

**T.C.**  
**RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

*Geobacillus stearothermophilus* AH22 SUŞUNDAN LİPAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

**ARİFE PINAR EKİNCİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**YRD. DOÇ. DR. BARBAROS DİNÇER**

**JÜRİ ÜYELERİ**  
**PROF. DR. İLHAMİ GÜLÇİN**  
**PROF. DR. SEVGİ KOLAYLI**  
**DOÇ. DR. ADNAN YILMAZ**  
**YRD. DOÇ. DR. ÖZLEM FAİZ**

**DOKTORA TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

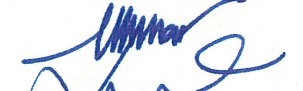




**RİZE- 2015**

**Her Hakkı Saklıdır**

**T.C.**  
**RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Geobacillus stearothermophilus* AH22 SUŞUNDAN LİPAZ ENZİMİNİN**  
**SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER danışmanlığında, Arife Pınar EKİNCİ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 23/03/2015 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

<b>Jüri Üyeleri</b>	<b>Ünvanı Adı Soyadı</b>	<b>İmzası</b>
<b>Başkan</b>	: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN	
<b>Üye</b>	: Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI	
<b>Üye</b>	: Doç. Dr. Adnan YILMAZ	
<b>Üye</b>	: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER	
<b>Üye</b>	: Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ	

  
**Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü**



## ÖNSÖZ

*Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşundan lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi amacıyla yapılan bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlandı. Ayrıca bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2010.102.02.3 nolu proje kapsamında desteklenmiştir. Bu desteğinden dolayı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Bu çalışmam süresince her türlü maddi ve manevi destek sağlayan, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmama ışık tutan, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmeye yönelik birkaç adım ileride olmamı sağlayan, danışmam hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER' e şükranlarımı sunarım.

Çalışma esnasında kullanılan *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşunu temin eden Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Sayın Ahmet ADIGÜZEL'e, Biyokimya araştırma laboratuvarında beraber çalıştığımız, çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Nimet BALTAŞ' a ve yüksek lisans öğrencisi Havva ATASEVER' e, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü hocalarıma ve değerli mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anında, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyerek bugünlere gelmemde büyük emek harcayan sevgili babam Feyyaz EKİNCİ ve annem Ülviye EKİNCİ' ye, kardeşlerim olmasından mutluluk duyduğum İlhan ve Gökhan EKİNCİ' ye, kardeşlerimin eşleri olan kardeşlerim kadar sevdiğim Gülhan ve Binnur EKİNCİ' ye ve son olarak da ailemizin yeni minik üyesi canım yeğenim Hakan Salih EKİNCİ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Arife Pınar EKİNCİ**

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Geobacillus stearothermophilus* AH22 SUŞUNDAN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 25/03/2015

Arife Pınar EKİNCİ

***Uyarı:*** Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### *Geobacillus stearothermophilus* AH22 SUŞUNDAN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Arife Pınar EKİNCİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Ana Bilim Dalı  
Doktora Tezi

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

Bu çalışmada, yeni izole edilmiş ve termofilik bir bakteri olan *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşundan endüstriyel bir enzim olan lipaz, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak kısmi olarak saflaştırıldı ve karakterize edildi. Lipaz enzimi %19.7 verimle 18.3 kat saflaştırılarak elde edildi. Kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE kullanılarak yaklaşık 26 kDa olarak belirlendi. Enzim *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat substratları varlığında karakterize edildi. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat substratları varlığında Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla belirlendi. Enzimin  $K_m$  değerleri sırasıyla 0.16, 0.02, 0.19 ve 0.55 mM olarak,  $V_{maks}$  değerleri ise sırasıyla 0.52 EU mg<sup>-1</sup>, 1.03 EU mg<sup>-1</sup>, 0.72 EU mg<sup>-1</sup> ve 0.15 EU mg<sup>-1</sup> olarak hesaplandı. Enzimin kullanılan substratlar varlığında en yüksek aktiviteyi 50 ile 60 °C' de ve pH 8 ile 9' da gösterdiği tespit edildi. Enzimin 50 ile 60 °C arasında termal kararlılığının, +4 °C' de pH 8.0-10.0 aralığında ise pH kararlılığının oldukça iyi olduğu gözlemlendi. Lipaz aktivitesine bazı metal tuzlarının ve bileşiklerin etkisi incelendi. Enzim aktivitesini en fazla Hg<sup>2+</sup> iyonunun inhibe ettiği tespit edildi. Bununla birlikte orlistat, kateşin, propil paraben, *p*-kumarik asit ve 3,4- dihidroksi hidrosinamik asit inhibitörlerinin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.0085, 0.06, 0.5, 1.25 ve 1.7 mM olarak belirlendi. Bu sonuçlar, *Geobacillus stearothermophilus* AH22 lipazının ısı ve pH kararlılığı ve diğer özellikleri açısından endüstriyel uygulamalar için oldukça elverişli özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

2015, 125 sayfa

**Anahtar kelimeler:** *Geobacillus stearothermophilus* AH22, Lipaz, Saflaştırma, Karakterizasyon

## ABSTRACT

### PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE ENZYME FROM *Geobacillus stearothermophilus* AH22 STRAIN

Arife Pınar EKİNCİ

Recep Tayyip Erdoğan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry  
Ph. D. Thesis  
Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER

In this study, the lipase, as an industrial enzyme, was partially purified by ion exchange and gel filtration column chromatographies and was characterised from *Geobacillus stearothermophilus* AH22 strain. The lipase was purified 18.3-folds with 19.7% recovery. Protein samples obtained from the purification steps were migrated on SDS-PAGE and molecular weight of enzyme was found to be about 26 kDa. The lipase activity was determined by using *p*-nitrophenyl acetate, *p*-nitrophenyl butyrate, *p*-nitrophenyl octanoate and *p*-nitrophenyl laurate as substrates. The  $K_m$  values of the enzyme for these substrates were found as 0.16, 0.02, 0.19 and 0.55 mM, respectively. Also  $V_{max}$  values were found 0.52 EU mg<sup>-1</sup>, 1.03 EU mg<sup>-1</sup>, 0.72 EU mg<sup>-1</sup> and 0.15 EU mg<sup>-1</sup>. The enzyme showed maximum activity at 50 °C and pH ranging for in 8.0-9.0. It was observed that the enzyme was quite stable at pH range of 8.0-10.0 at +4 °C and thermal stability between 50 and 60 °C. The effect of some metal salts and compounds were investigated on the lipase activity. It was found that Hg<sup>2+</sup> is the best inhibitor for this enzyme activity. The inhibitory effect of some chemicals including as orlistat, catechin, propyl paraben, *p*-coumaric acid, 3,4-dihydroxy hydro cinnamic acid, PMSF was examined and their IC<sub>50</sub> values was calculated as 0.0085, 0.06, 0.5, 1.25, 1.7 and 1.6 mM, respectively. These results suggest that *Geobacillus stearothermophilus* AH22 lipase presents very suitable properties for industrial applications.

2015, 125 pages

**Keywords:** *Geobacillus stearothermophilus* AH22, Lipase, Purification, Characterization

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Lipazlar ve Özellikleri.....	6
1.2.1. pH ve Sıcaklık Kinetiği.....	8
1.2.2. Organik Çözümlerde Kararlılığı.....	8
1.2.3. Metal İyonlarının Etkisi.....	8
1.2.4. Lipaz İnhibitörleri.....	9
1.3. Lipaz Katalizli Reaksiyonların Mekanizması.....	10
1.4. Lipazların Katalitik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması.....	13
1.4.1. Substrat Spesifikliği.....	13
1.4.1.1. Pozisyonel Spesifiklik.....	13
1.4.1.2. Yağ Asidi Spesifikliği.....	14
1.4.1.3. Kısmi Gliserit Spesifikliği.....	15
1.5. Lipazların Uygulama Alanları.....	16
1.5.1. Lipazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	17
1.5.2. Lipazların Gıda Endüstrisinde Kullanımı.....	18
1.5.3. Lipazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı.....	19
1.5.4. Lipazların Biyodizel Üretiminde Kullanımı.....	19
1.5.5. Lipazların Ham Yağ Rafinasyonunda Kullanımı.....	19
1.5.6. Lipazların Organik Madde Sentezinde Kullanımı.....	20
1.5.7. Lipazların Sulu Ortamda Oluşan Biyolojik Dönüşümde Kullanımı.....	20
1.5.8. Lipazların Rasemik Asit ve Alkol Çözeltilerinde Kullanımı.....	21
1.5.9. Lipazların Bölge Seçici Açılasyonda Kullanımı.....	22
1.5.10. Lipazların Ester Sentezinde Kullanımı.....	22

1.5.11.	Lipazların Oleokimya Endüstrisinde Kullanımı .....	22
1.5.12.	Lipazların Biyosensörler Olarak Kullanımı .....	22
1.5.13.	Lipazların Pestisit Üretiminde Kullanımı .....	23
1.5.14.	Lipazların Deri Endüstrisinde Kullanımı .....	24
1.5.15.	Lipazların Çay İşleme Prosesinde Kullanımı .....	24
1.5.16.	Lipazların Teşhis Aracı olarak Kullanımı.....	24
1.5.17.	Lipazların Çevre Yönetiminde Kullanımı .....	25
1.5.18.	Lipazların Kozmetik ve Parfüm Endüstrisinde Kullanımı.....	25
1.5.19.	Lipazların Medikal Uygulamalarda Kullanımı .....	26
1.6.	Termofilik Mikroorganizmalar .....	26
1.6.1.	Termofillerin Yüksek Sıcaklıklara ve Denaturasyona Karşı Dayanıklılıkları .....	29
1.6.2.	Termofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı .....	29
1.7.	Isıl Kararlı Enzimler .....	31
1.8.	Lipaz Kaynakları.....	32
1.8.1.	Mikrobiyal Lipazlar .....	34
1.8.1.1.	Bakteriyel Lipazlar.....	34
1.8.1.1.1.	Pseudomonas Lipazlar .....	34
1.8.1.1.2.	<i>Staphylococcus</i> lipazlar.....	35
1.8.1.1.3.	<i>Chromobacterium</i> Lipazları.....	36
1.8.1.1.4.	<i>Bacillus</i> lipazları .....	37
1.8.1.1.5.	<i>Acinetobacter</i> Lipazları.....	38
1.8.1.1.6.	<i>Corynebacterium</i> Lipazı .....	39
1.8.1.1.7.	<i>Propionibacterium</i> Lipazı.....	39
1.8.1.2.	Maya Lipazları .....	39
1.8.1.2.1.	<i>Candida</i> Lipazları .....	39
1.8.1.2.2.	<i>Trichosporon</i> Lipazı.....	40
1.8.1.3.	Mantar Lipazları.....	40
1.8.1.3.1.	<i>Pythium</i> Lipazı .....	40
1.8.1.3.2.	<i>Rhizopus</i> Lipazları .....	41
1.8.1.3.3.	<i>Mucor</i> Lipazları .....	42
1.8.1.3.4.	<i>Neurospora</i> Lipazları .....	42
1.8.1.3.5.	<i>Aspergillus</i> Lipazları .....	43
1.8.1.3.6.	<i>Penicillium</i> Lipazları.....	44
1.8.1.3.7.	<i>Ustilago</i> Lipazı.....	45



1.8.1.3.8.	<i>Botrytis</i> Lipazı.....	45
1.8.1.3.9.	<i>Geotrichum</i> Lipazları .....	46
1.8.1.3.10.	<i>Fusarium</i> Lipazları.....	46
1.8.1.3.11.	<i>Humicola</i> Lipazları .....	47
1.9.	Lipaz İçeren Organizmalar ve Yapılan Çalışmalar.....	47
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	53
2.1.	Materyal .....	53
2.2.	Yöntem.....	53
2.2.1.	Kullanılan Cihazlar .....	53
2.2.2.	Kullanılan Kimyasallar .....	54
2.2.3.	Kullanılan Çözeltiler .....	54
2.2.3.1.	Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları .....	54
2.2.3.2.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	55
2.2.3.3.	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler.....	56
2.2.3.4.	Sıvı ve Katı Besiyerleri .....	57
2.2.4.	Deneysel Çalışmalar .....	58
2.2.4.1.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> AH22 Suşunun Büyütülmesi .....	58
2.2.4.2.	Hücre içi Lipazın Eldesi.....	58
2.2.4.3.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	58
2.2.4.4.	Saflaştırma Aşamaları .....	59
2.2.4.4.1.	Sıcaklık Etkisi ile Proteinlerin Çöktürülmesi .....	59
2.2.4.4.2.	Dietilaminoetil-Selüloz (DEAE-Selüloz) Kolonu .....	59
2.2.4.4.3.	Jel Filtrasyon Kromatografisi .....	59
2.2.4.4.3.1.	Sefadeks G-150 Kolonu .....	59
2.2.4.4.3.2.	Sefadeks G-25 Kolonu .....	60
2.2.4.5.	Protein Tayini.....	60
2.2.4.6.	Elektrofrez.....	61
2.2.4.6.1.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez .....	61
2.2.4.6.2.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE).....	62
2.2.4.6.3.	“Fast Red” ile Substrat Boyama .....	62
2.2.4.6.4.	“Coommassie Blue R 250” ile Boyama.....	63
2.2.4.7.	Kısmi Olarak Saflaştırılan <i>Geobacillus stearothermophilus</i> AH22 Lipazının Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	63
2.2.4.7.1.	pH’ ın Etkisi .....	63

2.2.4.7.2.	Sıcaklığın Etkisi .....	63
2.2.4.7.3.	Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	64
2.2.4.7.4.	Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	64
2.2.4.7.5.	Isıl Kararlılığın İncelenmesi .....	64
2.2.4.7.6.	pH Kararlılığının İncelenmesi.....	64
2.2.4.7.1.	$\Delta H$ , $\Delta S$ ve $\Delta G$ Değerlerinin Hesaplanması .....	65
2.2.4.7.1.1.	Hız Sabitinin Hesaplanması.....	65
2.2.4.7.1.2.	Aktivasyon Enerjisinin ( $E_a$ ) Hesaplanması .....	65
2.2.4.7.1.3.	Serbest Enerjinin ( $\Delta G$ ) Hesaplanması .....	66
2.2.4.7.1.4.	Entalpi ( $\Delta H$ ) Değişiminin Hesaplanması.....	66
2.2.4.7.1.5.	Entropi ( $\Delta S$ ) Değişiminin Hesaplanması.....	66
2.2.4.7.2.	Bazı Kimyasallar, Deterjanlar, Anyonlar ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	66
3.	BULGULAR.....	68
3.1.	İntraselüler Lipazın Eldesi .....	68
3.2.	Saflaştırma Aşamaları .....	68
3.2.1.	Sıcaklık Etkisi ile Proteinlerin Çöktürülmesi .....	68
3.2.2.	Dietilaminoetil-Selüloz (DEAE-Selüloz) Kolonu .....	68
3.2.3.	Jel Filtrasyon Kromatografisi .....	69
3.2.3.1.	Sefadeks G-150 Kolonu .....	69
3.2.3.2.	Sefadeks G-25 Kolonu .....	70
3.2.4.	Elektroforez ve Substrat Boyaması.....	72
3.2.5.	Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	73
3.2.5.1.	pH'ın Etkisi .....	73
3.2.5.2.	Sıcaklığın Etkisi .....	76
3.2.5.3.	Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	77
3.2.5.4.	Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	78
3.2.5.5.	Isıl Kararlılığın İncelenmesi .....	81
3.2.5.6.	pH Kararlılığının İncelenmesi.....	83
3.2.5.7.	$\Delta H$ , $\Delta S$ ve $\Delta G$ Değerlerinin Hesaplanması .....	84
3.2.5.8.	Bazı Kimyasallar, Deterjanlar, Anyonlar ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	84
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	88
5.	ÖNERİLER.....	99
	KAYNAKLAR .....	101

ÖZGEÇMİŞ.....	122
---------------	-----

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Lipazların genel sentetik hidroliz reaksiyonu .....	3
Şekil 2.	Doğal $\alpha/\beta$ hidrolaz katlanması (Kazlauskas, 1998).....	10
Şekil 3.	<i>Mucor miehei</i> lipazının kapalı (A) ve açık (B) formlarının yapısı. Sarı alanlar katalitik üçlüyü temsil etmektedir. Kapak yapısının açılması ile (B)katalitik bölgeye (sarı) erişilebilmektedir (Schmid ve Verger, 1998).....	11
Şekil 4.	<i>Humicola lanuginosa</i> lipazının üç boyutlu yapısı (Kraulis, 1991; Lawson vd., 1994).....	12
Şekil 5.	Lipazların genel reaksiyon mekanizması .....	12
Şekil 6.	DEAE- Selüloz kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve özgül aktivite değerleri.....	69
Şekil 7.	Sefadeks G-150 kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve özgül aktivite değerleri.....	70
Şekil 8.	Sefadeks G-25 kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve özgül aktivite değerleri.....	71
Şekil 9.	SDS-PAGE Elektroforezi.....	72
Şekil 10.	A:Substrat Boyaması, B: Doğal PAGE elektroforezi.....	73
Şekil 11.	<i>p</i> -Nitrofenil asetat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine pH' in etkisi.....	74
Şekil 12.	<i>p</i> -Nitrofenil bütirat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine pH' in etkisi.....	74
Şekil 13.	<i>p</i> -Nitrofenil oktaonat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine pH' in etkisi.....	75
Şekil 14.	<i>p</i> -Nitrofenil laurat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine pH' in etkisi.....	75
Şekil 15.	<i>p</i> -Nitrofenil oktaonat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	76
Şekil 16.	<i>p</i> -Nitrofenil laurat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	77
Şekil 17.	Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	78
Şekil 18.	<i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazı için <i>p</i> -nitrofenil asetat substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	79
Şekil 19.	<i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazı için <i>p</i> -nitrofenil bütirat substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	79
Şekil 20.	<i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazı için <i>p</i> -nitrofenil oktaonat substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	80
Şekil 21.	<i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazı için <i>p</i> -nitrofenil laurat substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.....	80

<b>Şekil 22.</b> <i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazının oda sıcaklığı, 40 ve 50 °C’ deki ısı kararlılık eğrisi. ....	81
<b>Şekil 23.</b> <i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazının 60 °C’deki ısı kararlılık eğrisi. ....	82
<b>Şekil 24.</b> <i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazının 70, 80 ve 90 °C’deki ısı kararlılık eğrisi. ....	82
<b>Şekil 25.</b> <i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazının +4 °C’ deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği. ....	83

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	Lipazların katalizlediği çeşitli reaksiyonlar (Houde vd., 2003).....	6
<b>Tablo 2.</b>	Farklı kaynaklardan elde edilen lipazların bazı biyokimyasal özellikleri.....	9
<b>Tablo 3.</b>	Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları (Vulfson, 1994). ....	17
<b>Tablo 4.</b>	Termofilik organizmalarından elde edilen bazı enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar (Aguilar, 1996). ....	30
<b>Tablo 5.</b>	Isıl kararlı enzimlerin biyoçevrim reaksiyonları ve uygulamaları. ....	32
<b>Tablo 6.</b>	Ticari olarak önemli mikrobiyal lipaz kaynakları ve üretici firmalar. ....	33
<b>Tablo 7.</b>	Çeşitli <i>Pseudomonas</i> lipazlarının saflaştırma yöntemleri.....	35
<b>Tablo 8.</b>	Çeşitli <i>Bacillus</i> lipazlarının saflaştırma aşamaları. ....	38
<b>Tablo 9.</b>	Çeşitli <i>Rhizopus</i> spp. lipazlarının saflaştırılma aşamaları.....	41
<b>Tablo 10.</b>	Çeşitli <i>Penicillium</i> spp. lipazlarının saflaştırılma aşamaları.....	45
<b>Tablo 11.</b>	Bazı mikroorganizmalardan lipaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve enzimin biyokimyasal özellikleri. ....	48
<b>Tablo 12.</b>	Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları. ....	53
<b>Tablo 13.</b>	Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları. ....	54
<b>Tablo 14.</b>	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları. ....	61
<b>Tablo 15.</b>	Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları. ....	62
<b>Tablo 16.</b>	<i>G. stearothermophilus</i> AH22' ten kısmi olarak saflaştırılan lipaz enzimine ait saflaştırma tablosu. ....	71
<b>Tablo 17.</b>	<i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazına ait termodinamik parametreler. ....	84
<b>Tablo 18.</b>	Bazı metal iyonlarının <i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazının aktivitesi üzerine etkisi. ....	85
<b>Tablo 19.</b>	Bazı anyonların <i>G. stearothermophilus</i> AH22 lipazının aktivitesi üzerine etkisi. ....	86
<b>Tablo 20.</b>	Bazı deterjanlar ve kimyasalların <i>G. Stearothermophilus</i> AH22 lipazının aktivitesi üzerine etkisi. ....	87
<b>Tablo 21.</b>	Lipaz üzerinde inhibitör etkisi olan bazı kimyasalların IC <sub>50</sub> Değerleri. ....	87

