiği bildirilmiştir (Castro-Ochoa, *et al.*, 2005).

4.4.11. Enzimin Pozisyon Spesifitesinin Belirlenmesi

Trigliseritler substrat olarak kullanıldığında lipazlar trigliseritteki üç ester bağının kırılması yönünde seçicilik gösterebilmektedir. Bu özellik lipazların pozisyon spesifitesi olarak bilinmektedir. HBB-134 lipazının pozisyon spesifitesini belirlemek için enzim substrat olarak kullanılan gliseril trioleat ile optimum koşullarda muamele edilmiş ve belirli zamanlarda örnekler alınarak TLC plağında yürütülmüştür. TLC plağı iyot buharında boyanarak incelenmiş ve lipazın hidroliz ürünleri standartlar ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.23).

Çizelge 4.24 Lipazın gerçek substratlara karşı spesifitesi

Substrat	x	VA ($\mu\text{mol/dk.mL}$) (ORT. \pm S.H.)	% Aktivite
Triasetin (C2:0)	b	382,44 \pm 52,61	52
Tribütirin (C4:0)	b	575,89 \pm 34,52	78
Trikaproin (C6:0)	a	856,40 \pm 49,72	116
Trikaprin (C8:0)	b	870,51 \pm 55,59	118
Trikaprilin (C10:0)	a	829,32 \pm 21,88	112
Trilaurin (C12:0)	b	952,28 \pm 22,46	129
Trimiristin (C14:0)	b	882,13 \pm 51,81	119
Tripalmitin (C16:0)	b	869,18 \pm 30,39	118
Tristearin (C18:0)	b	945,82 \pm 51,33	128
Triolein (C18:1)	a	739,69 \pm 35,44	100
Zeytinyağı	a	828,22 \pm 10,93	112
Mısır yağı	a	729,80 \pm 10,21	99
Soya yağı	a	782,62 \pm 4,39	106
Badem yağı	a	799,67 \pm 31,69	108
Pamuk yağı	a	860,11 \pm 18,63	116
Ketentohumu yağı	b	614,26 \pm 49,59	83
Tween 20	b	1001,67 \pm 31,03	135
Tween 40	a	779,53 \pm 29,00	105
Tween 60	a	865,16 \pm 45,82	117
Tween 80	a	758,74 \pm 40,62	103
Span 20	a	781,96 \pm 7,55	106
Span 40	b	405,85 \pm 39,58	55
Span 60	a	846,44 \pm 46,61	114
Span 80	b	1073,75 \pm 43,80	145

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

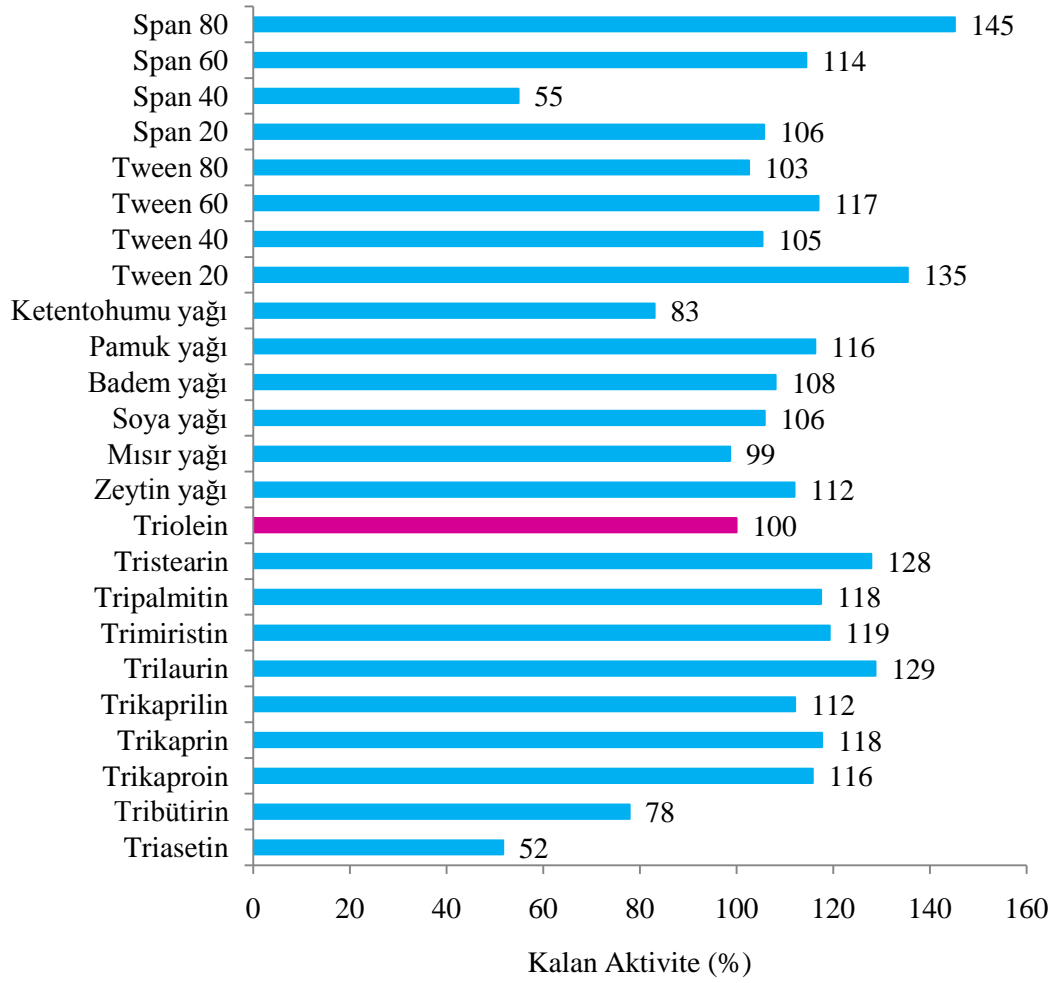
Çizelge 4.25 Lipazın yapay substratlara karşı spesifitesi