## SEMBOLLER DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
BSA	Bovin serum albümin
EU	Enzim ünitesi
EU/mg	Özgül aktivite
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Menten sabiti
LB	Luria-Bertani
LB-A	Luria-Bertani Agar
MOPS	3-(N-morfolino)propan sülfonik asit
PMSF	Fenilmetilsülfonoflorid
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenil
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyumdodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
$V_{maks}$	Maksimum hız

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

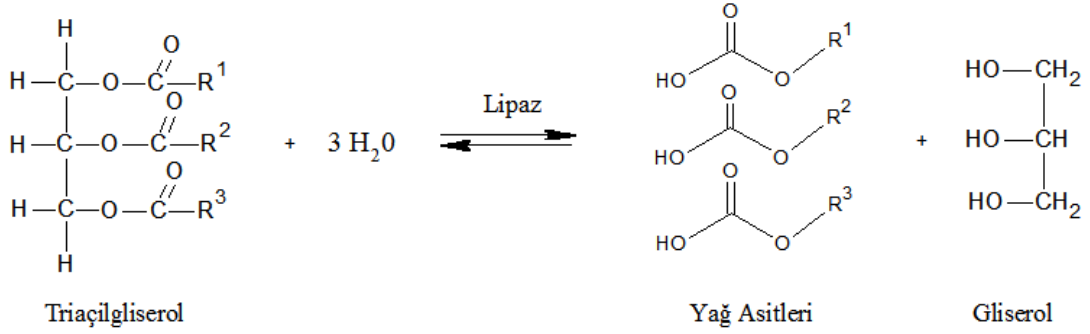
Yaşam, iyi şekilde organize olmuş kimyasal reaksiyonlara dayanır. Bununla beraber bu reaksiyonların pek çoğu yaşamı devam ettirecek kadar hızlı ilerleyemez. Bundan dolayı canlı organizmaların doğal biyokatalizörleri olan enzimler fizyolojik şartlarda kimyasal reaksiyonların hızını  $10^{10}$ - $10^{12}$  kat artırmaktadırlar. Enzimler çoğunlukla; karbon, oksijen, hidrojen, azot ve kükürtten oluşan, kimyasal tepkimelerde katalizör olarak rol alan protein yapısında moleküllerdir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü değişikliğe uğratmadan düzenlerler. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimler, proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler. Enzimler, doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilirler ve bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi ve enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi büyük önem taşımaktadır. Enzimlerin katalitik gücü virüslerden insanlara kadar bütün yaşam formlarının hayatını kolaylaştırır.

Enzimler antik dönemden beri peynirlerin, ekmeklerin ve alkollü içkilerin üretiminde ve etlerin yumuşatılması gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Günümüzde de enzimler halen pek çok besin, alkollü içecek üretiminde ve çamaşır deterjanları gibi pekçok ürüne katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Copeland, 2000). Günümüzde endüstriyel teknolojilerin birçoğunda ve genel olarak biyoteknolojik işlemlerde enzimlerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Ancak maliyetleri ve elde edilebilmelerindeki problemler gibi bazı dezavantajlarından dolayı enzimlerin bazı endüstriyel alanlarda uygulanması sınırlı olmaktadır. Bu açıdan protein mühendisliği ve biyoteknolojik yöntemlerle endüstrinin ihtiyaç duyduğu, bir biyolojik kaynaktan büyük miktarlarda üretilebilen, yüksek sıcaklıklara ve kullanılacağı endüstriyel uygulama alanındaki çeşitli kimyasal ortamlara dayanıklı enzimlerin geliştirilmesi konusunda oldukça çarpıcı çalışmalar gerçekleştirilmektedir.



Bugün yaklaşık 4000 enzim tanımlanmış olup, bunlardan sadece 200 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimler genellikle mikrobiyal orijindir. Endüstriyel enzimlerin çoğunluğu (yaklaşık %75'i) hidrolitik etkiye sahiptir. Hidrolazlar, çok geniş substrat spesifikliğı gösteren bir enzim sınıfıdır. Hidrolazlar peptidleri, amidleri, 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 vd., 2001b). Lipazlara biyoteknoloji çalışmalarında çok amaçlı kullanılabilirlikleri, spesifikliğın olmadığı kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, yan reaksiyonları önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle her geçen gün artan bir ilgi ve talep vardır.

Lipazlar veya triaçilgliserol açılhidrolazlar (E.C. 3.1.1.3) fiziksel ve endüstriyel açıdan önem uzun zincirli triaçilgliseritlerin (10 C'lu <) sulu fazla organik faz arayüzünde; diaçilgliseritlere, monoaçilgliseritlere, gliserol ve yağ asitlere parçalanmasını katalizleyen ve birçok yerde bulunan enzimlerdir (Thomson vd., 1999; Verger, 1997; Brockman vd., 1988). Lipazların düşük su konsantrasyonunda hem ester sentezini hem de transesterifikasyon reaksiyonunu katalizleyen tersinir bir özelliğı olduğu çok iyi bilinmektedir (Gupta vd., 2004; Saxena vd., 1999). Son yıllarda lipaz aracılı ester sentezi çok çeşitli ve değerli bileşiklerde olduğu gibi birçok bilim adamı tarafından inceleme altındadır. Trigliseritler, fosfolipitler, galaktolipitler, kütin, vakslar, kısa zincirli esterler ve steroidler gibi bileşiklerin enerji kaynağı olarak, membran bileşeni, emülgatör, kıvamlaştırıcı ve koruyucu tatlandırıcı olarak birçok fonksiyonu vardır. Karboksilik esterlerin fonksiyonel özellikleri direk olarak hidrokarbon omurgasının uzunluğu ile ilgilidir. Bundan dolayı, kısa-orta zincirli karboksilik esterlerin ve alkol kısımlarının gıda endüstrisinde aroma ve tatlandırıcı olarak uygun bir rolleri vardır. Diğer taraftan, uzun zincirli yağ asitlerinin metil veya etil esterleri dizel-motor yakıtları gibi fonksiyonu olan değerli oleo kimyasal türlerin oluşmasını sağlarlar. Uzun zincirli karboksilik esterlerin ve alkol kısımlarının (tipik olarak vakslar) kozmetikte ve ilaç formülasyonunda katkı maddesi ve yağlayıcı olarak kullanımı mevcuttur. Lipazların sentetik hidrolitik reaksiyonu Şekil 1'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** Lipazların genel sentetik hidroliz reaksiyonu

Lipazların misel, küçük kümeler veya emülsiyon şeklindeki çözünmeyen uzun zincirli yağ asidi esterlerinin hidrolizini katalizleyebilmesi onları diğer çözünmeyen esterlere tercihen çözünür esterlerin hidrolizini katalizleyen esterazlardan ayırır (Macrae, 1983). Lipazlar doğal substratları haricinde enantiyo ve bölgesel seçici olarak büyük oranda da doğal olan ve olmayan esterlerin sentezini de katalizlemektedirler (Schmidt-Dannert, 1999). Lipazlar triaçil gliserol molekülüne rastgele olarak veya pozisyona bağlı olarak etki edebilirler (Marangoni ve Rousseau, 1995). Spesifik olmayan lipazlar triaçilgliserolleri bütün pozisyonlarda sınırlı sayıda katalizlerler. Diğer yandan, bölgesel seçici lipazlar (örneğin 1,3-spesifik lipazlar) endüstriyel uygulamalarda örneğin yapısal yağların üretiminde tek fonksiyonel özelliği ile büyük bir potansiyele sahiptir (Sonnet ve Gazzillo, 1991). Bölgesel seçici lipazlar kimya, ilaç, kozmetik ve deri endüstrisinde büyük yere sahiptir (Iwai ve Tsujisaka, 1984). Enzimlerin özellikle de lipazların hidrolitik veya sentetik kiral katalizörü olarak kullanılmasında ilginç bir artış gözlenmektedir (Hou ve Johnston, 1992). Enantiyo seçici lipazlar çeşitli kiral bileşiklerin biyosentezi için kullanılabilirler (Qian ve Xu, 2004; Kim vd., 2002; Shen vd., 2000). Örneğin Patel vd. (1996) lipazları; antikanser ve diğer kemoterapik ajanlar için kullanılan kiral ara maddelerin sentezinde kullanmışlardır.

Lipazların yağların modifikasyonunda veya uyarlanmasında yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin bir kakao yağı eşdeğeri palmiye yağının orta fraksiyonu lipaz katalizli interesterifikasyon ile sentezlenebilirken (Mojovic vd., 1993), hodan yağının  $\lambda$ -linolenik asit içeriği bir lipaz katalizli reaksiyonla sonucu zenginleştirilebilir (Huang vd., 1997). Gıda endüstrisi sektöründe lipazlar amino asitlerin türevlerinin sentezinde

kullanılmaktadır. Bu gibi yeni ve potansiyel uygulamalar mikroorganizmalardan elde edilen yeni lipazlara olan talebi artırmaktadır.

Lipazlar susuz organik çözücülerde de aktivite göstermektedirler. Bu özellikleri lipazların daha çok organik sentezlerde biyokatalizör olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Lipazlar, normal hidrolitik etkileri organik ortama az miktarda su ilavesi ile kontrol edilerek, esterleşme ve interesterleşme reaksiyonlarında etkili bir katalizör olarak kullanılmaktadır (Klibanov, 1990; Margolin, 1993; Vulfson, 1994; Balkenhohl vd., 1997). Lipazlar mikrosulu organik ortamlarda iki tip interesterleşme aktivitesi göstermektedir. Birinci tip aktivite, yeni bir gliserit molekülü oluşturmak için bir trigliserit ile serbest yağ asidlerinin asid yer değiştirme reaksiyonları ve transesterleşme reaksiyonları şeklinde gerçekleşir. İkinci tip reaksiyon ise iki farklı trigliseritten yeni bir trigliserid elde edilmesidir (Mustranta vd., 1993). Biyotransformasyon reaksiyonlarının katalizörü olarak lipazların kullanılmasının avantajları oldukça geniş substratlara sahip olan lipazların stereoseçiciliğe sahip, çevresel sıcaklıkta ve ılıman reaksiyon koşullarında yüksek katalitik aktiviteye sahip olması şeklinde sıralanabilir. Ayrıca genel kimyasal yöntemlerle elde edilmesi zor olan saf enantiomer ara ürünlerin sentezi mikrobiyal lipazlar ile mümkün olabilmektedir (Balkenhohl vd.1997, Klibanov, 1990, Margolin, 1993, Vulfson, 1994 ).

Lipazlar kökenleri ve özellikleri açısından oldukça farklılıklar göstermektedirler. Lipazlar mikroorganizmalar, bitki ve hayvanlardan elde edilebilirler. Lipazlar, filogenetik ağaç-arke (hayvan, bitki ve mantarları da içine alan ökaryatlarda ikinci bir dallanma bölümü ile) ve bakterilerin 2 temel bölümünü oluşturan bütün canlı organizmalarda bulunurlar (Olson vd., 1994). Lipolitik enzimler lipidlerin biyolojik yıkımı için muhakkak gereklidir. Bu enzimler lipidlerin bir organizmadan diğerine, bitkiden hayvana veya hayvandan hayvana transferinde sindirim enzimi olarak iş görürler. Bunlar organizma içinde, yağların enerji kaynağı olarak depolanmasında ve taşınmasında, intraselüler lipidlerin metabolizmasında, ayrıca biyolojik membranların işleyişinde enstrümental olarak görevlidirler. Ökaryotlarda ise, lipazlar yağların sindirimi, absorpsiyonu, yeniden oluşması ve lipoproteinlerin metabolizması gibi lipid metabolizmasının çeşitli aşamalarında yer alırlar. Genellikle enzimler sürüngenler ve omurgasızların zehirlerinde ve hücre dışı mikrobiyal enzimlerin arasında olduğu gibi

kendileriyle alakası olmayan yerlerde de bulunabilirler (Brockerhoff ve Jenses, 1974). Mikrobiyal lipazların yaygın olarak deterjan, gıda, ekmek, aroma sanayisi, ester ve amino asit türevlendirilmesi, biyomediasyon, sert yüzey temizleme, deri ve kağıt endüstrisi gibi bir çok endüstriyel uygulamalar için cazip olan enzimatik özellik ve substrat spesifikklik çeşitliliği vardır.

Lipazlar, geniş bir substrat spektrumu olduğundan ekstrem sıcaklık, pH ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılık göstermesinden dolayı önemli biyokatalizörler arasında yer alır. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar mezofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazlara göre daha termal kararlığa sahiptirler (Nawani ve Kaur 2000). Isıl kararlı enzimler oldukça yüksek özgünlüğe sahiptirler ve bu sebeple birçok endüstriyel uygulama için potansiyel oldukları düşünülmektedir. Bu tip enzimler yiyecek, ekmekçilik, kâğıt, deterjan, ilaç, zehirli atıkların uzaklaştırılması ve yağ sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür enzimler termofilik mikroorganizmalardan elde edilebildiği gibi çabuk büyüeyebilen mezofil canlılara, rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla klonlanarak da elde edilmesi mümkündür (Haki ve Reakshit, 2003). Fakat termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu organizmalardan elde edilen enzimlerin mezofilik analoglarına göre daha kararlı olduğu keşfedilmiştir. Bu nedenle termofilik bakterilerden enzim izolasyonuna, karakterizasyonuna ilgi gün geçtikçe giderek artmaktadır.

Bu çalışmada, çalışma materyali olarak kullanılan ve yeni bir termofilik bakteri olan *Geobacillus stearothermophilus* AH22 Suşu Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından Erzurum Ilıca İlçe'si kaplıcalarından izole edilmiştir. Çalışmanın amacı olarak, *Geobacillus stearothermophilus* AH22 Suşundan Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" ile tekstil, deterjan, kağıt, ekmekçilik, kozmetik, ilaç, deri sanayi gibi birçok alan için büyük önem taşıyan sıcaklığa dirençli enziminin bol ve ucuz bir şekilde üretilmesine olanak sağlamak amacıyla, saflaştırılması ve biyokimyasal olarak karakterize edilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlardan sonra termofilik bakteriden elde edilecek lipaz enziminin gelecekte endüstriyel uygulama imkanı bulabilmesi ümit edilmektedir. Ayrıca endüstriyel proseslerdeki çoğu kimyasal reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiği düşünüldüğünde termofilik bakterilerden, izole edilecek olan lipaz enzimlerinin, bu türden proseslerde daha rahat uygulama alanı bulabileceği aşikardır. Ayrıca petrol rezervlerinin sınırlı olduğu günümüzde, geleceğin yakıtı olabilecek biyodizel yakıtların elde edilmesinde, bu türden bakterilerden izole edilen lipazların yararlı olabileceği düşünülebilir.

## 1.2. Lipazlar ve Özellikleri

Lipazlar (triacilgliserol açılhidrolazlar; EC.3.1.1.3) esterlerin hem sentezini hem de hidrolizini katalizleyen hidrolitik enzimlerin önemlilerinden biridir (Sharma vd., 2001a). Trigliseritlerin lipazlar tarafından hidrolizi di- ve monoaçilgliserit, gliserol ve yağ asitlerine kadar sağlanabilir. Sınırlı nemli ortamda sadece esterifikasyon ve transesterifikasyon daha ayrıcalıklıdır (Klibanov, 1997). Lipazlar; glikol ve mentollerin esterifikasyon ve transesterifikasyonla bölge seçici açılmesi, kimyasal ve peptitlerin sentezi ve diğer çeşitli reaksiyonlar gibi faydalı bir çok reaksiyonun çeşitli organik çözücüler içerisinde katalizlenmesini sağlar (Cenia ve Palocci, 1997; Ducret vd., 1998; Weber vd., 1999; Chowdary vd., 2001; Hamseveni vd., 2001; Kiyota vd., 2001; Zhang vd., 2001). Tablo 1’de lipazlar tarafından katalizlenen çeşit reaksiyonlar özetlenmiştir.

**Tablo 1.** Lipazların katalizlediği çeşitli reaksiyonlar (Houde vd., 2003)

$R_1COOR_2 + H_2O$	<u>Hidroliz</u> →	$R_1COOH + R_2OH$
$R_1COOH + R_2OH$	<u>Esterifikasyon</u> →	$R_1COOR_2 + H_2O$
$R_1COOR_2 + R_3COOR_4$	<u>İnteresterifikasyon</u> →	$R_3COOR_2 + R_1COOR_4$
$R_1COOR_2 + R_3COOH$	<u>Asidoliz</u> →	$R_3COOR_2 + R_1COOH$
$R_1COOR_2 + R_3OH$	<u>Alkoliz</u> →	$R_1COOR_3 + R_2OH$
$R_1COOR_2 + R_3NH_2$	<u>Aminoliz</u> →	$R_1CONHR_3 + R_2OH$

Katalizör olarak lipazların doğal reaksiyonu trigliseridin hidroliz reaksiyonudur. Hidroliz sonucunda serbest yağ asidi ve gliserol oluşur (Macrae ve Hammond, 1985). Lipazın katalizleme prosesi enzimin çözünür bir şekilde bulunduğu yağ asitlerinin sudaki emülsiyonunda veya yağın su ya da tampon içerisinde emülsiyon sistemlerinde meydana gelmektedir. Yağ asitleri endüstride oldukça kullanılmakta fakat doğal olarak çok az miktarda bulunmaktadır. Yağ asidi üretmek için zeytinyağı, palm yağı, süt yağı ve kısa zincirli substratların hidrolizi üzerinde çalışmalar bulunmaktadır (Shiomori vd., 1996; Patel vd., 1996; Nini vd., 2001; Noor vd., 2003).

Esterifikasyon ileri ve geri reaksiyon arasında dengede olan, reaksiyon karışımında bulunan su tarafından kontrol edilen tersinir bir hidroliz sürecidir. Az sulu ve susuz ortamlarda lipazlar alkol ve yağ asitleri arasında oluşan ester bağlarının bulunduğu esterifikasyonları içeren tersinir reaksiyonları katalizlemede oldukça etkilidir. Asit ve alkol içeren reaksiyon sistemlerinde, su oluşturan ester reaksiyonlarındaki reaksiyon bileşenleri çözmek için organik çözücü eklenebilir. Termodinamik dengeyi sağlamak, sürekli ester üretmek için ortam suyun uzaklaştırılması gerekir. Bu proses sayesinde ester terpen alkolü ve reaksiyon ortamına, reaktantlar arasındaki duruma bağlı olarak mono, di- veya tri- gliseritler gibi bileşikler sentezlenebilir (Lee vd., 1998; Blanco vd., 2004; Hilal vd., 2006). Lipaz aracılı esterifikasyon kimyasal yöntemler içerisinde alternatif olarak büyüme göstermektedir. Aslında ester sentezi oda sıcaklığında ve basıncında gerçekleşmesinin yanında nötral pH kaplarında kesikli veya sürekli olarak da gerçekleştirilebilir. Bu nedenle elde edilen ürünler nitelik açısından alternatif kimyasallarla elde edilenlerden daha saftır. Çünkü kimyasal katalizleme spesifik olmayan ve birkaç genel ürün verme eğilimindedir. Lipazların esterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmasından dolayı çok çeşitli kompleks reaksiyonlar sonrası yapılan ayırma işlemlerine (kimyasal prosesler için bu durum şart) olan ihtiyaç azalır ve böylelikle genel maliyet de azalmış olur. Ancak, genel olarak lipazlar ve biyokatalizörlerin geniş kullanımlarının sakıncaları klasik kimya ile karşılaştırıldığında enzimin kendi doğasındakine nispeten düşük stabilitesinin yanı sıra yüksek maliyeti de bulunabilir (Villeneuve vd., 2000).