Yapay Substratlar	x	VA ($\mu\text{mol/dk.mL}$) (ORT. \pm S.H.)	% Aktivite
p-Nitrofenil asetat (C2)	b	2,33 \pm 0,06	18
p-Nitrofenil bütirat (C4)	a	12,92 \pm 0,16	100
p-Nitrofenil kaprilat (C8)	b	34,94 \pm 0,73	270
p-Nitrofenil kaprat (C10)	a	12,39 \pm 0,24	96
p-Nitrofenil laurat (C12)	a	12,94 \pm 0,14	100
p-Nitrofenil palmitat (C16)	b	9,03 \pm 0,48	70

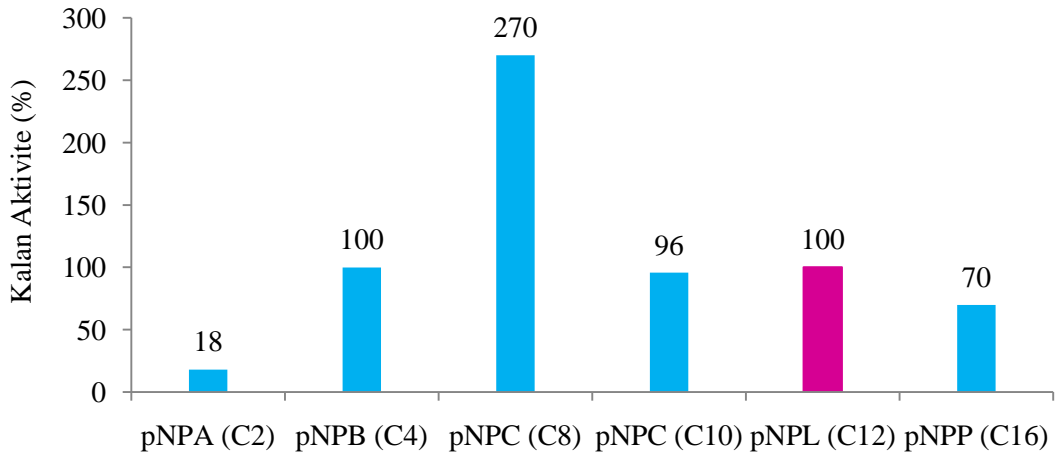
ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

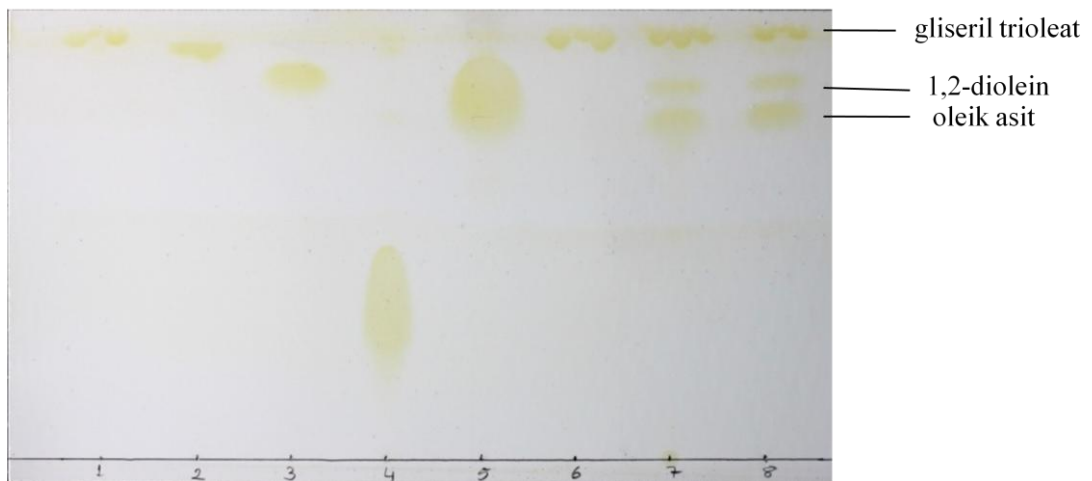


Şekil 4.21 Lipazın gerçek substratlara karşı spesifitesi



Şekil 4.22 Lipazın yapay substratlara karşı spesifitesi

Lotrakul ve Dharmstithi (1997), enzim 1,3-pozisyon spesifik ise temel hidroliz ürünü olarak 1,2(2,3)-digliserit ve 2-monogliserit oluşacağını, eğer 2-pozisyon spesifik ise 1,3-digliserit ve 1(3)-monogliserit oluşacağını söylemişlerdir. Gliseril trioleatın HBB 134 lipazıyla hidrolizi sonucu hidrolize uğramamış bir miktar gliseril trioleat bulunmakla beraber, 1,2-diolein ve oleik asitin açığa çıktığı görülmüştür. Oluşan ürünler arasında 1-monooleinin bulunmaması lipazın 1,3-spesifik lipaz olmadığını, 1,3-dioleinin ve 1(3)-monogliseritin bulunmaması da, lipazın 2. pozisyondaki ester bağına hidrolizleyemediğini göstermektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde HBB-134 lipazının trioleinin tercihen 3. pozisyondaki ester bağlarını hidrolizlediği görülmüştür. Benzer olarak *Aspergillus niger* NCIM 1207'nin lipazının da trioleini 3. pozisyondan hidrolizleyerek 1,2-diolein oluşturduğu bildirilmiştir (Mhetras, *et al.*, 2009). *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse, *et al.*, 1993), *Aeromonas sobria* LP004 (Lotrakul ve Dharmstithi, 1997), *Bacillus* sp. THL027 (Dharmstithi ve Luchai, 1999), *Penicillium camembertii* Thom PG-3 (Tan, *et al.*, 2004) lipazları gibi pek çok mikrobiyal lipazın HBB 134 lipazından farklı olarak 1,3 pozisyon spesifitesi gösterdikleri bildirilmiştir. Bunun dışında, *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 (Ogino, *et al.*, 2000), *Pseudomonas* sp. S5 (Rahman, *et al.*, 2005), *Bacillus* sp. (Nawani, *et al.*, 2006) ve *Pseudomonas aeruginosa* PseA (Gaur, *et al.*, 2008) lipazlarının triaçilgliseroldeki ester bağlarını herhangi bir spesifite göstermeden rastgele hidrolizledikleri bildirilmiştir.



Şekil 4.23 TLC ile enzimin pozisyon spesifitesinin görüntülenmesi
1; gliseril trioleat **2**; 1,3-diolein **3**; 1,2-diolein **4**; 1(3)-monoolein
5; oleik asit **6**; kontrol (enzimsiz örnek) **7**; 1 saat **8**; 6 saat

5. SONUÇ

ADÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Stokları'ndan temin edilen 201 termofilik bakteri lipolitik aktivite açısından tarandığında, 43 tanesinin lipolitik aktivite gösterdiği, bunlardan 22 tanesinin ise, lipaz aktivitesi açısından pozitif sonuç verdiği bulunmuştur. Bu taramalar sonucunda, en iyi lipaz üreticisi olarak HBB-134 seçilmiştir. HBB-134 izolatının, 16S rRNA dizi analizi sonucunda *Anoxybacillus flavithermus* olduğu belirlenmiştir.

HBB-134 bakterisinin lipaz üretimi için, kültür koşulları optimize edildiğinde en iyi lipaz üretiminin başlangıç pH'sı 6,50 olan % 0,5 pepton, % 0,5 zeytinyağı, % 0,5 gum arabic ve % 1 NaCl'den oluşan enzim üretim ortamında 45 °C'de 12 saat (log fazının ortaları) geliştirildiğinde elde edildiği saptanmıştır. Enzimin lokalizasyonu incelendiğinde büyük bir bölümünün hücre içerisinde bulunduğu belirlenmiştir.

Hücre içi enzim ham enzim kaynağı olarak kullanılarak sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi işlemlerinden geçirilmiş ve kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile molekül ağırlığının yaklaşık olarak 64 kDa olduğu bulunmuştur.

Kısmi olarak saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapıldığında, maksimum enzim aktivitesinin pH 9,00 ve 50 °C'de olduğu saptanmıştır. Enzimin geniş bir pH aralığında (pH 6,00-11,00) oldukça stabil olduğu görülmüştür. Lipazın 25-50 °C arasında aktivitesinin büyük bir kısmını koruması enzimin sıcaklık stabilitesinin iyi olduğunu göstermiştir. Lipaz enziminin pNPL için, Km değerinin 83,47 µM, Vmax değerinin ise 500 U/mg protein olduğu bulunmuştur. Polihidrik alkollerden gliserol, sorbitol ve mannitolün sıcaklık stabilitesini artırdığı ve bu artışın hidroksil grubu sayısı ile doğru orantılı olduğu gözlenmiştir. Lipazın, denenen organik çözücülerin büyük bir kısmının düşük konsantrasyonlarına karşı (% 10) aktivitesini büyük bir oranda (% 75) koruduğu, ancak çok azının yüksek konsantrasyonlarına karşı aktivitesini koruduğu görülmüştür. Enzimin NBS ve PMSF ile büyük oranda inhibe olması aktif merkezde katalizden sorumlu triptofan ve serin amino asidinin