İnteresterifikasyon işlemi ester ve açıl donörleri arasındaki açıl radikal değişimini kapsamaktadır. Şayet açıl donörü serbest yağ asidi ise bu reaksiyon asidoliz olarak

adlandırılır. Eğer alkol ve asit arasında ise alkolozis olarak adlandırılır (Macrae, 1983). İnteresterifikasyonla trigliserit üzerinde bağlı olan yağ asidi hidroliz olur ve esterifikasyon işlemi ile başka bir yağ asidi ile yer değiştirir (Macrae ve Hammond, 1985).

### 1.2.1. pH ve Sıcaklık Kinetiği

Bakteriyal lipazlar pH 4.8 asidik bir optimum pH'ya sahip *P. fluorescens* SIK W1 lipazı hariç alkali veya n6tral pH'da aktivite g6sterirler. Ancak *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *B. atrophaeus* SB-2 ve *B. licheniformis* SB-3 suşlarından elde edilen lipazlar pH 3-12 aralığında aktivite g6sterir. Bakteriyal lipazların genellikle optimum aktivite g6sterdiği sıcaklık 30-60 6C aralığındadır. *B. licheniformis* MTCC-10498 için maksimum lipaz 6retimi pH 7.5'da (~0.4 EU/mL) g6zlenmiştir (Bradoo vd., 1999; Litthauer vd., 2002; Sharma vd., 2012). Ancak daha d6ř6k ve daha y6ksek sıcaklıklarda optimum aktivite g6steren bakteriyal lipazlar da rapor edilmiştir. Termal kararlılık verileri yalnızca *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* t6rleri için mevcuttur. *Bacillus* sp.'dan elde edilen bir enzimin termal kararlılığı, enzimin 70 6C'de 150 dak. ink6basyondan sonra da aktivitesini koruması etilen glikol, sorbitol, gliserol, gibi stabilizat6rlerin eklenmesi ile sağlanmıştır (Nawani ve Kaur, 2000).

### 1.2.2. Organik 6z6lde Kararlılığı

Organik 6z6c6lerde lipazların kararlılığı sentez reaksiyonlarında arzulan bir durumdur. Mevcut literat6r g6re genellikle lipazların bir kaç uyarılma ve inhibisyon hariç organik 6z6c6lerde kararlı olduğu anlaşılmaktadır. 6rneğin; etanol ve metanol *B. thermocatenulatus* ve AG-8 lipazının aktivitesini artırmaktadır (Sharma vd., 2001a).

### 1.2.3. Metal İyonlarının Etkisi

Metal iyonları mikrobiyal enzim 6retimini ya uyarabilir ya da inhibe edebilir. Metal katyonları 6zellikle de Ca<sup>2+</sup> enzimin yapı ve fonksiyonunda 6nemli rol oynar ve bazı lipazların tamamen kalsiyuma bağımlıdır. Ca<sup>2+</sup> iyonları enzimi aktive ederken Zn<sup>2+</sup>,

$Fe^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  iyonları ise inhibe eder.  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  gibi iyon tuzları immobilize biyokatalizörlerin aktivitesini artırırken  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  ve  $Na^{+}$  tuzları az bir inhibisyon etkisi gösterir (El Khattabi vd., 2003; Kumar ve Kanwar, 2011).

#### 1.2.4. Lipaz İnhibitörleri

Lipaz inhibitörleri lipazların yapısal ve mekanik özellikleri ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır. Lipaz inhibitörleri için yapılan diğer araştırmalar daha çok farmakolojik açıdandır. Lipaz inhibitörleri obezite tedavisinde ve akne problemleri için ilaç olarak kullanılır. Aşağıda genel inhibitörlerin açıklaması mevcuttur. Daha açık bir şekilde enzim inhibitörleri tersinir veya tersinir olmayan olarak sınıflandırılır. Tersinir inhibitörlerde spesifik ve spesifik olmayan tersinir inhibitörler olarak sınıflandırılır.

Spesifik olmayan tersinir inhibitörlerde, bileşikler aktif bölgeye direk bağlanmaz fakat lipazın yapısını değiştirerek veya arayüzey spesifik olmayan inhibitör olarak tanımlanarak lipaz aktivitesini inhibe ederler. Yüzey aktif maddeler, safra tuzları ve proteinler bu grup inhibitörlere girer. Ancak yüzey aktif maddeler ve safra tuzları bazı durumlarda enzimi aktive edebilirler (Nagar vd., 2013).

Bazı kaynaklardan elde edilen lipazların özellikleri Tablo 2’de verilmiştir (Whellcuright, 1991; Fadiloğlu, 1996; Petersen vd., 2001).

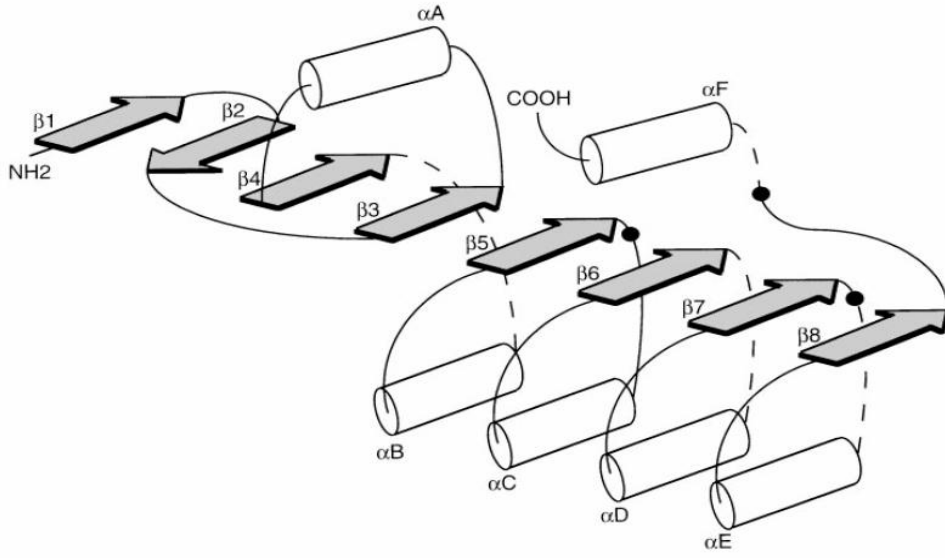
**Tablo 2.** Farklı kaynaklardan elde edilen lipazların bazı biyokimyasal özellikleri.

Kaynak	Spesifik pozisyonu	pI	İnhibitörler	Aktivatörler
Domuz Pankreası	1,3 Spesifik		$Ca^{2+}$ , $Sr^{2+}$ , $Mg^{2+}$	$Zn^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , Versen, iyodin PCMB
<i>Phycomyces Nitens</i>		5,9	$Ag^{+}$ , $Hg^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $KMnO_4$ , NBS	Memeli safrası
<i>Aspergillu Niger</i>	1,3 Spesifik	4,1	$Ag^{+}$ , İyodasetamit	
<i>Candida Rugosa</i>	Non-Spesifik	4,5	$Hg^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Co^{2+}$	
<i>Candida Cylindracea</i>	Non-Spesifik	4,0		
<i>Humicola Lanuginosa</i>		6,6	$Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Sn^{2+}$ , $Hg^{2+}$	$K^{+}$ , $Ca^{2+}$



### 1.3. Lipaz Katalizli Reaksiyonların Mekanizması

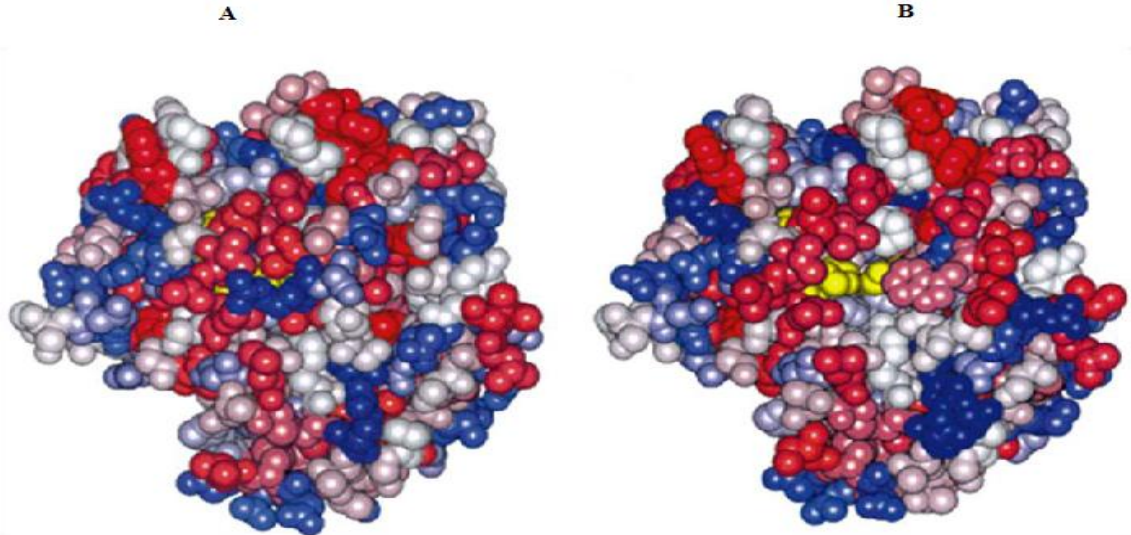
Lipazların primer dizilişlerindeki amino asit sayısı oldukça farklı olsa da tüm lipazların ortak özelliği Ser-Asp/Glu-His katalitik üçlüden oluşan bir katalitik bölge üzerine inşa edilmiş olmasıdır. Tüm lipazların 3 boyutlu yapısı yaygın bir şekil olan, her iki bölgesi  $\alpha$ - heliksler tarafından sarılmış paralel 8- $\beta$  tabakasından oluşan bölgede bulunan,  $\alpha/\beta$  katlamalı hidrolazlardır (Şekil 2) (Kazlauskas, 1998).



Şekil 2. Doğal  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanması (Kazlauskas, 1998).

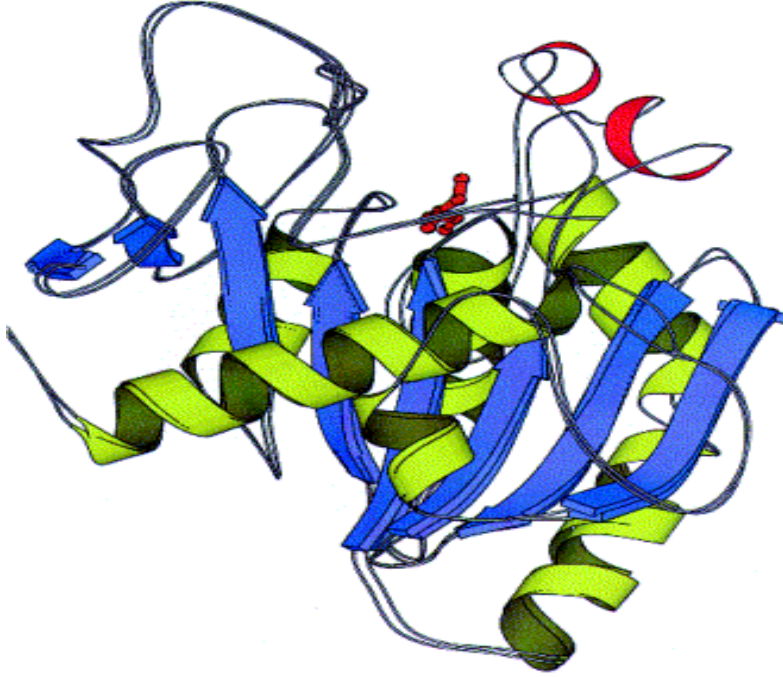
Üçlü ve birçok oksianyon dengeleyici kalıntılarının lipazların aktif bölgesini oluşturduğu düşünülmektedir. Aktif bölgeyi kapatan (flap ve kapak) bir helikal segment; serin proteaz veya esterazlar gibi diğer hidrolazlardan ayrılan önemli karakteristik ara yüzey lipazların aktivasyonundan sorumludur. Araştırmacılar lipazların substrata bağlanmadan önceki ve sonraki X-ray yapısına dayalı olarak lipazların biyokimyasal dönüşüm reaksiyonlarına katılmadan önce aktive edildiklerini düşünmektedirler (Pleiss, 2000; Soumanou vd., 1999). Susuz bölge lipid ara yüzeyinde çözülmüş serbest lipaz kendi inaktif bölgesinde yer alır ve enzim molekülünün bir parçası aktif bölgeyi oluşturur. Bununla birlikte enzim iki fazlı bir su-yağ ara yüzey sistemiyle etkileşime girdiği zaman, kısa  $\alpha$ - heliks sarmalı (kapak) enzimin aktivasyonu için geriye doğru katlanır. Diğer bir deyişle, substratsız durumda kapak kapanır ve enzim inaktif olur, substrat olduğunda ise su-yağ ara yüzeyi bulunur ve kapak açılır sonra enzim aktif olur (Orru vd., 1999). Katalitik üçlü (Ser-Asp-His) bir ester hidrolizinin

serin hidrolaz katalizleme mekanizmasında gösterildiği gibi enzimin aktif bölgesinde asıl kimyasal operatördür (Şekil 2) (Gotor vd., 1991; Gotor, 1992; Estell, 1993; Marangoni, 1995; Gotor, 2002).



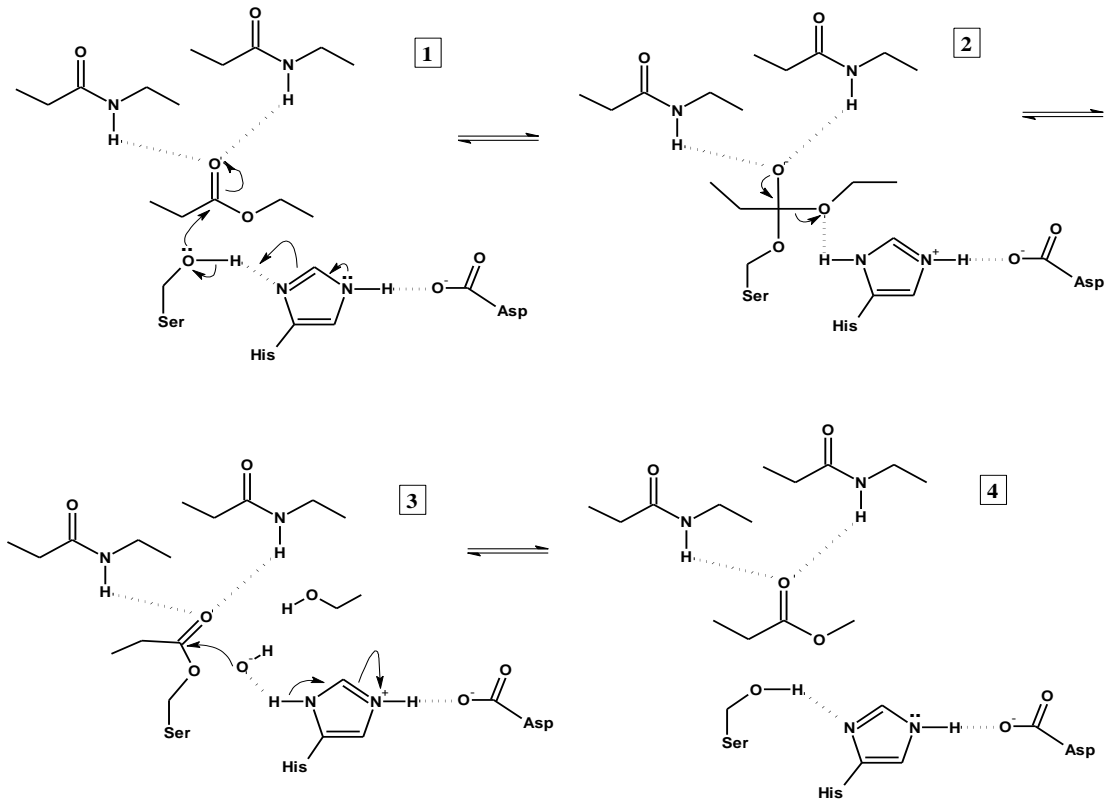
**Şekil 3.** *Mucor miehei* lipazının kapalı (A) ve açık (B) formlarının yapısı. Sarı alanlar katalitik üçlüyü temsil etmektedir. —Kapak yapısının açılması ile (B) katalitik bölgeye (sarı) erişilebilmektedir (Schmid ve Verger, 1998).

Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları, ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisi ile görüntülenebilmektedir. *Humicola lanuginosa* lipazının kristal yapısı Şekil 4 'de görülmektedir.  $\beta$ -tabakalı alt birimi mavi renkte, onu saran helezonik sarmallar yeşil renkte ve aktif serin kalıntıları ile kapak kırmızı renkte gösterilmiştir (Kraulis, 1991; Lawson vd., 1994).



Şekil 4. *Humicola lanuginosa* lipazının üç boyutlu yapısı (Kraulis, 1991; Lawson vd., 1994).

Lipazların genel kataliz mekanizması 4 basamakta gerçekleşir (Şekil 5).



Şekil 5. Lipazların genel katalitik mekanizması

1. Lipidin bağlanması, nükleofilik serin bölgesinin komşu histidin tarafından aktivasyonu ve substratın karbonil karbon atomunun Ser O<sup>-</sup> ile nükleofilik atağı
2. Tetrahedral geçiş ara ürünü: iki peptidin NH gruplarının etkileşimiyle O<sup>-</sup> stabilize edilir. Histidin substratın alkol grubunun ayrılması için bir proton verir.
3. Kovalent ara ürün (enzim-açıl kompleksi); Enzimin serin bölgesi ile esterleşmiş substratın asit bileşeni, gelen su molekülü komşu Histidin bölgesi ile aktive olur ve sonuçta hidroksil iyonu kovalent ara ürünündeki karbonil karbon atomuna nükleofilik atak yapar.
4. Histidin bölgesi aktif serin bölgesinin oksijen atomuna bir proton verir ve Serin ile açıl grubu arasındaki ester bağı kırılır, açıl bileşiği serbest kalır.

## **1.4. Lipazların Katalitik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması**

### **1.4.1. Substrat Spesifikliği**

Bir substratın hidrolizi su-yağ arayüzeyinde gerçekleşir. Bu nedenle ester bağlarının lipoliz hızı; reaksiyon karışımındaki substratın yüzey alanının bir fonksiyonudur. Ama her bir substratın yüzey bölgesi fizyolojik ve kimyasal özellikleri farklı olduğundan birbirinden farklılık gösterir. Bu faktörlerden dolayı farklı mikrobiyal lipaz kaynakları farklı substrat spesifikliği gösterir. Genellikle, substrat spesifikliği; pozisyonel, yağ asidi ve kısmi trigliserit spesifiklik olarak 3 gruba ayrılır.