olabileceğini düşündürmektedir. Li^+ , Na^+ , K^+ ve NH_4^+ iyonları gibi alkali metallerin veya bir değerlikli kationların enzim üzerinde hafif bir aktivasyona yol açtığı gözlenmiştir. Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Al^{+3} , Hg^{+2} ve Fe^{+3} 'in 10 mM konsantrasyonlarında aktivitenin en azından % 50'den fazlası inhibe olmuştur. Bunlar dışındaki metal iyonları aktiviteyi çok fazla inhibe etmemişlerdir. Enzimin EDTA tarafından inhibe olmaması nedeniyle bir metalloenzim olmadığını söyleyebiliriz. Deterjanlardan sodyum deoksikolat, sodyum taurokolat, n-oktil- β -D-glukopiranozit, CHAPS ve sodyum hipoklorit enzim aktivitesinde çok fazla inhibisyona neden olmazken, diğerleri yüksek oranda aktivite kaybına neden olmuşlardır. Non-iyonik deterjanlardan Triton X-100 % 1'lik konsantrasyonda enzimin stabilitesini % 34 oranında artırırken, diğerlerinde düşüş gözlenmiştir. Lipazın gerçek substratlara karşı geniş bir aralıkta aktivite gösterdiği saptanmıştır. Lipazın yapay substratlara karşı ise, en yüksek aktiviteyi p-nitrofenil kaprilat karşısında gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, HBB-134 lipazının trioleinin tercihen 3. pozisyonundaki ester bağlarını hidrolizlediği görülmüştür.

Araştırma sonucunda endüstriyel potansiyeli yüksek bir enzim elde edilmiştir. Elde edilen enzimin deterjan, kağıt, ilaç ve gıda endüstrileri gibi endüstrinin birçok alanında kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu amaçla, daha sonraki dönemlerde bu enzimin endüstriye uygulanmasına yönelik araştırmaların yapılması düşünülmektedir. Özellikle ilaç sanayisi dışındaki alanlarda kullanılan enzimin çok fazla saf olması gerekmemektedir. Çünkü enzimin saf olması maliyetinin çok yüksek olmasına neden olur. Bu da üretim maliyetini artırır. Bizim kısmi olarak saflaştırdığımız enzim birçok alanda kullanılabilir. Ancak, yine de elde edilen lipazın yukarıda özetlenen özellikleri dikkate alındığında, bu enzimin saflaştırmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle ileride bu konuda çalışmalara devam edilmesi düşünülmektedir. Enzimin endüstriyel boyutta daha fazla üretilebilmesi için, üretimden sorumlu gen bölgesini klonlama olanakları ileride yapılacak çalışmalarla araştırılacaktır. Ayrıca, enzimin elektroforezde saptanan bantları kesilerek, elde edilecek saf lipazın amino asit sekanslarının çıkarılması ve üç boyutlu yapısının aydınlatılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y.R. 2002. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. using Box-Behnken experimental design. **Biotechnology Letters**, 24: 1217-1222.
- Abramić, M., Lešćić, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W., Pigac, J. 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 25: 522-529.
- Almeida, R.V., Alqueres, S. M.C., Larentis, A.L., Rössle, S.C., Cardoso, A.M., Almeida, W.I., Bisch, P.M., Alves, T.L.M., Martins, O.B. 2006. Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 39 (5): 1128-1136.
- Almog, O., Gallagher, D. T., Ladner, J. E., Strausberg, S., Alexander, P., Bryan, P., Gilliland, G. L. 2002. Structural Basis of Thermostability: Analysis Of Stabilizing Mutations In Subtilisin BPN. **Journal Of Biological Chemistry**, 277: 27553-27558.
- Arpigny, J.L., Jaeger, K.E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem. J.** 343: 177-183.
- Başbülbül, G. 2009. Çeşitli doğal kaynaklardan izole edilen termofilik bakterilerin ürettikleri bakteriyosinlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Berto, P., Belingheri, L., Dehorter, B. 1997. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. **Biotechnology Letters**, 19 (6): 533-536.
- Bora, L., Kalita M.C. 2007. Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. LBN 4. **The Internet Journal of Microbiology**, Volum 4 Number 1.
- Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, 26: 73-81.
- Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D.A., Baratti, J.C. 2006. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 41: 21-26.

- Brush, T.S., Chapman, R., Kurzman, R., Williams, D.P. 1999. Purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 7: 2131-2138.
- Cardenas, F., Alvarez, E., Castro-Alvarez, M.S.d., Sanchez-Montero, J.M., Valmaseda, M., Elson S.W., Sinisterra J.V. 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 14: 111-123.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R.O. 2005. Screening, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, 37: 648-654.
- Chakraborty, K., Raj, R.P. 2008. An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. **Food Chemistry**, 109: 727-736.
- Chen, S.J., Cheng, C.Y., Chen, T.L. 1998. Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 86 (3): 308-312.
- Chen, S., Qian, L., Shi, B. 2007. Purification and properties of enantioselective lipase from newly isolated *Bacillus cereus* C71. **Process Biochemistry**, 42: 988-994.
- Choi, Y.J., Lee, B.H. 2001. Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 24: 59-63.
- Cihangir, N., Sarıkaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20: 193-197.
- Copeland, R.A. 2000. Enzymes A practical introduction to structure, mechanism and data analysis. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Second edition. pp. 1, New York.
- Dalmau, E., Montesinos, J.L., Lotti, M., Casas, C. 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 657-663.
- De Azeredo, L.A.I., Gomes, P.M., Sant'Anna Jr., G.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G. 2007. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, 54: 361-365.