#### **1.4.1.1. Pozisyonel Spesifiklik**

Trigliseritlerin hidrolizi digliseritler, monogliseritler, gliserol ve yağ asitlerine kadardır. Bölgesel spesifiklik açısından temelde 2 gruba ayrılabilir. Birinci grup spesifik olmayan, trigliseritlerin rastgele bütün 3 bölgesindeki yağ asitlerinin ayrılmasıdır. İkinci grup ise 1,3 bölgesel spesifikliğe sahiptir. Bu spesifiklik yağ asitlerinin trigliseritlerin 1 ve 3 pozisyonundaki yani dıştaki bir yerden ayrılmasıdır. Yalnızca 1,3 pozisyonundaki yağ asidi 1,3 spesifik lipaz tarafından bölünür. Sterik engelden dolayı ortadaki yani pozisyon 2 reaksiyon vermez. Eğer lipazlar organik çözücülerde kullanılırsa bölge spesifikliği kaybedilmez. Bununla birlikte, rastgele açıl gruplarının yer değiştirmesiyle 2- monogliserit yağ asidi gliserol molekülünün 1 veya 3.

pozisyonuna yağ asidinin yeri değiştirilerek yeniden düzenleme geçirir. Açıl gruplarının yer değiştirmesinin yavaş bir işlem olması ve uygun bir lipazında gliserol 2-mono yağ asidi üzerine etki etmesinden dolayı, hidroliz yavaşlar ve açilin yer değiştirmesi 1 ve/veya 3. pozisyonunda gliseritle lipazın etkileşmesinin tamamlanmasını beklenir (Saxena vd., 1999).

Genellikle, lipazın pozisyonel spesifikliğı, reaksiyon karışımında substrat olarak triolein kullanılarak belirlenir. Hidroliz belirli bir sürede gerçekleştirilir ve sonra ürünler n-hekzanla ekstrakte edilerek ince tabaka kromatografisiyle analiz edilir. Mobil fazla (çözücü sistem) beraber silikajel plaka üzerinde iyoda maruz bırakılarak veya asit püskürtme ve ısıtma yoluyla hidroliz ürünleri noktalar halinde gözükcektir. *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 (Ogino vd., 2000) ve BTID-B lipazın, *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee vd. 2001)'den elde edilen lipazın gliserolün bütün bölgelerindeki ester bağlarını parçaladığı görülmektedir ve bölgeye spesifikliğı yoktur. Diğer bakteriyel lipazlar 1,3 spesifiktir ve son ürün olarak yağ asitleri ve 2- monoolein oluşturular. *Bacillus* sp. THL027 (Dharmstithi vd., 1999) *B. stearothermophilus* 3 zinciri ve *B. licheniformis* 3 zinciri ve *B. subtilis* bir zinciri (Chen vd., 2004) lipazları 1,3 pozisyonel spesifikliğı göstermektedir.

#### **1.4.1.2. Yağ Asidi Spesifikliğı**

Yağ asidi spesifikliğini belirlemek için monoasitler ve trigliseritler kullanılır. Bazen sentetik gliseritlerin kullanılması katı trigliseritlerin mikrobiyal lipazlar tarafından yavaş hidrolizlenmesinden dolayı problem olur (Sugira ve Isobe, 1974). *Streptomyces rimosus*'dan elde edilen mikrobiyal lipazların yağ asidi spesifikliğı değişen alkil zincir uzunluğuna sahip alkilonat esterler kullanılarak çalışılmıştır.

Yağ esterleri hidrolizlemek için mikrobiyal lipazların özelliklerinde bazı farklılıklar vardır. Örneğin; en yüksek hidroliz oranları *S. Rimosus* lipazı tarafından enzimin tercih ettiği orta uzunluklu açıl zincirlerinden pNP-kaprilat(C<sub>8</sub>), pNP-kaprat(C<sub>10</sub>) ve pNP-laurat (C<sub>12</sub>) ile elde edilmiştir. Miristik ve palmitik asidin pNP-esterleri oldukça iyi substratlardır. Fakat pNP-stearat oldukça yavaş hidrolizlenir. Abramic ve arkadaşları (1999) tarafından kısa zincirli ester olan pNP-bütiratın

saflaştırılmış enzimler için iyi bir substrat olduğu rapor edilmiştir. Sinchaikul vd. (2001) tarafından *Bacillus stearothermophilus* P1 lipazının C<sub>8</sub> ve C<sub>12</sub> arasındaki açıl zinciri uzunluğuna sahip substratları hidrolizlediği ve optimum aktiviteyi C<sub>10</sub> pNP-kapat ile gösterdiği rapor edilmiştir. Uzun zincirli substratlarda lipaz aktiviteleri C<sub>8</sub> - C<sub>10</sub> için %70-100 arası, C<sub>12</sub>' den C<sub>18</sub>' e kadar %30 ve 50 iken kısa zincirli substratlarda (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) ise %30'dan daha azdır. Ayrıca lipazlar C<sub>8</sub> ve C<sub>12</sub> arasında açıl grubuna sahip triaçilgliserollerini hidrolizlediğinde optimum aktivite C<sub>8</sub> (trikaprilin)'de gözlenir ve trilinolenin, trilinolein ve trioleinden daha da iyidir.

Kambourova vd. (2003) *B. stearothermophilus* MC 7 lipazının 4 C'ludan 18C'lu trigliseritlere karşı substrat spesifikliğini olduğunu ve en yüksek aktivitenin de tribütirinde gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır. Bu enzim kısa zincirli yağ asitlerini uzun zincirli yağ asitlerinden daha hızlı hidrolizlemektedir. Bununla birlikte, enzim zeytinyağını da (uzun zincirli yağ asitleri içeren) hidrolizleyebilmektedir. Diğer taraftan, *Pseudomonas aeuginosa* LST-03 lipazı da diğer kullanılan trigliseritlerle karşılaştırıldığında en yüksek aktiviteyi trikaproin(C<sub>6</sub>)' de göstermektedir (Ogino vd., 2000). Çeşitli uzunlukta karbon zincirlerine sahip metil esterler arasında enzim en yüksek hidrolitik aktiviteyi metil oktaonata (C<sub>8</sub>) karşı göstermektedir. Ayrıca, uzun zincirli doğal yağlardaki lipaz aktivitesi %55 ve %60'dır ve bunlar oleik asit içeren zeytinyağı ve rikinolein asit içeren kاستor yağıdır. Aktiviteler karşılaştırıldığında en yüksek aktivite temel yağ asidi laurik asit (C<sub>12</sub>) içeren Hindistan cevizi yağında gözlenmiştir. En düşük aktivite ise %12 ile eleostearik asit içeren tung yağında gözlenmiştir.

#### **1.4.1.3. Kısmi Gliserit Spesifikliğı**

Lipazların diğer bir spesifikliğı mono ve digliseritlerdeki yağ asitleriyle olan aktivitesidir. Sakiyama ve arkadaşları (2001) *Pseudomonas* sp. LP7315 lipazının bütün monogliseritlere karşı hidrolitik aktivite gösterdiği fakat bu aktivitenin monogliseritin çeşidine bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. En yüksek aktivite monomiristinde gözlemiştirlerdir. Enzim zeytinyağında bulunan di ve trigliseritleri hidrolizleyememiştir. Bu olgu *Pseudomonas* sp. LP7315 lipazının monogliseritler için tam bir spesifikliğı

olduğunu gösterir. *Bacillus* sp. H-257'den saflaştırılan lipaz en yüksek hidrolitik aktiviteyi monolaurine karşı göstermiştir (Imamura ve Kitaure, 2000).

### **1.5. Lipazların Uygulama Alanları**

Lipazlar biyoteknolojinin değerli enzimleri arasında çok yönlü kullanılan özellikleri ve seri üretim kolaylığından dolayı önemli bir yer teşkil etmektedir (Hasan vd., 2006). Enzimlerin geniş substrat spesifikliğinden dolayı ticari önemi giderek artmaktadır. Bu değerli biyokatalizörler düşük koşullar altında aktivite gösterirler, çeşitli organik çözücülerle yüksek kararlılığa sahiptirler ve kullanıldıklarında çok az atık oluştururlar (Snellmann vd., 2002). Lipazların seçkin karakteristik özelliği yağ-su arayüzeyi için olan ilgisidir. Enzimin yüzey aktivitesi enzimin hidrofobik substratlarla verdiği kataliz reaksiyonun durumunu belirlemek için önemlidir. Çünkü enzim yağ-su arayüzeyinde kalabalık başka proteinlerle yarışmak zorundadır. Trigliseritlerin hidrolizinin katalizlenmesinde, lipazlar zincir uzunluğu ve açıl gruplarındaki çifte bağ durumuna göre, ayrıca da regio ve/veya stereo seçicilik bağlamında seçici olarak bilinirler (Osterberg vd., 1989).

Lipazlar özellikle de mikrobiyel kökenli olanlar, ticari uygulamalarda büyük bir yere sahiptir. Örneğin; gıda katkı maddelerinin üretimi (aroma değişikliği), atık suların işlenmesi (bileşenlerin ayrıştırılması ve uzaklaştırılması), kozmetik (lipitlerin uzaklaştırılması), ilaç (yiyeceklerdeki katı ve sıvı yağların sindirimi), deri sanayisi (hayvan derisindeki lipitlerin uzaklaştırılması) ve medikal ürünler (kan trigliserit tahlili) ticari uygulamalarından bazılarıdır (Kamini vd., 2000). Lipazlar yağlı atıkların ve poliüretanların indirgenmesini hızlandırmak için de kullanılmaktadır (Takamoto vd., 2001). Mikrobiyal lipazların genel uygulama alanları ve etkileme şekli Tablo 3' de özetlenmiştir.

**Tablo 3.** Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları (Vulfson, 1994).

Sanayi Alanı	Etkileme Şekli	Amaç veya ürün
Deterjanlar	Yağların Hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması
Günlük Gıdalar	Süt yağının hidroliz, peynirin olgunlaştırılması, tereyağının modifikasyonu	Sütte, peynir ve tereyağındaki tatlandırıcı etkenlerin geliştirilmesi,
Fırıncılık	Tat geliştirilmesi	Raf ömrünü uzatma
İçecekler	Aroma artırıcı	
Gıda sosları	Kalite artırmak	Mayonez , sos
Sağlıklı gıdalar	Transesterifikasyon	
Et ve Balık	Tat geliştirilmesi	Et ve balık ürünlerinden yağların uzaklaştırılması
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon, hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol, mono- ve diğliseritler
Kimyasallar	Enantiyo seçicilik, sentez	Kiral yapıtaşları, kimyasallar
İlaçlar	Transesterifikasyon, hidroliz	Yağlara özel hazm kolaylaştırıcılar
Kozmetik	Sentez	Emülsifiyer, nemlendirici
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt kalitesini artırmak
Temizleme	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması

Bu geniş uygulamalardan dolayı, arzu edilen özelliklere sahip lipazların üretimi için yeni mikroorganizmalar taranmalıdır. Yapı fonksiyon ilişkilerinin anlaşılması araştırmacılara yeni lipazların biyoteknolojik uygulamalara uyarlanması için olanak sağlayacaktır (Jaeger vd., 1999; Patil vd., 2011).

### 1.5.1. Lipazların Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

Hidrolitik lipazların başlıca ticari uygulamasını toplam lipaz satışının yaklaşık % 32'si olan çamaşır deterjanlarında kullanılması oluşturmaktadır. Termal kararlılık ve alkali ortamlarda aktiviteyi sürdürmek için deterjanların formülasyonlarında lipaz kullanılması gerekmektedir. Lipazlar yağları hidrolizleyebildiği için çamaşır deterjanı endüstrisinde ve ev deterjanlarında katkı maddesi olarak umut verici uygulamalara sahiptir. Lipazlar deterjanlarda bazı koşullarını sağlamak için özellikle seçilmişlerdir:

- 1) Düşük substrat spesifikliğı; çeşitli bileşenlerin yağlarının hidrolizlenmesini gerçekleştirmesi.
- 2) Sert yıkama ortamlarında yıkama yapabilme özelliğı (pH 10-11, 30-60 °C)
- 3) Çoğu deterjanların içeriğinde bulunan zararlı yüzey aktif maddelere ve enzimlere dayanabilme özelliğı.



Novo Nordisk ilk ticari rekombinant lipaz olan “LİPOLAZ”ı 1994 yılında *Thermomyces lanuginosus* mantarında izole etmiştir ve *Aspergillus oryzae*’e ekspres yapmıştır. Bunu takip eden yıllarda, Hindistan Anna Üniversitesi AU-KBC Araştırma Merkezi Yaşam Bilimleri tarafından *P. alcaligenes*’den elde edilen “Lipomax” isimli ve *Pseudomonas mendocina*’dan elde edilen “Lumafast” isimli 2 bakteriyel lipaz ortaya konuldu (Jeager ve Reetz, 1998). Gerritse vd. (1998)’nin raporuna göre *P.alcaligenes* M-1’den üretilen bir alkali lipaz modern yıkama makinelerinde yağ lekelerinin çıkarılması için uygun olduğu görülmüştür. Protein mühendisliği ve çeşitli kaynaklardan taranan kombinasyonun istenilen özellikleri ile elde edilen lipazların değerli birer araç olduğu gösterilmiştir (Yeoh vd., 1986; Wang vd., 1995; Kazlauskas ve Bornscheue, 1998; Cardenas vd., 2001).

Trigliseritlerin kimyasal kullanım alanlarından birisi sabun üretimidir. Bugün için tercih edilen kimyasal yöntemde sabun üretimi, yağın içeriğinden bağımsız olarak 100 °C’ de birkaç dakika içinde yüksek verimde gerçekleşmekte, enerji tüketim döngüsü ile en aza indirgenmektedir. Bu süreç kullanılarak yılda yaklaşık 2 milyon ton sabun üretilmektedir. Japonya’da Miyoshi Yushi fabrikasında sabun üretimi, *Candida rugosa* lipazı kullanılarak katı ve sıvı yağların hidroliz edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Schmid vd., 1998).

### **1.5.2. Lipazların Gıda Endüstrisinde Kullanımı**

Lipazlar substrat spesifikliğı, stereo spesifiklik, bölgesel seçicilik ve fazlar arasında suda çözünen ve çözünmeyen sistemlerde heterojen kısımlarda katalizleyebilme özelliğı gibi mükemmel karakteristik özelliklere sahiptir (Sharma vd. 2002). Esterler gıda endüstrisinde aroma ve tatlandırıcı bileşenlerinde önemli rol oynar (Gandhi vd., 1995; Pandey vd., 1999). Yağ asidinin gliserol iskeletindeki pozisyonu, yağ asidi zincirinin uzunluğu ve doymamışlık derecesi bir trigliseritin besinde istenen ve duyuşal değerlerinin fiziksel özelliklerini belirlemede çok önemlidir. Kakao yağının yerine daha istenen ve nispeten de daha ucuz katı yağların yükseltgenmesi lipaz katalizli transesterifikasyon reaksiyonu ile palm yağındaki palmitik asidin yerine stearik asidin geçmesiyle gerçekleştirilmektedir (Undurraga vd., 2001). Süt şekerleme endüstrilerinde lipazlar süt yağını hidrolizleyerek süt ürünleri, özellikle de farklı uzunlukta karbon

zincirine sahip serbest yağ asitlerinin bir sonucu olarak spesifik aromalı peynirler elde etmek için kullanılır. Ayrıca lipazlar fırıncılıkta ve içeceklerde özellikle lezzeti artırmak için çokça kullanılır (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998).

### **1.5.3. Lipazların Kağıt Endüstrisinde Kullanımı**

Lipazlar kağıt üretimi esnasında selülozlar ve ligninazlarla beraber kullanılır. Kağıt hamurunun lipazla muamelesi verimliliğin artırılması ve kurutma silindirlerinin daha az sıklıkla temizlenmesi, kalitenin yüksek ve sürekli olmasına öncülük eder (Björkling vd., 1991). Lipazlar kağıt yapımı boyunca kağıt hamurundan ziftin (ağacın hidrofobik bileşenleri) uzaklaştırılması için kullanılır. Japonya'daki Nippon sanayisi trigliseritlerin %90'ını hidrolizlemek için fungal bir lipaz olan *Candida rugosa* kullanarak zift kontrol metodu geliştirmişlerdir (Jeager ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001a).

### **1.5.4. Lipazların Biyodizel Üretiminde Kullanımı**

Biyodizel (yağ asidi metil/etil esterleri) trigliseritlerden etanol/metanolle transesterifikasyon yaparak türetilmiş, son on yılda yenilenebilir-dönüştürülebilir olması ve toksik olmaması ile ilgili önemli derecede göze çarpan bir yakıttır. Biyodizel yakıt üretiminde lipaz kullanarak enzimatik transesterifikasyon yapılması çok daha etkilidir. Çünkü gliserol kolay geri kazanılabilen bir ürün olduğu için yağ asidi metil esterlerinin saflaştırılması kolaylıkla mümkündür. Saflaştırma gerektirmeyen, biyokütle taşıyıcı partikülleri içinde immobilize edilmiş tam hücre biyokatalizörlerinin kullanılması üretim maliyetini önemli ölçüde düşürmektedir (Fukuda vd., 2001; Hsu vd., 2002;).

### **1.5.5. Lipazların Ham Yağ Rafinasyonunda Kullanımı**

Fosfolipaz A<sub>2</sub> (*Pyrococcus horikashii* arkelerinden elde edilen) ham yağ rafinasyonunda kullanılmaktadır (Yan vd., 2000). Enzimin optimum sıcaklığı 95 °C, optimum pH' sı 7' dir. Fosfolipaz A<sub>2</sub> yağ rafinasyonu için atık su problemlerini ve maliyet artışını azaltan daha iyi bir etkendir (Klaus, 1998). Termofiliklerden elde edilen lipazların önemi, endüstriyel proseslerde termal kararlılığı ve kimyasal denaturasyon

direncinden dolayı giderek artmaktadır (Lee vd., 1999). Doğal olarak kararlı biyokatalizörler çok kıymetli ve böylece de yeni potansiyel organizmaların sistematik taraması için gereklidir. Alternatif olarak, sahaya mutagenezle dahil edilmiş moleküler klonlama, arzu edilen özelliklere sahip rekombinant enzimler elde etmek için yapılmaktadır (Llonesi, 1999).

### **1.5.6. Lipazların Organik Madde Sentezinde Kullanımı**

Lipazlar organik kimyasalların sentezinde giderek daha da çok kullanılmaktadır. Lipazlar, “kemo”, “regio” ve “stereo seçici” transformasyon reaksiyonlarının birçok çeşidini katalize edebilirler. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır. Bu enzimler hidrofilik-lipofilik ara yüzde çalışırlar ve reaksiyon karışımındaki organik çözücülere tolerans gösterirler (Sharma vd., 2001a).

Lipazlar, su-yağ ara yüzeyinde suya karışmayan trigliseritlerin hidrolizini katalizlerler. Belirli koşullar altında reaksiyon karışımındaki su miktarı, lipaz tarafından katalize edilen reaksiyonun yönünü belirler. Suyun çok az miktarda olduğu ya da hiç olmadığı zamanlarda, yalnızca esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları meydana gelirken su içeriğinin yüksek olduğu koşullarda hidroliz reaksiyonları oluşur (Sharma vd., 2001a).

### **1.5.7. Lipazların Sulu Ortamda Oluşan Biyolojik Dönüşümde Kullanımı**

Ester hidrolizi, iki-fazlı su ortamında lipazlar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. *Pseudomonas cepacia*'dan elde edilen lipazın, n-heptanda bulunan *p*-nitrofenil palmitatı (*p*-NPP) hidroliz ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca çeşitli transformasyon reaksiyonları için hidrofobik sol-jel matrisine tespit edilmiş lipazlar kullanılmıştır (Sharma vd., 2001a).

Lipazların enantiyo seçiciliğini arttırmak üzere, çeşitli mutageniz çalışmaları yapılmaktadır. Örneğin, bir kiral esterinin hidrolizini katalize eden lipazın enantiyo seçiciliği, dört mutasyon döngüsü sonucunda %2' den %81' e kadar arttırılabilmektedir. *Candida parapsilosis*'ten elde edilen lipaz-açıl transferaz, bir yağ asidi olan

hidroksiamik asidin tek fazlı sıvı/sulu ortamdaki biyosentezini katalize eder. Reaksiyon substratları, yağ asidi ya da yağ asidi metil esteri gibi açıl vericileri ve hidroksilamindir. Verici bir esterden, hidroksilamine açıl grubu transferi, serbest yağ asitlerinin reaksiyonuna benzer şekilde kataliz edilmiştir. Bu özellik, *Candida parapsilosis* lipazını sulu ortamda yağların doğrudan biyolojik dönüşümü için seçilen bir enzim haline getirmiştir. Öte yandan, *Burkholderia* sp' den elde edilen ve bir ester olan t-bütüloktonatı (TBO) hidrolize edebilen yeni bir lipaz bulunmuştur. Bu lipazın sahip olduğu hidroliz yeteneğinin, diğer ticari lipazlara oranla 100 kez daha fazla olduğu doğrulanmıştır (Sharma vd., 2001a).

### **1.5.8. Lipazların Rasemik Asit ve Alkol Çözeltilerinde Kullanımı**

Stereo seçici özelliklerinden dolayı lipazlar, birbiriyle karışmayan tek fazlı sistemlerde çeşitli rasemik organik asit karışımlarını çözmek için kullanılmaktadır. Rasemik alkoller aynı zamanda, lipazların kataliz ettiği transesterifikasyon reaksiyonları ile oluşturulan saf enantiyomerler içinde de çözülebilirler.

Başka bir çalışmada *Candida rugosa*' dan elde edilen ham ve saflaştırılmış lipazların, çok az hidrate olmuş hidrofobik organik çözücüde ve tamamen susuz organik çözücüler içindeki davranışı karşılaştırılmıştır. Saflaştırılmış lipazın, kuru n-heptan içindeki aktivitesi, saf olmayan lipaza göre nispeten daha düşüktür. Buna karşın su konsantrasyonunun çok düşük olduğu koşullarda n-bütanollü rasemik 2-(4-lorofenoksi) propanoik asitin esterifikasyonunda, yalnızca saf enzim aktivite göstermiştir.

Mikroorganizmalar ve enzimlerin özellikle rasemik karışımları sonlandırmak için kullanışlı oldukları kanıtlanmıştır. Böylece saf (S)-ibuprofen, lipazın katalize ettiği hidroliz ya da esterifikasyon reaksiyonu aracılığıyla elde edilmiştir. Benzer bir şekilde 2-fenoksipropanol; *Pseudomonas* sp. lipazı kullanılarak ve enantiyo seçici transesterifikasyon reaksiyonu yoluyla kendi enantiyomerleri içinde çözülmüştür (Sharma vd., 2001a).

### **1.5.9. Lipazların Bölge Seçici Açılışında Kullanımı**

Lipazlar bazı steroidleri, şeker ve şeker türevlerini yüksek bir bölge seçiciliği ile açillerler. Monoaçillenmiş şekerler, trietil karboksilatlar ve çeşitli monosakkaritlerden, susuz piridin içinde üretilirler. *Aspergillus niger*'den elde edilen lipazın, bir açılışon reaksiyonunun aksine, preaçillenmiş metil  $\beta$ -D-glikopiranozitin, bölge seçici deaçılışonunu katalizlediği saptanmıştır (Sharma vd., 2001a).

### **1.5.10. Lipazların Ester Sentezinde Kullanımı**

Lipazlar esterlerin sentezinde etkin katalizörler olarak kullanılmaktadır. Kısa zincirli yağ asitlerinden elde edilen esterler, gıda endüstrisinde tatlandırıcı ve lezzet artırıcı olarak, uzun zincirli yağ asitlerinin metil ve etil esterleri ise, dizel yakıtları zenginleştirmede kullanılmaktadır. Literatürde *Candida antarctica*' dan elde edilen lipaz ile hekzan içinde gerçekleştirilen, alkol ve laktik asit esterifikasyon çalışmaları yer almaktadır (Sharma vd., 2001a).

### **1.5.11. Lipazların Oleokimya Endüstrisinde Kullanımı**

Mevcut oleokimyasal endüstri sektöründe karışık substratları kullanarak çeşitli reaksiyonları (hidroliz, alkololizis ve gliserolizis gibi) başlatmak için immobilize lipazların kullanılması gerekmektedir. Böylece, immobilize enzimlerin kullanılması verimlilik gibi süreçlerin sürekli olmasını da sağlar. Bu durum yağların başarılı bir şekilde ayırma yada modifikasyonu için büyük termal enerji kullanmamanın yanında önemli pahalı ekipmanlar olmadan da yapılabileceği için umut vericidir. Oleo kimya endüstrisinde lipaz kullanılmasının hidroliz, gliserolizis ve alkololizis sırasında termal bozulmayı en aza indirdiğemesi ve enerji tasarrufu sağlaması açısından önemi büyüktür (Sharma vd., 2001a).

### **1.5.12. Lipazların Biyosensörler Olarak Kullanımı**

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir sensörü bulunan ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir

biyosensörün amacı, analiz edilecek madde miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. Biyosensörler; doğada biyolojik, kimyasal, biyokimyasal ve elektronik bileşenlerden oluşur. Biyosensörlerin bileşenleri arasında; enzimler, antikorlar, proteinler, hücreler, hücre özütleri, immobilize ya da bağlı konumda uygun sinyal üreticileri yer alabilir. Katı ve sıvı yağ endüstrisinde, gıda teknolojisinde ve klinik uygulamalarda, triaçilgliserol miktarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Analiz için kullanılan kimyasal yöntemler pahalı ve zaman alan tekniklerdir. Son zamanlarda mikrobiyal lipazların biyosensör olarak kullanımı umut verici bir gelişme olarak görülmektedir. Lipazların önemli analitik kullanımlarından biri lipit miktarının klinik amaçlı olarak belirlenmesidir. Temel prensip lipaz kullanarak triaçilgliserolden gliserol oluşturmak ve serbest gliserol veya alternatif olarak da esterleşmemiş yağ asidi miktarını kimyasal ve enzimatik yöntemlerle belirlemektir. Spesifik olmayan lipazlar özellikle de *C. rugosa*' dan elde edilmiş yüksek spesifik aktiviteye sahip lipaz gliserolün kısa sürede serbest kalmasını sağlamak için seçilmiştir. DNA içinde biyo tanıma grubuna optik olarak bağlanan *C. rugosa* lipaz biyosensörü bir prob olarak geliştirilmiştir.

Biyosensör bileşeni olarak lipazlar tıptaki uygulamaların yanı sıra, gıda ve içecek endüstrisinde, kirlilik ve pestisit kalıntılarının analizinde de kullanılırlar (Pandey vd., 1999).

### **1.5.13. Lipazların Pestisit Üretiminde Kullanımı**

Lipazların kullanımı, maliyeti ve çevresel kirlenmeyi azaltma potansiyeli taşıdığından, kimyasal madde üreticileri, bu enzimlerden pestisit üretimi ve çeşitli yeni ürünlerin/süreçlerin geliştirilmesi için yararlanma çabasına girmişlerdir. Aktivitesini uzun süre koruyan immobilize lipaz formlarının kullanılması maliyeti de düşürmektedir. Son zamanlarda, lipaz uygulamaları ile üretilen çeşitli pestisitler (insektisitler, herbisitler, fungusitler ve onların öncülleri) kullanılmaktadır. Lipazların pestisitlerin ve optik olarak aktif bileşiklerin üretimine yönelik kullanımları, en önemli uygulama alanları arasında yerini almaktadır. Bu bileşikler genellikle, karboksilik esterler ya da alkollerin rasemik karışımlarının çözeltilerinden üretilirler (Pandey vd., 1999).

#### **1.5.14. Lipazların Deri Endüstrisinde Kullanımı**

Deri işlemeciliğinde; deri altındaki yağların uzaklaştırılması ve kılların yok edilmesi gerekir. Lipaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimleri içeren enzim kombinasyonlarıyla, deri işlenmesinde yeni bir yol açılmaktadır. Derinin, içinde su bulunan bir küvete alınarak yıkanması ve kıllarından arındırılmasını içeren yeni bir enzimatik yöntemle, deri tabaklamaya hazır hale getirilmektedir. Ortam pH'sının 8.0-13.0 aralığında olduğu küvetlerde, alkali lipaz kullanılmaktadır. Bu işlemde suya batırma, yıkama, kıldan arındırma basamaklarında bir çeşit yüzey aktif ajan (tensit) kullanılarak, deterjan kullanımı en düşük seviyeye indirilir. Tabaklama işlemleri genellikle bazik ortamda yapılır. Bu yüzden alkalofilik mikroorganizma kaynaklı enzimler, bu tip uygulamalarda daha yararlı olmaktadır. Yüksek alkali koşullarda büyüeyebilen ve enzimleri deri işlenmesinde kullanılmak üzere elverişli olan birçok *Bacillus* türü bulunmuştur. Alkalen lipazlar; alkalen/nötral proteazlar ve sürfaktan içeren bir karışım içinde kullanılabilirler (Pandey vd., 1999).

#### **1.5.15. Lipazların Çay İşleme Prosesinde Kullanımı**

Siyah çayın kalitesi büyük ölçüde dehidrasyon, mekanik kırma ve çay sürgünlerinin maruz kaldığı enzimatik fermantasyona bağlıdır. Siyah çay üretimi esnasında, membran lipitlerinin enzimatik bozulması karakteristik tatları olan uçucu ürünlerin oluşumunu başlatır ki bu da lipitlerin lezzet geliştirmedeki önemini gösterir. *Rhizomucor miehei*' den elde edilen lipazın toplam lipit içeriğini azaltarak çoklu doymamış yağ asidi seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Latha ve Ramarethinam, 1999).

#### **1.5.16. Lipazların Teşhis Aracı olarak Kullanımı**

Lipazlar medikal sektöründe oldukça önemli markır enzim veya ilaç hedefleridir. Bunlar tanı araçları olarak kullanılabilirler ve varlıkları ya da artan seviyeleri bazı enfeksiyon veya hastalıkların belirtisi olabilir. Lipazlar sonradan enzim bağlantılı kolorimetrik reaksiyonlarıyla belirlenen gliserol üretmek için serumdaki trigliserit miktarının belirlenmesinde kullanılır. Kan serumundaki lipaz miktarı akut pankreatik

iltihabı veya pankreatik yaranlanma gibi hastalıkların tespiti için bir tanı aracı olarak kullanılabilir. Akut pankreatit iltihabı genellikle alkol kullanımı ya da safra kanalı tıkanıklığı sonucu oluşur. Serum tripsin düzeyi ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ve endoskopik pankreatikografi en doğru laboratuvar göstergeleri olmasına rağmen serum amilaz ve lipaz düzeyleri hala akut pankreatit tanısı onaylamak için kullanılır (Lott ve Lu, 1991; Munoz ve Katerndahl, 2000). Kronik pankreatit iltihabı ve ekzokrin pankreas yetersizliğinin varlığı serum amilazı, pankreatik izoamilaz, lipaz, tripsinojen ve elastaz miktarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Patojenik bakteriler olan *P. acnes*, *Corynebacterium acnes* ve *Staphylococcus* elde edilen lipazın akneli hastalarda deri döküntüsüne oldukça etkili olduğu bulunmuştur (Simons vd., 1996; Pezzilli vd., 2000; Higaki vd., 2000).

#### **1.5.17. Lipazların Çevre Yönetiminde Kullanımı**

Atıkların yok edilmesi için yapılan biyoremediasyon (toprak ya da suda meydana gelen kalıntıların, çeşitli organizmalar veya ürettikleri enzimler sayesinde uzaklaştırılması) işlemlerinde lipazın kullanılması lipaz biyoteknojisinde yeni bir yöntemdir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen lipazlar yardımıyla, yağ işleme fabrikalarının ve restoranların atıkları temizlenebilmektedir. Bu sektörde lipazlar *ex situ* veya *in situ* olarak kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999). Endüstrideki gözlenen hızlı gelişmeden dolayı çevresel kirlilik gittikçe kritik bir hal almıştır. Lipaz üreten suşlar kirliliğin ıslahında önemli rol oynamıştır. Soğuğa adapte olmuş lipazlar atık suların işlenmesinde, bioremediasyonda ve aktif bileşiklerin soğuk şartlardaki sentezinde büyük bir potansiyele sahiptir. Mevsimsel büyük sıcaklık değişimleri lipit ve petrol gibi kirletici maddelerin giderilmesinde mikroorganizmaların etkisini azaltmaktadır. Ilık ve düşük sıcaklıklarda aktif olan enzimler biyoremediasyon işlemi için ideal olabilirler (Buchon vd., 2000; Ramteke vd., 2005; Lin vd., 2012).

#### **1.5.18. Lipazların Kozmetik ve Parfüm Endüstrisinde Kullanımı**

Yüzey aktif maddelerde ve koku üretiminde aktivite gösterdiklerinden dolayı lipazlar kozmetikte ve parfümeride potansiyel uygulamalara sahiptir. Retinoidler cilt bakım ürünleri gibi ilaç ve kozmetikte büyük bir ticari potansiyele sahiptir. Suda



çözünür retinol türevleri immobilize lipazların kataliz reaksiyonuyla hazırlanmıştır (Metzger ve Bornscheuer, 2006; Maugard vd., 2002).

### **1.5.19. Lipazların Medikal Uygulamalarda Kullanımı**

Bal mumu güvesinden (*Galleria mellonella*) izole edilen lipazların *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) H37R üzerinde bakteri öldürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu ön çalışma, ilaçlarda yeni gelecek vaat eden kaynaklar tespit etmek için, biyolojik ve diğer maddelerin küresel seçilmemiş taramasının bir parçası olarak kabul edilebilir. *Candida rugosa* lipazı serum kolesterol seviyesini düşüren bir ilaç olan lovastatin sentezinde kullanılmaktadır.

Yaygın olarak kullanılan bir koroner damar genişletici olan diltiazem hidroklorür sentezinde bir anahtar ara madde olan 3-fenilglisidik asit esterinin asimetrik hidrolizi *S. mmecens* ile gerçekleştirilmiştir (Annenkov vd., 2004).

## **1.6. Termofilik Mikroorganizmalar**

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar, diğerlerinin büyümediği veya çok az büyüme gösterdikleri şartlarda büyüme kapasitesine sahip olduklarından, çevre etkenleri ile mikrobiyal hayat arasındaki ilişkilerin araştırılmasında önemli bir potansiyel oluştururlar.

Dünya nüfus artışına, sanayi ve endüstri gelişimine bağlı olarak, çevre giderek kirlenmekte ve dünyadaki doğal şartlar ekstrem şartlara doğru kaymaktadır. Dolayısıyla insanlık, son yıllarda ekstrem durumlardaki hayat şartlarının araştırılması yolunda yoğun çalışmalara girmektedir (Goyal vd., 2005).

Termofilik bakterilerin ilk izole edilmesinden bu yana yaklaşık olarak 100 seneden fazla bir zaman geçmiştir (Miquel, 1988). O yıllardan beri çok sayıda spor oluşturabilen *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait termofilik bakteri türleri ortaya çıkarılmış ve özellikleri belirlenmiştir. Üzerinde en çok çalışma yapılan termofilik bakteri türü *Bacillus steorothermophilus* olup, bu türün çok sayıda farklı suşu izole edilmiş ve bu

suşların birçok özelliği belirlenmiştir. Ancak elde edilen bu bakterilerin hepsinin genellikle optimum olarak yaşayabildikleri sıcaklık 60 °C'dir. Bununla birlikte çalışılan çok az sayıda termofilik bakteri türünün 75 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabildiği bilinmektedir (Guagliardi vd., 1996).

Termofilik organizmaları da içine alan ekstremofilik organizmalar yüksek sıcaklık, aşırı pH, yüksek tuz konsantrasyonlu ve yüksek basınçlı ortamlarda yaşamaya uyum sağlamışlardır. Bu organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerde etkin olarak kullanılan aşırı şartlarda bile görev yapabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir (Guagliardi vd., 1996).

Bu enzimler son zamanlarda endüstride kullanılan ve kirlenmeye neden olan bazı kimyasalların yerine kullanılabilirler. Bu endüstrilerin en göze çarpanları kağıt ve kağıt hamuru endüstrileridir. Ayrıca termofilik enzimlerin yoğun bir şekilde kullanılmaya başlandığı diğer bir alan ise besin endüstrisidir (Aguilar, 1996).

Endüstride çoğu enzimatik ve mikrobiyolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda yapılması önemli faydalar sağlamaktadır. Böylece yüksek sıcaklıkta işlemin kararlı olmayan bileşikler tarafından engellenmesi önlenmiş olur. Yüksek sıcaklığın başlıca avantajları, daha yüksek reaksiyon hızı, çoğu kimyasalın daha yüksek oranda çözünebilmesi, akıcılığın ve difüzyon hızlarının yüksek olmasıdır (Kristjansson, 1989).

Bakteriler yaşayabildikleri sıcaklık aralığına göre sakrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Sakrofiller -10 °C' ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayabilirler ancak bunların optimum olarak büyüebildikleri sıcaklıklar 15 °C civarındadır. Mezofiller normal ortam sıcaklığında (20-45 °C) büyüebilirler ve insanlar için patojen olan mikroorganizmalar bu gruba girerler. Termofiller ise 45 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hatta kaynar sularda bile yaşayabilirler (Brock, 1985).

Dünya üzerinde yaşayan bütün bakterilerin atalarının termofilik bakteriler olduğu öne sürülmektedir (Madigan vd., 2000). Bu görüşün dayandığı nokta şu anda dünya üzerinde yaşayan termofilik bakterilerin mezofil ortamlara kolay bir şekilde adapte olabilmesidir. Bu görüşlerde göz önüne alınarak termofiller temelde ikiye ayrılırlar.

Atasal termofiller (örneğin; *Thermotoga*, *Aquifex*), var oldukları günden bugüne kadar devamlı olarak termofilik olarak yaşamaktadırlar ve hiçbir şekilde mezofilik ortamlara adapte olamazlar. Sonradan termofilik olanlar (örneğin, *Bacillus* ve *Clostridium*), mezofiller ile devamlı ilişki halindedir ve bu grupta bulunan mezofilik türler değişerek tekrar termofilik özellik kazanabilirler. Bu türlerde termofilik ortamlara tekrar adaptasyon söz konusu olduğundan bunlar üzerinde, termofilliğin moleküler temelleri hakkında çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Termofilik bakteri suşlarının optimum büyüebilme sıcaklıklarının 55 °C' den 105 °C' nin üstüne kadar olan sıcaklıklara kadar değiştiği bilinmektedir. Bu şekilde çok yüksek sıcaklıklarda yaşayan termofilik mikroorganizmalar aşırı termofiller veya çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadır ve bu organizmaların optimum büyüme sıcaklıkları 80 °C' nin üzerinde olduğu bilinmektedir. Termofilik bakteriler tabii olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda, çöplerde vb. yerlerde bulunurlar (Kristjansson ve Stetter, 1992).

45 °C' nin üstüne çıkıldığında mikrobiyal türlerin sayısı önemli bir şekilde düşüş gösterir, fakat bütün organizmaların yaşayabildikleri üst sıcaklık limitleri halen tam anlamıyla bilinmemektedir. Son zamanlarda birkaç tane mikroorganizmanın, sıcaklığı çok yüksek olan kaplıca sularında ve deniz diplerindeki sıcaklığı 100 °C' nin üzerinde olan alanlarda yaşadığı bilinmektedir (Kristjansson ve Stetter, 1992).