- Dharmsthiti, S., Kuhasuntisuk, B. 1998. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 21: 75-80.
- Dharmsthiti, S., Luchai, S. 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letters**, 179: 241-246.
- Diaz, J.C.M., Rodríguez, J.A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. 2006. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 1042-1050.
- Dominguez, A., Deive, F.J., Sanroman, M.A., Longo, M.A. 2003. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 78: 1166-1170.
- Dominguez, A., Pastrana, L., Longo, M.A., Rua, M.L., Sanroman M.A. 2005. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 26: 95-99.
- Dosanj, N.S., Kaur, J. 2002. Biochemical analysis of a native and proteolytic fragment of a high molecular weight thermostable lipase from a mesophilic *Bacillus* sp. **Protein Expression and Purification**, 24: 71-75.
- Eijkman, C. 1901. Über Enzyme bei bakterien und Schimmelpilzen. **Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr**, 29: 841-848.
- Erarslan, A. 2001. Enzim saflaştırmasında temel yöntemler IV. Uygulamalı eğitim kursu. TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Grubu, 49s., Kocaeli.
- Ertuğrul, S., Dönmez, G., Takaç, S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, 149: 720-724.
- Fakhreddine, L., Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Baratti, J.C. 1998. Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strains. **Biotechnology Letters**, 20 (9): 879-883.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimic.**, 82: 1033-1041.

- Fukuda, S., Hayashi, S., Ochiai, H., Iizumi, T., Nakamura, K. 1990. Improvers for deinking of wastepaper, Japanese Patent 2,229,290.
- Gandhi, N.N. 1997. Applications of lipases. **Jaocs**, 74 (6): 621-634.
- Gao, Y., Breuil, C. 1998. Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophistoma piceae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 14: 421-429.
- Gaur, R., Gupta, A., Khare, S.K. 2008. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry**, 43: 1040-1046.
- Gulati, R., Sexana, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, W.S. 1999. Parametric optimisation of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, 35: 459-464.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 64: 763-781.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 235-251.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.001.
- Hasanuzzaman, M., Umadhay-Briones, K.M., Zsiros, S.M., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumoto, I., Okuyama, H. 2004. Isolation, identification and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. **Current Microbiology**, 49: 108-114.
- Hatzinikolaou, D.G., Kourentzi, E., Stamatis, H., Christakopoulos, P., Kolisis, F.N., Kekos, D., Macris, B.J. 1999. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: Production, partial characterization and application in the synthesis of esters. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 88 (1): 53-56.
- 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. 1998. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1. **Biotechnology Letters**, 20: 1027-1029.
- Horchani, H., Mosbah, H., Salem, N.B., Gargouri, Y., Sayari, A. 2009. Biochemical and molecular characterization of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 56: 237-245.
- Iizumi, T., Nakamura, K., Fukase, T. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. **Agric. Biol. Chem.**, 54 (5): 1253-1258.
- Imamura, S., Kitaura, S. 2000. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **J. Biochem.**, 127: 419-425.
- Jaeger, K.E., Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Reetz, M.T. 1996. Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 46: 99-105.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **TIBTECH**, 16: 396-403.
- Jinwal, U.K., Roy, U., Chowdhury, A.R., Bhaduri, A.P., Roy, P.K. 2003. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 11: 1041-1046.
- Kademi, A., Aït-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. 1999a. A thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strains. **Enzyme and Microbial Technology**, 24: 332-338.
- Kademi, A., Fakhreddine, L., Ait-Abdelkader, N., Baratti, J.C. 1999b. Effect of culture conditions on growth and esterase production by the moderate thermophile *Bacillus circulans* MAS2. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 23: 188-193.
- Kademi, A., Aït-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., Baratti, J.C. 2000. Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 10: 395-401.

- Kakariari, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. 2000. Purification and characterization of an intracellular esterase from *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* ITG 14. **Lait**, 80: 491-501.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 22: 307-313.
- Kanwar, S.S., Ghazi, I.A., Chimni, S.S., Joshi, G.K., Rao, G.V., Kaushal, R.K., Gupta, R., Punj, V. 2006. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. **Protein Expression and Purification**, 46: 421-428.
- Klibanov, A.M. 1986. Enzymatic reactions in organic media. In: Protein Engineering: Applications in Science, Medicine and Industry, Academic press, pp. 341-349, London.
- Kojima, Y., Shimizu, S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 96: 219-226.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D., Schmid, R.D. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization and preliminary x-ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**, 173: 4836-4841.
- Kouker, G., Jaeger, K.E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, 53: 211-213.
- Kösali, Y.K. 2005. A-Hidroksi ketonların enantiyoseçimli olarak biyotransformasyonla üretimi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 19s., Ankara.
- Kulkurani, N., Gadre, R., 1999. A novel alkaline, thermostable, protease free lipase from *Pseudomonas* sp. **Biotechnol. Lett.**, 21: 897-899.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., Gupta, R. 2005. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, 41: 38-44.
- Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J., Kim, D.S., Suhartono, M.T., Pyun, Y.R. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, 179: 393-400.