Denizlerin alt kısımlarında sıcak su alanlarının olduğu fakat bu alanların mikrobiyolojisi hakkında fazla bilginin olmadığı bilinmektedir. 115 °C' ye kadar yaşayabilen kültüre alınmış bakteriler bulunmaktadır. Ancak hidrotermal çevrelerde 135°C' ye kadar yaşayabilen organizmaların olduğunu gösteren deliller bulunmaktadır. Bu sıcaklık sınırı hayatın olabileceği üst sıcaklık limitini göstermektedir. Çünkü bu sıcaklıkta amino asitler büyük oranda *L* formundan *D* formuna dönerler. 70 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayan tür sayısı az olmasına rağmen, filogenetik olarak farklı çok sayıda kategorideki prokaryotların bu sıcaklıklarda yaşadığı bilinmektedir (Kristjansson ve Stetter, 1992).

### **1.6.1. Termofillerin Yüksek Sıcaklıklara ve Denaturasyona Karşı Dayanıklılıkları**

Mikroorganizmalar, yaşayan tüm canlılar gibi canlılıklarını sürdürebilmek için yaşadıkları ortama adapte olmak zorundadırlar. Termofillerin içerdikleri proteinlerin yüksek sıcaklığa, denaturasyona ve proteolize karşı dayanıklı oldukları bilinmektedir (Kumar ve Nussinov, 2001). Şaperonlar olarak bilinen özelleşmiş proteinler, bu organizmalar tarafından bolca üretilir ve bunlar denaturasyondan sonra proteinlerin tekrar doğal formlarında katlanmasına ve fonksiyonlarını tekrar kazanmalarına yardımcı olurlar (Everly ve Alberto, 2000). Termofillerin hücre membranları doymuş yağ asitlerinden oluşmuştur. Doymuş yağ asitleri hücreye hidrofobik bir ortam sağlar ve bu durum yüksek sıcaklıklarda hücrenin yaşama şansını artırır (Herbert ve Sharp, 1992). Termofillerde derevers DNA giraz yardımıyla oluşturulan süper sarmal DNA yapısı mevcuttur (Lopez, 1999). Bu, DNA'nın çift sarmal yapısının bozulma noktasını en azından organizmanın çoğalma sıcaklığına kadar yükseltir. Ayrıca termofiller, ısıl dayanıklılığı olmayan organizmalarla elektrostatik, disülfür köprüleri ve hidrofobik etkileşimlerini arttırarak yüksek sıcaklığa dayanıklı hale gelebilirler (Kumar ve Nussinov, 2001).

### **1.6.2. Termofilik Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı**

Termofilik organizmalar, biyoteknoloji açısından büyük faydalar sağlamaktadır (Brock, 1986). Termofillerin biyoteknolojide kullanıldığı bazı alanlar Tablo 4' de verilmektedir. Termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretiminin mümkün olması, fermentasyon yapabilen bu organizmalar kullanılarak genetik manipulasyonların yapılabilmesi ve termofil enzimlerin potansiyel olarak endüstride kullanılmasıdır. Biyoteknoloji açısından termofilik organizmaların en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardakinden çok daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretmeleridir. Buna ilave olarak, termofillerden elde edilen enzimler, normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklıdırlar ve bu yüzden bunlardan elde edilen ürünler daha uzun ömürlüdürler (Brock, 1986).

**Tablo 4.** Termofilik organizmalarından elde edilen bazı enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik uygulamalar (Aguilar, 1996).

Enzimler ve biyoteknolojide kullanılan hücre içi bileşikler	Uygulamaları ve ürettikleri son ürünler
Amilazlar	Tatlandırıcılarda kullanılan glukoz,fruktoz
Ksilanazlar	Kağıt ağartılması
Proteazlar	Keratinden amino asitlerin üretimi, besin işlenmesi, fırıncılık, mayalanma ve deterjan endüstrilerinde
DNA Polimerazlar	Genetik mühendisliği
Katalaz	Deri, tekstil, kağıt, gıda, ilaç endüstrilerinde

Termofilik organizmaların, çeşitli endüstriyel işlemlerin meydana getirilmesinde etkin olarak kullanılan ekstrem şartlarda fonksiyonel olabilen özel biyokatalizörleri yani enzimleri ürettikleri bilinmektedir. Bu enzimlerden bazıları son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp mezofilik konaklarda ekspres edilmiştir. Bu enzimlere örnek olarak, DNA polimerazlar, ekstrasellüler-polimer-parçalayan enzimler (amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikozil transferazlar, selülazlar, ksilanazlar, kitinazlar, proteazlar), gıda, kimya, farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan DNA'yı modifiye edebilen enzimler verilebilir. Bu enzimler aynı zamanda çok sayıdaki farklı deterjan ve çözücülere karşı da dirençlidir (Aguilar, 1996).

Termofilik enzimlerin en çok kullanıldığı alanlardan birisi de karbohidratların türevlendirilmesidir. Bununla birlikte halen bu modifikasyon işlemini daha spesifik ve daha etkili bir şekilde katalizleyebilecek enzimler üzerindeki araştırmalar devam etmektedir. Son zamanlarda, karbohidratlara bağımlı olan endüstri kollarında ilave özelliklere sahip olan enzimlere, özellikle de termofilik enzimlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Karbohidratları modifiye edebilen enzimler, kâğıt endüstrisinde olduğu kadar besin endüstrisinde de hidroliz olaylarının meydana getirilmesinde kullanılmaktadır (Priest, 1984). Ayrıca bu enzimler karbohidratlara bağımlı olan bazı bileşiklerin türevlendirilmesinde ve sentezlerinde de aktif olarak yer almaktadır. Bu enzimlere amilazlar, pullulanazlar,  $\alpha$ -glukozidazlar, siklodekstrin glikoziltransferazlar, glukoz izomerazlar, ksilanazlar ve lipazlar örnek olarak verilebilir (Aguilar, 1996).

## 1.7. Isıl Kararlı Enzimler

Termozimler olarak da adlandırılan termofilik ve hipertermofilik enzimler, ekstremofillerden elde edilen ve ekstremozimler olarak adlandırılan diğer bir enzim sınıfının üyesidirler (Vieille vd., 1996). Termozimler, mezofilik enzimlerin veya kimyasalların yerini alarak, birçok endüstriyel uygulamada kullanılabilirler. Bu durum, proseslerin optimize edilmesinde yeni avantajlar sağlamaktadır (Bruins vd., 2000). Ekstremozimler yüksek tuz içeren ortamlarda (halozimler), yüksek alkali ortamlarda (alkalozimler) ve diğer uç şartlarda (basınç ve asitlik vb.) fonksiyon gösterebilirler (Lowe vd., 1993; Adams vd., 1995). Isıl kararlı enzimler (termofilik ve hipertermofilik enzimler) zorlu endüstriyel uygulamalara en iyi uyumu sağladıklarından ve sahip oldukları özelliklerden dolayı (yüksek sıcaklıklarda kararlı ve aktif olmaları), mezofilik veya sakrofilik enzimlere oranla çok daha büyük biyoteknolojik avantajlara sahiptirler (Leushner ve Antranikan, 1995; Fredrich ve Antrakian, 1996; Vieille ve Zeikus, 2001; Li vd., 2005). Bu avantajlar şu şekilde ifade edilebilir;

-Mezofilik konakçılarda ekspres edildiklerinde ısı muamelesi ile saflaştırılmaları çok kolaydır.

- Denatüre edici kimyasallara (bir çözücü veya guanidinyum hidroklorür gibi) karşı dirençli olmaları, ısıl kararlılıkları ile ilişkilendirilir.

-Enzimatik reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi ile yüksek konsantrasyonda substrat kullanımı, daha düşük viskozite, daha az mikrobiyal kontaminasyon riski ve genellikle daha yüksek reaksiyon hızları elde edilir (Vieille ve Zeikus, 2001).

-Reaksiyonun yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesiyle viskozitenin azalması substrat difüzyonunun artmasıyla birlikte ürün oluşumu da artar. Bu gibi enzimler ayrıca protein mühendisliği için önemli olan ısıl kararlılığın ve aktivitenin anlaşılmasında model olarak kullanılabilirler (Mozahev, 1993; Krahe vd., 1996).

Biyokatalitik çevrimlerde ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan ısıl kararlı enzimlerin bazıları Tablo 5’ de gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Isıl kararlı enzimlerin biyoçevrim reaksiyonları ve uygulamaları.

Enzim	Sıcaklık aralığı (°C)	Biyoçevrim	Uygulama
$\alpha$ -Amilaz (Bakteriyal)	90-100	Nişasta→Deksroz Şurup	Nişasta hidrolizi, fırıncılık, deterjan
$\alpha$ -Amilaz (Mantar)	50-60	Nişasta→Deksroz Şurup	Maltoz üretimi
Pullulanaz	50-60	Nişasta→Deksroz Şurup	Glukoz şurubu üretimi
Kitinaz	65-75	Kitin→Kitibioz	Gıda, kozmetik, eczacılık
Selulaz	45-55	Seluloz→Glukoz	Seluloz hidrolizi, deterjanlarda polimer parçalanması
Lipaz	30-70	Yağ uzaklaştırılması, hidrolizi, interesterifikasyon	Eczacılık, kozmetik, deri endüstrisi

Filogenetik çeşitliliklerin dışında, hipertermofilik ve mezofilik enzimleri ayıran tek şey kararlı ve aktif oldukları sıcaklık aralıklarıdır. Diğer bir deyişle, hipertermofilik ve mezofilik enzimler birbirlerine oldukça benzerlik gösterirler. Şöyle ki;

- Hipertermofilik ve mezofilik proteinlerin aminoasit sıraları tipik olarak %40-85 oranında benzerlik gösterirler.
- Bu proteinlerin üç boyutlu yapıları birbiri üzerine çakışabilmektedir.

### 1.8. Lipaz Kaynakları

Lipazlar canlı organizmalarda fizyolojik olarak gerekli olduğu için bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklarda bulunabilirler. Bunlar bakteri, mantar ve mayalarda bol miktarda bulunur (Haki ve Reakshit, 2003).

Lipolitik enzimler bitki aleminde oldukça dağınıktır. Bitki kaynaklı lipazlarla ilgili bilgilere göre memeli ve mikroorganizmaların lipazlarıyla karşılaştırıldığında sınırlı olduğu görülmektedir (Vulfson, 1994). Bitkilerde şimdiye kadar çalışılan lipazların birçoğu membrana bağlı olarak incelenmiştir. Mısır, kanola ve hint yağı kaynaklı lipazlar çözünür bir şekilde, tamamen veya büyük ölçüde saf olarak elde edilmiştir (Vulfson, 1994).

Memelilerde lipolitik enzimler üç gruba ayrılır: özel organlar tarafından sindirim görevli boşaltım lipazları, doku lipazları ve süt lipazları olmak üzere üç gruba ayrılır

(Gargouri vd., 1989). Memelilerin kalp, beyin, kas, böbrek, dalak, akciğer, karaciğer, adipoz doku ve serum gibi birçok doku ve organlarında lipaz bulunur (Vulfson, 1994).

Mikrobiyal ekstraselüler lipazlar genellikle bitki ve hayvan lipazlarından daha iyi termal kararlılığa sahiptir. Özellikle termofiliklerden elde edilen lipazlar ısıya ve kimyasal denaturasyona dayanıklı oldukları için endüstriyel proseslerde önemli rol oynarlar (Lee vd., 1999). Ayrıca lipazların büyük bir çoğunluğu da mezofilik kaynaklardan elde edilmiş ve optimum aktivite sıcaklığı 35-40 °C arasında olduğu görülmüştür (Sigurgísladóttir vd.,1993). Son zamanlarda *Geobacillus* sp. T1 (Leow vd., 2004; Rahman vd., 2005), *Bacillus* sp. RSJ-1 (Sharma vd., 2001a), *Bacillus thermoleovorans* ID-1(Lee vd., 1999), *Bacillus* sp. THL027( Dharmstithi ve Luchai, 1999), *Bacillus thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert, 1994), *Bacillus* sp. Strain A30-1(Wang vd. 1995), *Bacillus* sp. Strain 398 (Kim vd., 1994), *Bacillus* spp. (Sugihara vd., 1991; Handelsman ve Shoham, 1994; Becker vd.1997; Llarch vd. 1997; Nawani vd., 1998), *Pseudomonas cepacia* (Sugihara vd., 1991), *Pseudomonas* sp.(Kulkarni ve Gadre, 1999) gibi mikroorganizmaların lipaz ürettiği rapor edilmiştir. Bunun dışında orta dereceli mezofilikler de termofilikler gibi termal kararlılığa sahip enzimler için iyi bir kaynak olarak kullanılabilir (Fakhreddine vd., 1998). Tablo 6' da ticari olarak önemli bazı mikrobiyal lipaz kaynakları ve üretici firmaları listelenmiştir.

**Tablo 6.** Ticari olarak önemli mikrobiyal lipaz kaynakları ve üretici firmalar (Jaeger ve Reetz, 1998).

Tip	Kaynak	Uygulama	Üretici firma
Fungal	<i>C. rugosa</i>	Organik sentez	Amano, Biocatalysts, Boehringer, Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>C. antarctica</i>	Organik sentez	Boehringer, Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosus</i>	Deterjan katkı maddesi	Boehringer, Mannheim, Novo Nordisk
	<i>R. miehei</i>	Gıda prosesleri	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bakteriyel	<i>Burkholderia cepacia</i>	Organik sentez	Amano, Fluka, Boehringer, Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Deterjan katkı maddesi	Genencor
	<i>P. mendocina</i>	Deterjan katkı maddesi	Genencor
	<i>Ch. viscosum</i>	Organik sentez	Asahi, Biocatalysts



## 1.8.1. Mikrobiyal Lipazlar

### 1.8.1.1. Bakteriyel Lipazlar

#### 1.8.1.1.1. Pseudomonas Lipazlar

*Pseudomonas* spp. lipazının saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine yoğunlaşmış bir çok araştırma bulunmaktadır (Ogino vd., 2000; Dong vd., 1999; Sharon vd., 1998; Chartrain vd., 1993; Gilbert vd., 1991).

Schuepp ve arkadaşları (1997) *Pseudomonas fragi* CRDA 037 suşunun kesilmiş süt suyunda büyütüldüğünde ekzo- ve endolipazlar ürettiğini gözlemlemişler. Bunlar exolipazlar için %20-40, endolipazlar için de %20-60 doygunlukta amonyum sülfatla çöktürme yöntemiyle kısmi saflaştırılmış lipaz ekstraktları elde etmişlerdir. Doğal PAGE'de exolipazın varlığını gösteren büyük protein bandı 25.5 kDa molekül ağırlığına tekabül ederken endolipaz varlığını gösteren üç fraksiyonun ise 35.5, 49 ve 70 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ekstrasellüler *Pseudomonas* lipazı alginat ile etkileşim yapabilmektedir. Bu gözlemlere dayanarak *Pseudomonas aeruginosa* suşundan endolipazın hızlı, basit ve ucuz olarak konsantre edilmesi, stabilizasyonu ve kısmi saflaştırılması için prosedürler geliştirilmiştir (Wingender vd., 1987). Wingender ve arkadaşlarının araştırması lipazların hızlı bir şekilde hücre kültürü olmayan ortamdan etanolik alginatla çöktürerek elde edilebileceğini göstermiştir (Orijinal ekzolipazın yaklaşık % 95'i birlikte çökmektedir). Elde edilen çökelek deterjan içeren tamponda çözüldükten sonra exolipaz ve polisakkaritler iyon değişim kromatografi kolonu DEAE-Sefadeks A-25 ile kolayca ayrılabilir. Bu birlikte çöktürme yöntemi *Pseudomonas* spp. ve *C.viscosum*'dan ekzolipaz elde etmek için başarı ile uygulanmıştır.

Alkalofilik *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 'den ekstra selüler bir alkali lipazı aseton çöktürmesi ile homejenize edildikten sonra Sefadeks G-100, Fractogel phenyl 650 M ve Sefadeks G-100 kolonları kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 32 kDa ve pI değeri de 7.3 olarak ortaya koyulmuştur (Lin vd.,

1996a). Yeo vd. (1998) tarafından bir t-butil oktanoat (TBO)-hidrolize hücre içi lipazı *Burkholderia* spp hücresiz özütünden saflaştırılmıştır. Enzim; amonyum sülfat çöktürmesinin ardından sırasıyla üç ardışık açık kolon kromatografisi ve iki HPLC kullanılarak 74 kat saflaştırılmıştır. Kullanılan kromatografi kolonları DEAE anyon değişimi dahil, Sepharose CL-6B jel filtrasyon ve ikinci bir DEAE anyon değiştirme kromatografi kolonlarıdır. Çeşitli *Pseudomonas* lipazlarının saflaştırılmasında kullanılan farklı yöntemler ve bazı bulgular Tablo 7' de sunulmuştur.

**Tablo 7.** Çeşitli *Pseudomonas* lipazlarının saflaştırma yöntemleri

<i>Pseudomonas</i> spp	Saflaştırma Aşamaları	% Verim - Saflaştırma katsayısı	Molekül Ağırlığı (kDa)	Referans
<i>Pseudomonas fragi</i>	Asitlendirme, Fraksiyonlu A. sülfat çöktürmesi, DEAE-Toyopearl 650 M ve DEAE-Sepharose CL-6B	% 48- 68	33	Nishio vd., 1987
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A.Sülfat çöktürmesi, DEAE-cellulose ve octyl-Sepharose CL-4B	% 21- 3390	45	Sztajer vd., 1992
<i>Pseudomonas</i> spp. ATCC 21808	Q-Sepharose, octyl-Sepharose ve Enzimin izopropanolle elue edilmesi	% 56-159	35	Kordel vd., 1991
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Sıvı- sıvı ekstraksiyonu (10% PEG 6000 ve 10% Dextran 500), Q-Sepharose	% 30 – 55	58	Dunhaupt vd., 1991
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Polioksietilen deterjan C14EO6- Sulu bazlı iki fazlı bölümlenme	% 76 – 24	60	Terstappen vd., 1992
<i>Pseudomonas putida</i> 3SK	DEAE-Sefadeks A-50 ve Sefadeks G-100	% 21 – 5,3	45	Lee ve Rhee, 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ultrafiltrasyon, A. Sülfat çöktürmesi, DEAE-Toyopearl 650 M ve Phenyl-Toyopearl 650	% 42 – 6,1	33	Kojima vd., 1994
<i>Pseudomonas</i> spp. Yo103	A.Sülfat çöktürmesi, DEAE-cellulose ve Sefadeks G-200	% 3,7 – 62	38	Kim vd., 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A. Sülfat çöktürmesi, hidroksiapatit kolon kromatografisi	518	30	Sharon vd., 1998

#### 1.8.1.1.2. *Staphylococcus* lipazlar

Bir çok araştırmacı tarafından farklı *Staphylococcus* lipazlarının özellikleri ve saflaştırılması rapor edilmiştir (Muraoka vd., 1982; Tyski vd., 1983; van Oort vd., 1989; Gotz, 1991; Talon vd., 1995; Simons vd., 1998; Oh vd., 1999).

*Staphylococcus aureus* suşundan elde edilen lipaz (L-1) amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik kolon phenyl Sepharose CL-4B ve takiben jel filtrasyon

Sepharose CL-4B kolonu gibi bir çok aşamalı prosedürün uygulanması ile saflaştırılmıştır (Tyski vd., 1983). Lipaz preparatının Sepharose CL-4B ile yeniden kromatografiye tabi tutulması saflaştırmanın son aşamasıdır. Molekül ağırlıkları SDS içerisinde moleküler elek ve elektroforez yöntemiyle sırasıyla 300 ve 45 kDa olarak belirlendi. *Staphylococcal* lipazının farklılıkları açıklanabilecek kompleks bir yapı sergilediği görülmektedir.

*Staphylococcus hyicus* lipaz geni *Staphylococcus carnosus* üzerine klonlanmış ve expres edilmiştir. *S. carnosus*'dan enzim salgılanması ortama molekül ağırlığı 86 kDa olan bir protein eklenerek sağlanmıştır. Bu lipaz amonyum sülfat çöktürülmesi akabinde de Sefadeks G-100/G-25 kolonu uygulanarak saflaştırılmıştır. Büyük miktarlarda homojen lipaz izolasyonunu kolaylaştırmak amacıyla Sefadeks aşamasından sonra çeşitli proteolitik enzimlerle inkübasyon yapılmıştır Triptik sindirimi takiben 46 kDa'luk tek bir aktif bant elde edilmiştir. Enzim sırasıyla pH 8.0 ve 6.5' de geliştirilmiş iki DEAE-cellulose kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır (van Oort vd., 1989).

#### **1.8.1.1.3. *Chromobacterium* Lipazları**

*C. viscosum* ait ham enzim çözeltisi birbirinden farklı molekül ağırlığına ve izoelektrik noktaya sahip ikiden fazla tür içerir (Sugiura vd., 1974). İki lipaz içeren ham enzim preparatı *C. viscosum* hücre kültüründen etanolle %50-80 arasında fraksiyonlu çöktürme ile elde edilmiştir.

*C. viscosum* hücre kültüründen elde edilen ham enzim preparatından enzim saflaştırılması lipazın palmitoil selüloza olan ilgisine bağlıdır (Horiuti and Imamura, 1977). Bu prosedürün özellikle de lipazın büyük çapta saflaştırmasında daha basit ve etkili olduğu bulunmuştur. Etanolle fraksiyonlu çöktürme (%50-80) ile elde edilen ham enzim çözeltisi %71 verimle ve bakteri kültürünün supernatan kısmına göre 11 kat fazla spesifik aktiviteye sahip olarak palmitoillenmiş gazlı kolon ile saflaştırılmıştır. SDS-PAGE' de her birinin molekül ağırlığı 120 kDa , pI' sı 3.7 ve 30 kDa, pI' sı 7.3 olan iki izoenzim elde edilmiştir (Horiuti ve Imamura, 1977).

*C. viscosum* ait ham enzim çözeltisi çeşitli hidrofobik malzemeler ile kaplanmış özel cam boncuklar üzerinde adsorbe edilmiştir (Isobe ve Sugiura, 1977). Silikonlu cam boncuklar üzerinde adsorbe olmuş enzim denatüre edilmiş ve %0.1' lik Triton X-100 ile elüe edilmiştir. Bu yöntemle *C. viscosum* lipazları 1000 kat saflaştırılmış, elektroforez üzerinde iki bant gözlenmiş ve iki de lipolitik aktivite göstermiştir. Bu saflaştırma metodu daha önceden rapor edilen afinite kromatografisi yöntemine göre daha basit ve etkilidir.

Bir lipolitik *C. viscosum* preparatının seçici ayrışması ve saflaştırılması bir ters misellar kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla gerçekleştirilmiştir (Vicente vd., 1990; Aires-Barros ve Cabral, 1991). Organik çözücü teknikleri protein denatürasyonu ve çözünmesi ile sınırlı olduğunda, ters misel kullanılarak biyomoleküllerin sıvı-sıvı ekstraksiyonu gelecek vaat eden bir çözüm olacaktır (Castro ve Cabral, 1988; Krieger vd., 1997; Naoe vd., 1999). Bu metot çok basit bir işlemdir ve iki adımda gerçekleştirilir. İlk adım ters misellerin protein çözmek için yüzey aktif grupları susuz bir ortamdan sulu bir ortama geçirebilme özelliğine bağlıdır. İkinci aşamada ise çözülmüş proteinler ters misel ve protein arasındaki etkileşim değiştirilerek yeni bir aköz ortam içerisine geri ekstrakte edilir.

Ayrıca, *C. viscosum* lipazının susuz çözeltiden ekstraksiyonu AOT/span 60 ve AOT/Tween-85 karışımli ters misel sistemleriyle gerçekleştirilir (Yamada vd., 1994). Tween-80 misel şeklinde bir uzama meydana getirirken Span 60 misel şeklinde hiçbir değişiklik olmaksızın AOT misellerinin su havuzunda çözünür. Tween-85 eklenmesiyle lipaz aktivitesi artar ve AOT molar oranı Tween-85 için 3:2-4:1 olduğunda lipaz aktivitesi maksimum olur.

#### **1.8.1.1.4. *Bacillus* lipazları**

*Bacillus subtilis* 168 ekstraselüler lipazı aşırı üretim yapan bir suşun büyüme ortamında amonyum sülfat çöktürmesinin ardından phenyl-Sepharose ve hidroksiapatit kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 19 kDa ve kromatofokuslama ile de pI değeri 9.9 olarak belirlenmiştir (Lesuisse vd., 1993). Farklı *Bacillus* spp. Türlerinden lipaz saflaştırma prosedürleri Tablo 8'de özetlenmiştir.

**Tablo 8.** Çeşitli *Bacillus* lipazlarının saflaştırma aşamaları.

<i>Bacillus</i> spp.	Saflaştırma Aşamaları	% Verim – Saf. Katsayısı	Molekül Ağırlığı (kDa)	Referans
<i>Bacillus</i> spp.	Fraksiyonlu amonyum sülfat çöktürmesi, Akri nol ile muamele, DEAE Sefadeks A-50, Toyopearl HW-55F ve butyl-Toyopearl 650 M	% 9 - 7762	22	Sugihara vd., 1991
<i>Bacillus thermocatenulatus</i> (Lipaz geni <i>Escherichia coli</i> 'ye klonlanmıştır)	Hücre parçalanması, Isı Şoku, İyon değişim kromatografisi ve Hidrofobik etkileşim kromatografisi	312	16	Schmidt-Dannert vd., 1996
<i>Bacillus</i> spp. THL027	Ultrafiltrasyon ve Sefadeks G-100	2,6	69	Dharmstithi and Luchai, 1999
<i>Bacillus pumilus</i>	Fraksiyonlu amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadeks G-100	75		Jose and Kurup, 1999
<i>Bacillus alcalophilus</i>	Amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadeks G-100	111		Ghanem vd., 2000
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (Lipaz geni <i>Escherichia coli</i> 'ye klonlanmıştır)	CM-Sepharose ve DEAE-Sepharose	% 62.2 - 11.6		Kim vd., 2000
<i>Bacillus</i> spp.	Fraksiyonlu aseton, iki kez aseton çöktürmesi, Octyl-Sepharose CL-4B, Q-Sepharose ve Sepharose-12	% 20 – 3028	25	Imamura and Kitaura, 2000

Schmidt-Dannert vd. (1997) termofilik *Bacillus thermocatenulatus*'den iki lipaz saflaştırmış ve molekül ağırlıklarını 16 ve 43 kDa olarak bulmuşlardır. 16 kDa molekül ağırlığına sahip olan lipaz, bilinen en küçük bakteriyel lipazdır.

Bradoo vd. (1999) tarafından 70 °C' de büyüme kapasitesine sahip *B. stearothermophilus* SB1'den 70% (a/h) PEG-6000 ve 40% (a/h) pH 7.0. fosfat tamponundan oluşan sulu iki-fazlı bir sistem kullanılarak, lipaz kısmi olarak saflaştırılmıştır. %3 (a/h)' lük NaCl eklenmesiyle kolonun hidrofobikliği artırılarak altı kat daha saf enzim elde edilmiştir (Bradoo vd., 1999).

#### 1.8.1.1.5. *Acinetobacter* Lipazları

Hong ve Chang (1998) uzun zincirli triaçilgliserollere karşı geniş özgüllük yelpazesi olan yeni bir alkali lipazı *Acinetobacter radioresistens* CMC-1'den amonyum sülfat çöktürmesiyle (%30-80 doygunlukta) saflaştırmışlardır. Fazlalık tuzlar, bir PD-10 kolonunu uygulanarak uzaklaştırılmıştır. Bunları takiben anyon değişim kromatografisi

kolonu olarak Mono Q ve son olarak da phenyl-Sepharose CL- 4B kolonu kullanılarak lipaz %13 verimle 64 kat saflaştırılmıştır. *Actinobacter nov. spp.* KM109 suşu etkin bir oleil benzoat (OB) hidrolize eden bir lipaz üretmektedir. Enzim 213 kat ve % 0.8 verimle Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose 62000SWXL ve Mono Q PC kromatografi kolonları kullanılarak saflaştırılmıştır (Mitsubishi vd., 1999). Molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 62 kDa olarak belirlenmiştir. Ayrıca, Pratuangdejkul ve Dharmstithi (2000) tarafından *A. calcoaceticus* LP009 'dan ultrafiltrasyon ve Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografi kolonu ile lipaz saflaştırılmıştır.

#### **1.8.1.1.6. *Corynebacterium* Lipazı**

*Corynebacterium acnes*'den lipaz izole edilmiş ve kültürün supernatant kısmından amonyum sülfat fraksiyonlu çöktürmesi ve jel filtrasyon Sefadex G-100 kolonu kullanılarak yaklaşık olarak 200 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Enziminin pI değeri 3.8 olarak belirlenmiştir (Hassing, 1971).

#### **1.8.1.1.7. *Propionibacterium* Lipazı**

*Propionibacterium acnes* kaynaklı bir lipaz yağ asitlerini serbest bırakmak için in vivo doğal sebum triaçilgliserollerini hidrolize eder (Ingham vd., 1981). Bu enzim ham kültür süpernatantından %9.5 verimle 4800 kat saflaştırılmıştır. Bu kültür süpernatantı ultrafiltrasyon ile konsantre edilmiş ve ardından da jel filtrasyon Sefadex G-100 kolonu ve iyon değişim CM Sefadex C-50 kolonu kullanılarak saflaştırılmıştır. Molekül ağırlığı jel filtrasyonla 46.7 kDa olarak belirlenmiştir.

#### **1.8.1.2. Maya Lipazları**

##### **1.8.1.2.1. *Candida* Lipazları**

Veeraragavan ve Gibbs (1989) *C. Rugosa* tarafından üretilen iki farklı lipaz belirlemiş ve ham lipazın etanolle ekstraksiyonundan sonra yüksek çözünürlüklü anyon değiştirme kolonu (Mono Q) ile bunları birbirinden ayırmışlardır. Lipaz I % 18 verimle 6 kat ve Lipaz II %25 verimle 2 kat saflaştırılmıştır.

Her iki proteinde SDS-PAGE üzerinde 58 kDa'lık molekül ağırlığı sergilemiştir. Diğer bir rapora göre (Lopez vd., 2000), *C. rugosa* lipaz B'nin iki izoformu 25 mM histidin / HCl tamponu (pH 6.1) ile dengelenmiş bir anyon değişim kromatografi kolonu Mono-P-HR5/5 üzerinde 0.150-275 M NaCl ile bir lineer gradiyent oluşturularak elüe edilmesiyle saflaştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen lipazlardan, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) içinde dengelenmiş PD-10 kolonları kullanılarak tuzları uzaklaştırılmıştır. Lipaz B1'de verim %28 iken Lipaz B2'de verim %7' dir.

Lipolitik enzimlerin üç farklı formu Shaw ve arkadaşları (1989) tarafından ticari *Candida* lipazının hazırlanmasında belirlenmiştir. Bu lipazların ikisi (Lipaz A ve C) DEAE-Sefadex CL-6B kolonu ile saflaştırılmıştır. Lipaz A ve C yukarıda tanımlanan Lipaz I ve II'ye karşılık gelmektedir (Veeraragavan ve Gibbs, 1989). Lipaz B muhtemelen saflaştırma aşamasında ham enzimin etanolle muamele edilerek Lipaz I'e dönüştürülmesinden dolayı bu araştırmacılar tarafından tespit edilememiştir. Lipaz A, B ve C'nin molekül ağırlıkları sırasıyla 362, 200 ve 143 kDa'dur. SDS-PAGE sonuçları hem Lipaz A hem de Lipaz C'nin aynı molekül ağırlığına sahip (62 kDa) alt birimden oluşurken Lipaz A,B ve C'nin heksamer, trimer ve dimer alt birimler oabileceğini göstermiştir.

#### **1.8.1.2.2. *Trichosporon* Lipazı**

Pişmemiş süttten izole edilen lipaz üreten bir maya olan *Trichosporon asteroides* LP005 suşu Dharmstithi ve Ammaranond (1996) tarafından tespit edilmiştir. Bu lipaz sekiz kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma aşamaları %70' lik amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon Sefadex G-200 kolonundan oluşmaktadır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 37 kDa olarak belirlenmiştir.

#### **1.8.1.3. Mantar Lipazları**

##### **1.8.1.3.1. *Pythium* Lipazı**

*Pythium ultimum* 144 suşundan ekstraselüler lipazı enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sepharose CL-6B ve Sephacryl S-200 kullanılarak %22 verimle ve

spesifik aktivitesi 62 U/mg protein olarak saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı da SDS-PAGE ile 68 kDa olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte denatüre olmamış koşullar altında enzimin molekül ağırlığının 270 kDa gösterilmiş ve tetramer bir yapıda olduğu düşünülmektedir (Mozaffar ve Weete, 1993).

### 1.8.1.3.2. *Rhizopus* Lipazları

*Rhizopus delemar*'dan üretilen üç çeşit lipaz olan Lipaz A, B ve C'nin saflaştırılması ve enzimatik özellikleri Tahoun ve Ali (1986) tarafından çalışılmıştır. Kültür besiyerinden süzülen misel yıkanmış, kurutulmuş ve asitle yıkanmış kumla öğütüldükten sonra asetat tamponuyla ekstrakte edilmiştir. Konsantre edilen protein daha sonra Ultrigel ve Sefadeks G-150 kolonlarıyla saflaştırılmıştır. Lipaz A %11 verimle 106 kat, Lipaz B %3 verimle 71 kat ve Lipaz C %4 verimle 47 kat saflaştırılmıştır. Lipaz A, B ve C için elektroforezde molekül ağırlıkları homojen bir şekilde sırasıyla 76, 60 ve 45 olarak bulunmuştur. *Rhizopus spp.*' dan lipaz saflaştırması çalışan araştırmacıların çalışmaları ve bazılarının prosedürleri Tablo 9' da özetlenmiştir.

**Tablo 9.** Çeşitli *Rhizopus spp.* lipazlarının saflaştırılma aşamaları

<i>Rhizopus spp</i>	Saflaştırma Aşamaları	% Verim – Saf. katsayısı	Molekül Ağırlığı (kDa)	Referans
<i>Rhizopus japonicus</i> NR 400	hydroxyapatite, octyl-Sepharose ve Sephacryl S-200	% 31-93	30	Suzuki vd., 1986
<i>Rhizopus oryzae</i>	aseton çöktürmesi (80%), Sefadeks G-100	% 64-160		Razak vd., 1997
<i>Rhizopus delemar</i>	Oleik asit afinite kromatografisi, CM-Sefadeks	% 30-10,3	30,3	Haas vd., 1992
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Fraksiyonlu amonyum sülfat çöktürmesi ve Sefadeks G-100 jel filtrasyon	% 42-720	67	Chattopadhyay vd., 1999
<i>Rhizopus chinensis</i>	CM-Cellulofine C-500, ether Toyopearl 650 M, Super Q Toyopearl ve CM-Cellulofine C-500	% 27,6	28,4	Yasuda vd., 2000
<i>Rhizopus oryzae</i>	Fraksiyonlu amonyum sülfat çöktürmesi, sulfopropyl-Sepharose, Sefadeks G-75 ve tekrar sulfopropyl-Sepharose	% 22-1260	32	Hiol vd., 2000



### 1.8.1.3.3. *Mucor* Lipazları

Seçilmiş bir *M. miehei* suşunun ürettiği hücre dışı bir glikoprotein lipazı, A ve B şeklindeki iki formda Høge-Jensen vd. (1987) tarafından kısmi olarak saflaştırılmıştır. Lipaz A 15 kat ve %57 verimle DEAE-cellulose 52 kolonu ve afinite kromatografi kolonu olarak da Con A–Sepharose kullanılarak saflaştırılmıştır. Lipaz B ise DEAE-Sepharose ve phenyl-Sepharose kromatografi kolonları kullanılarak ham enzim özütüne göre 8 kat ve %32 verimle saflaştırılmıştır.

Wu ve arkadaşları (1996) *Rhizomucor miehei* lipazını amonyum sülfat çöktürmesi ardından phenyl- Sepharose fast-flow hidrofobi etkileşim ve DEAE-Sepharose fast-flow anyon değişim kromatografileri kullanarak saflaştırmışlardır. Enzim 42 kat ve %32 verimle saflaştırmıştır. Saf lipazın moleköl ağırlığı 31.6 ve pI değeri 3.8'dir. Benzer bir şekilde hücre dışı bir *Rhizomucor hiemalis f. Hiemalis* lipazı, ultrafiltrasyon ve amonyum sülfat çöktürmesi işlemlerinden sonra Sefadeks G-75, Q-Sepharose ve Sephacryl S-200 kolonları kullanılarak 2200 kat saflaştırılmıştır (Hiol vd., 1999). Bu enzimin moleköl ağırlığı 49 kDa, pI değeri ise 4.6'dır.

### 1.8.1.3.4. *Neurospora* Lipazları

*Neurospora crassa conidia* triaçilgliserol lipazı Kundu ve arkadaşları (1987) tarafından saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Enzim Sefadeks G-100 kolonu ile saflaştırılmıştır. İzoelektrik fokuslama yöntemi ile enzimin pI değeri 6.4 olarak tespit edilmiştir. Enzimin moleköl ağırlığı ise jel filtrasyonla 54 kDa olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE'de, iki özdeş alt birimlerinin varlığına işaret olarak 27 kDa'lık tek bir bant verdiği gözlenmiştir.

*Neurospora* spp. TT-241 tarafından üretilen hücre dışı lipaz enzimi (55 kDa) %16 verimle 370 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırma aşamaları; amonyum sülfat çöktürmesi, G-100 jel filtrasyon, Toyopearl phenyl- 650 M ve Ultrogel-HA' ı içermektedir (Lin vd., 1996b).

### 1.8.1.3.5. *Aspergillus* Lipazları

*Niger* lipazı Sugihara vd. (1988) tarafından amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kolonu (butil Toyopearl 650 M), jel filtrasyon kolonu (Sefadeks G-75), anyon değiştirme kromatografi kolonu (DEAE-Sepharose CL-6B) ve hidroksiapatit üzerine adsorpsiyon aşamaları kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu prosedürle enzim ham ekstrakta göre 600 katın üzerinde ve %34 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ve Sefadeks G-100 jel filtrasyon kolonu kullanılarak 35 kDa, pI değeri ise 4.1 olarak hesaplanmıştır. Aside karşı dayanıklı olan *A. niger* lipazı ham ticari bir preparattan molekül büyüklüğü ayırma jeli Bio-Gel P-100 ve iyon değişim kolonu Mono Q kullanılarak saflaştırılmıştır. Genel olarak saflaştırma 40 kat ve %36 verimlidir. Saflaştırmanın en etkili aşaması spesifik aktivitenin 5-6 kat arttığı iyon değişim kromatografi kolonu olan Mono Q'nun kullanıldığı aşamadır (Torossian ve Bell, 1991).

*Aspergillus oryzae* lipazı, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografi kolonu Econo-Pac Q, hidrofobik etkileşim ve birbirini takip eden iki iyon değişim kromatografi kolonu Mono Q adımları kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin monomerik bir protein olduğu ve molekül ağırlığının da SDS-PAGE ile 39 kDa, jel filtrasyonla 41 kDa olduğu tespit edilmiştir (Toida vd., 1995). Benzer bir şekilde Toida vd. (1998) *A. oryzae* lipazını amonyum sülfat çöktürmesi, aseton çöktürmesi, anyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi aşamalarından sonra %11 verimle saflaştırmışlardır. Bu enzim 25 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir.