- Lee, K.W., Bae, H.A., Shin, G.S., Lee, Y.H. 2006. Purification and catalytic properties of novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* sp. ES-1 for hydrolysis of (*S*)-ketoprofen ethyl ester. **Enzyme and Microbial Technology**, 38: 443-448.
- Leščić, I., Vukelić, B., Majerić-Elenkov, M., Saenger, W., Abramić, M. 2001. Substrate specificity and effects of water-miscible solvents on the activity and stability of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 29: 548-553.
- Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **Eur. J. Biochem.**, 216:155-160.
- Li, C.Y., Cheng, C.Y., Chen, T.L. 2001. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, 29: 258-263.
- Li, C.Y., Cheng, C.Y., Chen, T.L. 2004. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, 19: 25-31.
- Li, H., Zhang, X. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. **Protein Expression and Purification**, 42: 153-159.
- Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Baratti, J.C., de Filippis, I., Fontana, J.D. 2004. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 31: 53-61.
- Lin, S.F., Chiou, C.M., Yeh, C.M., Tsai, Y.C. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (3): 1093-1095.
- Liu, Z., Chi, Z., Wang, L., Li, J. 2008. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, 40: 445-451.
- Lotrakul, P., Dharmsthiti, S. 1997. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal of Biotechnology**, 54: 113-120.
- Mackenzie, R.D., Blohm, T.R., Auxier, E.M., Luther, A.C. 1967. Rapid colorimetric micromethod for free fatty acids. **Journal of Lipid Research**, 8: 589-597.

- Maia, M.M.D., Heasley, A., Camargo de Morais, M.M., Melo, E.H.M., Morais Jr.M.A., Ledingham, W.M., Lima Filho, J.L. 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, 76: 23-27.
- Markossian, S., Becker, P., Markl, H., Antranikian, G. 2000. Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an icelandic hot spring. **Extremophiles**, 4: 365-371.
- Meghji, K., Ward, O.P., Araujo, A. 1990. Production, purification and properties of extracellular carboxylesterase from *Bacillus subtilis* NRRL 365. **Applied and Environmental Microbiology**, 56: 3735-3740.
- Metin, K. 2007. Moleküler Biyoloji, Protein sentezi ve yıkımı. Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. (editörler), Nobel Yayın Dağıtım, 555-576 s., Ankara.
- Mhetras, N.C., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V. 2009. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, 100: 1486-1490.
- Miles, R.J., Siu, E.L.T., Carrington, C., Richardson, A.C., Smith, B.V., Price, R.G. 1992. The detection of lipase activity in bacteria using novel chromogenic substrates. **FEMS Microbiol. Lett.** 90: 283-288.
- Mozaffar, Z., Weete, J.D., Dute, R. 1994. Influence of surfactants on an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. **JAOCs**, 71 (1): 75-79.
- Nawani, N., Dosanjh, N. and Kaur, J., 1998. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. **Biotechnol. Lett.**, 20: 997-1000.
- Nawani, N., Kaur, J. 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 206: 91-96.
- Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J. 2006. A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 290: 17-22.
- Nawani, N., Kaur, J. 2007. Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, 40 (4): 881-887.

- Noel, M., Combes, D. 2003. *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 299-308.
- Noureddini, H., Gao, X., Philkana, R.S. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresour. Technol.**, 96: 769-777.
- Nthangeni, M.B., Patterton, H.G., Tonder, A.V., Vergeer, W.P., Litthauer, D. 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme and Microbial technology**, 28: 705-712.
- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M., Ishikawa, H. 2000. Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 89: 451-457.
- Oh, B.C., Kim, H.K., Lee, J.K., Kang, S.C., Oh, T.K. 1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiology Letters**, 179: 385-392.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B.W., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman I., Schrag, J. 1992. The α/β -hydrolase fold. **Protein Eng.**, 5:197-211.
- Pereira-Meirelles, F.V., Rocho-Leão, M.H.M., Sant'Anna, G.L. 1997. A stable lipase from *Candida lipolytica*. Cultivation conditions and crude enzyme characteristics. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 63-65 (1): 73-85
- Rahman, R.N.Z.R.A., Baharum, S.N., Basri, M., Salleh, A.B. 2005. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. Strain S5. **Analytical Biochemistry**, 341: 267-274.
- Rollof, J., Hendström, S.A., Nilsson-Ehle, P. 1984. A simple turbidimetric method for specific measurement of *Staphylococcus aureus* lipase activity. **Acta path. Microbial. Immunol. Scand. Sect. B**, 92: 155-158.
- Romero, C.M., Baigori, M.D., Pera, L.M. 2007. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 76: 861-866.
- Ronimus, R.S., Parker, L.E., Morgan, H.W. 1997. The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, 47: 75-79.

- Rozzi, A., Malpei, F. 1996. Treatment and disposal of olive mill effluents. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 38: 135-144.
- Rúa, M.L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A., Schmid, R.D. 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. **Journal of Biotechnology**, 56: 89-102.
- Saisubramanian, N., Edwinoliver, N.G., Nandakumar, N., Kamini, N.R., Puvanakrishnan, R. 2006. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 33: 669-676.
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S. 2003a. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, 52: 1-18.
- Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A., Giri, B. 2003b. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, 39: 239-247.
- Schmid, R.D., Verger, R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 37: 1608-1633.
- Schmidt-Dannert, C., Rúa, M.L., Schmid, R.D., 1997. Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: screening, purification, cloning, overexpression and properties. In: Rubin, B., Dennis, E.A. (eds.), *Lipases*. Academic Press, pp. 194– 220, New York.
- Sharma, A. K., Tiwari, R. P., Hoondal G. S. 2001a. Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. **J. Basic Microbiol.**, 41:363–366.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2001b. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19: 627-662.
- Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Gupta, L.K., Gupta, J.K. 2002. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, 37: 1075-1084.
- Sigurgisladottir, S., Kanarosdottir, M., Jonsson, A., Kristjansson, J.K., Mathiasson, E. 1993. Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. **Biotechnology Letters**, 15: 361–366.

- Sinchaikul, S., Sookheo, B., Phutrakul, S., Wu, Y.T., Pan, F.M., Chen, S.T. 2001. Structural modeling and characterization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 283: 868-875.
- Singh, S., Banerjee, U.C. 2007. Purification and characterization of *trans*-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, 42: 1063-1068.
- Smibert, R.M., Krieg, N.R. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (eds), American Society for Microbiology, pp. 622, Washington.
- Snellman, E.A., Sullivan, E.R., Colwell, R.R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. **Eur. J. Biochem.**, 269: 5771-5779.
- Sulong, M.R., Raja Abd. Rahman, R.N.Z., Salleh, A.B., Basri, M. 2006. Anovel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. **Protein Expression and Purification**, 49: 190-195.
- Şengül, F., Oktav, E., Çokay, E. 2000. Zeytinyağı üretimi atıksularının arıtımı ve yan ürünlerinin değerlendirilmesi. GAP-Çevre kongresi, Bildiriler kitabı, 2. Cilt pp. 713-722, Şanlıurfa.
- Tan, T., Zhang, M., Xu, J., Zhang, J. 2004. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, 39: 1495-1502.
- Thomson, C.A., Delaquis, P.J., Mazza, G. 1999. Detection and measurement of microbial lipase activity: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 39 (2): 165-187.
- Torres, S., Baigori, M.D., Castro, G.R. 2005. Effect of hydroxylic solvents on cell growth, sporulation, and esterase production of *Bacillus licheniformis* S-86. **Process Biochemistry**, 40: 2333-2338.
- Uslan, H.A. 1997. Enzimoloji, Enzim etki mekanizmaları ve aktif merkez tayini. Telefoncu, A. (editor), Lisansüstü Yaz Okulu, 21-27 Eylül, 35-42 s., Kuşadası.
- Vieille, C., Zeikus, G. J. 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 65: 1-43.

- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. 1999. Fundamentals of biochemistry, John Wiley, New York.
- Winkler, U.K., Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.** 138: 663-670.
- Woolley P, Peterson SB. 1994. Lipases—their structure, biochemistry and applications. Cambridge Univ. Press,. pp. 103–110, Cambridge.
- Yu, M., Qin, S., Tan, T. 2007. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, 42: 384-391.
- Zaks, A., Gross, A.T. 1990. Production of monoglycerides by enzymatic transesterification, World organization patent 90,04,033.
- Zhang, A., Gao, R., Diao, N., Xie, G., Gao, G., Cao, S. 2009. Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 56: 78-84.
- Zhao, L.L., Xu, J.H., Zhao, J., Pan, J., Wang, Z.L. 2008. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. **Process Biochemistry**, 43: 626-633.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zehra Burcu BAKIR ATEŞLİER

Doğum Yeri ve Tarihi : Konya, 15.01.1979

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

- SCI

1) **Bakir Ateslier Z. B.** ve K. Metin, “Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp.,” *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 628–635 (2006).

2) Metin K., **Z. B. Bakir Ateslier**, G. Basbülbul ve H. H. Bıyık, “Characterization of esterase activity in *Geobacillus* sp. HBB-4,” *Journal of Basic Microbiology*, **46** (5), 401-410 (2006).

3) Turgut M., S. Kaplan, K. Metin, Y. B. Koca, E. Soylu, B. Sahin, **Z. B. B. Ateslier** ve H. K. Basaloglu, “Effects of constant lightness, darkness and parachlorophenylalanine treatment on tail regeneration in the lizard *Ophisops elegans macrodactylus*: Macroscopic, Biochemical and Histological Changes,” *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, **35**, 151-161 (2006).

- Diğer

1) Metin, K., M. Balkaya, A. Karul, H. Ünsal, C. Ünsal ve **Z.B. Bakır**, “Wistar ratlarında (*Rattus rattus norvegicus*) kalitatif ve kantitatif protein yetersizliklerinin iskelet kası malondialdehit düzeylerine etkileri,” *C. Ü. Fen- Edebiyat Fakültesi, Fen Bilimleri Dergisi*, **23** (2), 1-7 (2002).

2) **Z. B. B. Ateslier**, “Antifriz proteinler ve dondurulmuş gıdalarda kullanımı”, *Hasad Gıda*, **248**: 24-26 (2006).

b) Bildiriler

-Uluslar arası

- 1) Turgut M., S. Kaplan., K. Metin., Y.B. Koca., E. Soylu., B. Şahin., **Z.B.B. Ateşlier** ve H.K. Başaloğlu, “Effects of constant lightness, darkness and parachlorophenylalanine treatment on tail regeneration in the lizard *Ophisops elegans macrodactylus*: macroscopic, biochemical and histological changes,” The 4th Asian-Pacific International Congress of Anatomists (APICA), 79, KUŞADASI/AYDIN, 2005.

-Ulusal

- 1) **Bakır Ateşlier, Z. B.** ve K. Metin, “*Bacillus* sp. 4 esteraz’ının kısmi saflaştırılması ve kinetik parametrelerinin belirlenmesi,” XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 33, Adana, 2004.
- 2) **Bakır Ateşlier, Z. B.** ve K. Metin, “Termofilik *Bacillus* sp. 4’den kısmi olarak saflaştırılan esterazının karakterizasyonu,” XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 57, Adana, 2004.
- 3) **Bakır Ateşlier, Z. B.**, Ö. Arat, T. Öztürk, H. H. Bıyık ve K. Metin, “Farklı kaynaklardan izole edilen funguslarda lipolitik, amilolitik ve proteolitik enzimlerinin taranması,” 18.Ulusal Biyoloji Kongresi, 208, Kuşadası-Aydın, 2006.
- 4) Başbülbul, G., **Z. B. Bakır Ateşlier**, B. İşman, E. Poyrazoğlu, E. Oryaşın, K. Metin ve H. H. Bıyık, “Menderes nehri’ne deşarj edilen bazı fabrika arıtım tesislerinin çıkış sularının mevsime bağılı olarak mutajenitelerinin, AMES/Salmonella test sistemiyle belirlenmesi,” 18.Ulusal Biyoloji Kongresi, 227, Kuşadası-Aydın, 2006
- 5) **Z.B. Bakır Ateşlier**, G. Başbülbul, B. Bozdoğan, K. Metin, E. Oryaşın, Ö. Koç, H.H. Bıyık. “Lipolitik aktiviteye sahip termofilik bakterilerin 16S rRNA analizi ile tanılanması”. Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu. Malatya, 3-4 Mayıs 2007.
- 6) G. Başbülbul, **Z.B. Bakır Ateşlier**, B. Bozdoğan, K. Metin, Erman Oryaşın, H.Halil Bıyık. “Antimikrobiyal aktiviteye sahip termofilik bakterilerin 16S rRNA ANALİZİ İLE tanılanması.” Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu. Malatya, 3-4 Mayıs 2007.

- 7) **Z. B. Bakır Ateşlier**, G. Başbülbul, H. H. Bıyık, K. Metin. “Aydın ili ve çevresinden izole edilen termofilik bakterilerde amilolitik, proteolitik ve lipolitik aktivite taraması” XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 28-31 Ekim 2007.
 - 8) K. Metin, Ö. Koç, **Z. B. Bakır Ateşlier**, H. H. Bıyık. “*Penicillium citrinum* HBF62 Tarafından Üretilen α -Amilazın Karakterizasyonu.” 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, 23-27 Haziran 2008.
 - 9) **Z. B. Bakır Ateşlier**, Ö. Koç, K. Metin, H. H. Bıyık. “*Aspergillus foetidus* HBF 55 ekstrasellular lipazının karakterizasyonu.” 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, 23-27 Haziran 2008.
 - 10) **Z. B. Bakır Ateşlier**, K. Metin. “*Anoxibacillus* sp. HBB134 den termostabil lipaz üretimi üzerine kültür koşullarının etkisi.” 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, 23-27 Haziran 2008.
- c) Katıldığı Projeler
- 1) Alangüllü termal sularından izole edilen termofilik *Bacillus* sp. nin esteraz enziminin kısmi saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF 02006, **Araştırmacı**, 2003.
 - 2) Kalitatif ve kantitatif protein yetersizliklerinde karaciğer ve böbrekte bazı enzim düzeylerinin belirlenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF 02013, **Araştırmacı**, 2004.
 - 3) Kertenkele kalsiyum kanal antagonisti Verapamil’in kuyruk rejenerasyonu üzerine olan etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF 03011, **Araştırmacı**, 2005.
 - 4) Aydın ili evsel ve endüstriyel atık sularının mutajenik etkilerinin Ames testi ile belirlenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF 03012, **Araştırmacı**, 2006.
 - 5) Kalitatif ve kantitatif protein yetersizliklerinde endojen proteinlerin tekrar kullanımında nötrofillerin rolü. ADÜ ARAŞTIRMA FONU, VETF 02001, **Araştırmacı**, 2006

- 6) *Aspergillus flavus* HBF34'ün glukoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF 05010, **Araştırmacı**, 2007.
- 7) Farklı kaynaklardan izole edilen fungus'ların lipolitik ve amilolitik enzimlerinin taranması ve bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, ARAŞTIRMA FONU. **Araştırmacı**, 2009.
- 8) Termofilik bakterilerden bakteriyosin ve lipolitik enzim üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu, TÜBİTAK Projesi-106T581, **Araştırmacı**, 2009.
- 9) Türkiye'de yaygın olarak kesilen sığır ve koyun ırklarının karkas ve et kalitelerinin Avrupa Birliğinde uygulanan EUROP sınıflandırma sisteminde tanımlanması üzerine bir araştırma, TÜBİTAK Projesi-106O722, **Araştırmacı**, 2009.
- 10) Doğal kaynaklardan izole edilmiş termofilik bakterilerin lipolitik enzimler bakımından taranarak en iyi aktivite gösteren enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu, ADÜ ARAŞTIRMA FONU, FEF-07009, **Araştırmacı**, 2009.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2001-

İLETİŞİM

E-posta Adresi: zbakir@adu.edu.tr

Tarih: 07/09/2009