*Aspergillus carneus* lipazı, amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kolonu octyl-Sepharose' dan oluşan iki adımlık basit bir prosedürle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 27 kDa ve izoelektrik noktası 4.3' tür (Davidson, 1998). Phenyl- Sepharose ve linolenik asit-agaroz afinite kolonu kullanılarak *Aspergillus nidulans* WG312 suşundan hücre dışı lipaz enzimi saflaştırılmıştır. Ekstraselüler lipaz enzimi 29 kDa molekül ağırlığına sahip ve pI değeri 4.85' dir (Mayardomo vd., 2000).

#### 1.8.1.3.6. *Penicillium* Lipazları

*Penicillium camembertii* U-150 suşundan elde edilen bir lipaz, etanol çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi ve aminooctyl-Sepharose, hidroksiapatit ve Con A-Sepharose kolon kromatografi kolonlarından oluşan dört bölümlük bir presedürle saflaştırılmıştır (Isobe ve Nokihara, 1991). Bununla birlikte, Yamaguchi ve Mase (1991) tarafından *P. kamemberti* U-150 kültür filtratında mono- ve di-açilgliserollerini hidrolizleyen yeni bir enzim bulunmuştur. Bu enzim hemen hemen aynı molekül ağırlığı (37-39 kDa) ve amino asit kompozisyonuyla özdeş N-terminal amino asit dizilişine sahip iki şekilde ayrılmıştır. Ana bileşen B- enzimi yaklaşık olarak 210 kat ve % 2.6 aktivite verimiyle saflaştırılmıştır.

*Penicillium citrinum* ham ekstraktından bir lipaz ekstraksiyonu ve geri ekstraksiyonu izooktan içinde AOT ters miseller kullanılarak yapıldığı belgelenmiştir (Krieger vd., 1997). İleri ve geri protein transferindeki pH, iyonik şiddet ve AOT konsantrasyonunun etkisi 20 °C' de çalışılmıştır. İleri ekstraksiyon protein miktarı (% 32) izooktan içerisinde 100 mM KCl ve 100 mM AOT içeren 50 mM pH 4.0 asetat tamponunda elde edilmiştir. Proteinler 1 M KCl içeren pH 8.0 100 mM fosfat tampon içerisinde %82.7 verimle geri ekstrakte edilmiştir. Lipolitik aktivite hidrofobik etkileşim kolonu olan Phenyl Sepharose ile elde edilmiştir. Bütün işlemlerin tümünde elde edilen verim, enzim aktivitesi için %68, protein geri kazanımı için % 26.4 ve saflaştırma katsayısı olarak da 810 kattır.

Chahinian ve arkadaşları (2000) tarafından enzimatik deglikozilasyonla 37 kDa'lık tek bir proteine dönüştürülebilen 40-43 kDa'lık glikozile edilmiş çeşitli tip II lipaz şekilleri rapor edilmiştir. Çeşitli *Penicillium* cinslerinden elde edilen lipazın saflaştırma aşamaları Tablo 10' da özetlenmiştir.

**Tablo 10.** Çeşitli *Penicillium* spp. lipazlarının saflaştırılma aşamaları.

<i>Penicillium</i> spp.	Saflaştırma Aşamaları	% Verim – Saf. katsayısı	Molekül Ağırlığı (kDa)	Referans
<i>Penicillium cyclopium</i> MI	Amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Cellulose, DEAE- Sephacryl, hidroksiapatit kromatografiler ve Cellulofine GC-700 jel filtrasyon	% 27-1380	11	Isobe vd., 1988
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Amonyum sülfat çöktürmesi, phenyl-Sephacryl CL-4B, Ultragel AcA-54 ve hidroksiapatit	% 20	56	Sztajer vd., 1992
<i>Penicillium expansum</i> DSM 1994	Çapraz akışlı süzme, Amonyum sülfat çöktürmesi, phenyl-Sephacryl	219	25	Stocklein vd., 1993
<i>Penicillium citrinum</i>	İzooktan içerisinde ters AOT miselleri kullanılarak ekstraksiyon ve geri ekstraksiyon, phenyl-Superose	% 26,4 - 810	33	Krieger vd., 1997
<i>Penicillium citrinum</i>	Amonyum sülfat çöktürmesi, Superose 6 column ve phenyl Superose HIC	% 15,2 - 379	33	Krieger vd., 1999
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ultrafiltrasyon, phenyl- Sephacryl, Mono Q HR 5/5 ve Sefadex G-25 PD-10 kolonu	% 44-30	40	Ferrer vd., 2000
<i>Penicillium cyclopium</i>	Amonyum sülfat çöktürmesi, Sefadex G-75, DEAE- Sefadex ve tekrar Sefadex G- 75	% 30-590	27	Chahinian vd., 2000

#### 1.8.1.3.7. *Ustilago* Lipazı

*Ustilago maydis* ATCC 14826 suşuna ait ham lipaz özütünden kromatografik yöntemler ile önde gelen iki lipolitik enzim saflaştırılmıştır. Kültür süpernatanı iyon değişim kromatografisi kolonu Q-Sephacryl ile Lipaz I ve II şeklinde saflaştırılmıştır. Lipaz I butyl-Sephacryl kolonu uygulandıktan sonra %12 üzerinde verim elde edilmiştir. Lipaz II ise DEAE-Sephacryl ve butyl-Sephacryl kolonlarıyla %13.5 verimle saflaştırılmıştır (Lang vd., 1991).

#### 1.8.1.3.8. *Botrytis* Lipazı

*Botrytis cinerea* mantarından hücre dışı lipaz homojen oluncaya kadar saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saflaştırma aşamaları amonyum sülfat çöktürmesi daha sonra da sırasıyla octyl-Sephacryl CL-4B, Con A-Sephacryl ve Sephacryl S-200 kolonlarından oluşmaktadır. Preparat %21 verimle 31 kat saflaştırılmıştır. SDS-

PAGE üzerinde lipazın molekül ağırlığı 60 kDa olarak saptanmıştır (Commenil vd., 1995).

#### **1.8.1.3.9. *Geotrichum* Lipazları**

*Geotrichum candidum* hücre dışı lipazı immunoelektroforetik teknikleri ile yüksek derecede heterojenlik göstermiştir (Jacobsen vd., 1989). Hücre dışı *G. candidum* ATCC 66592 lipazının Sefadex G-100 fraksiyonu içinde mevcut iki lipolitik protein (61 ve 57kDa) yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak ayrıştırılmıştır (Jacobsen ve Poulsen, 1992).

Diğer araştırmacılar tarafından *G. candidum*'dan da bir lipaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Veeraragavan vd., 1990). Saflaştırma prosedürü; etanol çöktürmesi ve kromatografi kolonları olarak da Sephacryl-200 HR, yüksek çözünürlüklü anyon değişim (Mono Q) ve Polybuffer değiştirici 94 kolonlarını içerir. Bu prosedürle *G. candidum*'dan iki tür lipaz elde edilmiştir. Lipaz I (ana bileşen) %62 verimle 35 kat, Lipaz II %18 verimle 94 kat verimle saflaştırılmıştır.

Ticari GC-4-(Amano) enzim dolgu maddesinden başlayarak *G. candidum* lipazının saflaştırılması için iki aşamalı basit bir yöntem de geliştirilmiştir. Saflaştırma prosedürü; phenyl-Sepharose CL-4B hidrofobik etkileşim kolonunun ardından Q-Sepharose iyon değişim kromatografi kolonundan oluşmaktadır. Bu aşamadan sonra saflaştırma katsayısı 13.2 oldu. Bu prosedürle bir tane saf lipaz elde edilirken başka araştırmacılar tarafından iki adet lipaz bulunmuştur (Sugihara vd., 1990, Jacobsen vd., 1989). Bu aşamada lipaz aktivitesinin %50' sinin kaybolması muhtemelen lipazın birinin hidrofobik etkileşim kolonu esnasında uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır (Spener vd., 1991).

#### **1.8.1.3.10. *Fusarium* Lipazları**

Birçok çalışma, *Fusarium* spp. lipazın saflaştırılmasında kullanılabilceğini göstermektedir (Shimada vd., 1993; Nagao vd., 1996; Bandmann vd., 2000). *Fusarium* spp. YM-30 ekzopolipazı ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Toyopearl

650 M, CM-Toyopearl 650 M ve butyl-Toyopearl 650 M kromatografi kolonlarını içeren bir prosedürle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 12 kDa, özgülüğü ise mono-ve diasilgliseroller için yüksek Triasilgliserollerin için ise düşük olarak tespit edilmiştir (Mase vd., 1995).

#### **1.8.1.3.11. *Humicola* Lipazları**

Hücre dışı *Humicola lanuginosa* (şimdiki adı *Thermomyces lanuginosus*) lipazı aseton çöktürmesi ve ardından da Sefadeks G-75, DEAE-Sepharose CL-6B ve hidroksiapatit kolonları kullanılarak saflaştırılmıştır (Omar vd., 1987). Enzim %15 verimle 150 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim, poliakrilamid jel elektroforez üzerinde tek bir protein bandı göstermiştir. Enzimin molekül ağırlığının hem SDS-PAGE hem de jel filtrasyon Sefadeks G-100 üzerinde 39 kDa olarak tahmin edilmesi enzimin 6.6 pI değerine sahip bir monomer olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca Taylor(1989), *H. lanuginosa* 'dan lipazı kıvrımlı bir filtre kapsül içeren akrilik mikro-gözenekli zarlarla kısmi olarak adsorpsiyon ile saflaştırmıştır. Lipaz pH 9.0 (0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) içerisinde desorpsiyon ile tamamen geri kazanılmış, ultra-süzme ile konsantre edilmiş ve dondurularak kurutulmuştur. Orijinal lipaz aktivitesinin yaklaşık dörtte biri donmuş-kurutulmuş bir toz halinde kalmıştır. Preparat Sefadeks G-75 kromatografisi ile daha fazla saflaştırılmıştır.

Boominathan vd. (1995) *H. lanuginosa* lipazının saflaştırılması üzerinde PEG'in molekül ağırlığının etkisini incelemiş ve istenilen proteinin toplam proteine oranının değişik pH' larda düşük ortalama moleküler ağırlığına sahip PEG' ler kullanılarak geliştirilmiş olduğunu bulmuşlardır.

### **1.9. Lipaz İçeren Organizmalar ve Yapılan Çalışmalar**

Çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen lipazların pH, sıcaklık, molekül ağırlığı, termostabilitesi ve diğer fizikokimyasal parametreleri farklılık ve benzerlik göstermektedir. Bazı mikroorganizmalardan saflaştırılan lipaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve saflaştırılan enzimin biyokimyasal özellikleri Tablo 11' de verilmiştir.

**Tablo 11.** Bazı mikroorganizmalardan lipaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve enzimün biyokimyasal özellikleri.

Mikroorganizma	Saflaştırma Yöntemi	Saflaştırma Katsayısı/Verim	Mr (kDa)	Optimum pH/sıcaklık (°C)	Substrat Spesifikliği	Km / Vmax	Inhibitör	pI	Referans
<i>Antrodia cinnamomea</i> BCRC 35396	% 30-70 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ve DEAE-Sepharose	17,2 / 33,6	60	8 / 45			-	-	Shu vd., 2006
<i>Bacillus cereus</i> C71	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Phenyl-Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose Fast Flow 1, C-Sepharose Fast Flow 2 ve CIM® QA	1092,5 / 18		9 / 33	pNP bitirnat (C4)		Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	-	Chen vd., 2007
<i>Pseudomonas stutzeri</i> PS59	% 60 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Dializ, Dondurarak kurutma, Q-sepharose ve Superdex 200	22,45 / 43,1	~ 55	8,5 / 20	Triolein		Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> ve Mg <sup>2+</sup>	-	Li vd., 2014
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CGMCC 4254	% 60-80 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi ve Phenyl Sepharose	60,5 / 8,4	52	8 / 35				-	Li vd., 2013
<i>Bacillus thermoleovorans</i> ID-1	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, DEAE CL6B, Superdex 200, Resource PHE ve Mono Q	300 / 0,16	19 ve 43	9 / 60	Trikaprilin	1,82 ve 6,24 mM trikaprilin / 12,8 ve 63,3 µmol dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> ve Fe <sup>2+</sup>	-	Lee vd., 2001
<i>Pseudomonas stutzeri</i> LC2-8	Aseton çöktürmesi ve DEAE-Sepharose Fast Flow	21,2 / 32,8	32	8 / 30	p-NP kaproat (C8)		Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	-	Cao vd., 2012
<i>Staphylococcus aureus</i>	Phenyl Sepharose CL-4B (hidrofobik kolon) ve Superose-12 jel filtrasyon kolonu	6,76 / 20	~ 49	8 / 55			EDTA, PMSF	-	Sarkar vd., 2012
<i>Aeromonas caviae</i> AU04	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi ve HIC kolonu	3,3 / 28,7	39	7 / 60	p-NP laurat		SDS, Triton X -100, Tween 80, Leupeptin, CTAB, Sodyum deoksişolat	-	Velu vd., 2012
<i>Penicillium sp.</i> DS-39 (DSM 23773)	Isı şoku (50 °C' de 20 dak.), DEAE cellulose, % 0-70 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Sephacryl® 100-HR-I, Q Sepharose® HP ve Sephacryl® 100-HR-II	129,7 / 8,8	43	5,5 / 45	Triolein		Mn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , EDTA, PMSF	-	Dheeman vd., 2011a

**Tablo 11 (devam). Bazı mikroorganizmalardan lipaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve enzim biyokimyasal özellikleri.**

<i>Bacillus stearothermophilus</i> P1	Ultrafiltrasyon ve anyon değişim kromatografi kolonu Q Hyper D10	18 / 71	43	8,5 / 55	p-NP kaprat ( C10) Tri kaprilin	Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> ve Fe <sup>2+</sup> EDTA, PMSF, DTT, 1 Dodekan sülfonil klorür, 1 Hekzadekan sülfonil klorür	Sinchaikul vd., 2001
<i>Geococcus</i> sp. SBS-4S	Resource Q, DEAE Fast Flow ve Superdex 200 10/300	43,4	9/ 60	3,8 mM		Tween 20, SDS, Sodyum deoksişolat	Tayyab vd., 2011
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM 43304	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Q Sepharose HP ve Toyopearl Phenyl-650M	398 / 36	33	8/ 60	p-NP kaprilat ( C8:0) Triolein	Zn <sup>2+</sup> EDTA, Tween 20, SDS, Tween 80 ve Triton-X 100	Dheeman vd., 2011b
<i>Aspergillus awamori</i> BTMFW032	% 40-90 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ve DEAE-Cellulose	30,2 / 33,7	90	7/ 40			Basheer vd., 2011
<i>Spirulina platensis</i>	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, DEAE-Sepharose ve Sepharose -6B	375 /29,35	45	6,5 / 45		Li <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> ve Fe <sup>2+</sup>	Saygıdeğer Demir ve Tükel, 2010
<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>Corticola</i>	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Sefadeks G75 ve Q Sepharose fast flow	12,63 /27,7	46	7/ 40		EDTA, PMSF	Ülker ve Alpay Karaoğlu, 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HiTrap Q FF, HiLoad Superdex 200 HiTrap Q FF (linear gradient 5 mM/min) pg, ve	41,6 / 61	65	8/ 35		Zn <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	Florezcak vd., 2013
<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7	Ultrafiltrasyon, Sefadeks G200 ve DEAE cellulose	19,25 / 10,2	62,5	7,5- 9 arası / 75-80 arası	Tribütirin, p-NP Palmitat	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> ve Cu <sup>2+</sup> PMSF, PMCB, N-bromosüksinimid	Kambourova vd., 2003
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi ve DEAE Sepharose	40/ 2,5	31	8,5 / 55	p-NP Palmitat	Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	Kumar vd., 2005
<i>Aneurinibacillus</i>	Q Sepharose ve Sefadeks G 75	15,6 / 19,7	50	7/65	Triolein	Fe <sup>3+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> ve	Masomian vd.,





**Tablo 11 (devam). Bazı mikroorganizmalardan lipaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve enzimün biyokimyasal özellikleri.**

<i>luteola</i>	çöktürme ve Toyopearl I HW- 55F	Tribütirim ve zeytinyağı	Sn <sup>2+</sup>	2002				
<i>Staphylococcus</i> sp.	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Sephaerly S-200	7-8 / 35	38	24 / 32	38	7-8 / 35	SDS, Tween 80, Cetrimide, Deoxycholate	Daoud vd., 2013
<i>Pseudomonas mendocina</i> PK-12CS	Aseton çöktürmesi, DE-52	8 / 37	80	241 / 14,8	80	8 / 37	Ba <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Hg <sup>2+</sup> ve Cu <sup>2+</sup>	Jinwal vd., 2003
<i>Aspergillus carneus</i>	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Octyl Sepharose	9 / 37	27	24 / 38	27	9 / 37	EDTA, SDS, DEPC Zn <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> ve Cd <sup>2+</sup>	Saxena vd., 2003
<i>Rhizopus oryzae</i>	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Sulphopropyl-Sepharose, Sefadex G 75 ve 2. Defa Sulphopropyl-Sepharose	7,5 / 35	32	1260 / 22	32	7,5 / 35	PMSF, SDS, Dietyl p-nitrofenil fosfat Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cu <sup>2+</sup> ve Fe <sup>2+</sup>	Hrol vd., 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LX1	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi ve DEAE-Sepharose FF	7 / 40	56	4,3 / 41,1	56	7 / 40	SDS, Triton X 100	Ji vd., 2010
<i>Mortierella alliacea</i>	Aseton çöktürmesi, DEAE Sepharose ve Superdex 200	9 / 50	11	6,2 / 4	11	9 / 50	Fe <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> ve Cu <sup>2+</sup>	Jermunitea vd., 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA	Ultrafiltrasyon, Sefadex G 100	8 / 40	60	8,6 / 51,6	60	8 / 40	Zn <sup>2+</sup> ve Cu <sup>2+</sup>	Gaur vd., 2008
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Aseton çöktürmesi, Q Sepharose FF ve Butyl Sepharose FF	8 / 40	38	26,5 / 23	38	8 / 40	Tween 20, PMCB, CTAB ve β-merkaptto etanol Zn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> ve Cu <sup>2+</sup>	Yu vd., 2007
<i>Geotrichum</i> sp. SYBC WU-3	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, DEAE Cellulose - 32, Sefadex G 100	9,5 / 20 ve 15	Lipaz A: 41.1 Lipaz B: 35.8				SDS	Cai vd., 2009

**Tablo 11 (devam). Bazı mikroorganizmalardan lipaz enzimini saflaştırma yöntemleri ve enzimün biyokimyasal özellikleri.**

<i>Pseudomonas Gessardii</i>	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Diyaliz, DEAE Cellulose ve Sefadex G 25	7.59 / 16.2	92	5 / 37	Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> ve Fe <sup>2+</sup> Tween 20, Tween 40, Tween 80, SDS, β-merkaptioetanol	Ramani vd., 2010
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Diyaliz, DEAE Sepharose		33	9 / 60	Zn <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ve Fe <sup>2+</sup>	Zheng vd., 2011
<i>Bacillus thermocatenuulatus</i>	Butyl Sepharose, Ultrafiltrasyon, Jel filtrasyon	125 / 32	40	8-9 / 60-70	Tween 20, Tween 80, SDS, Lubrol PX	Rüta vd., 1997
<i>Bacillus</i> sp	NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi, Phenyl Sepharose ve Q Sepharose chromatography	58 / 10	60	8.5 / 60-65	Hg <sup>2+</sup> PMSF, SDS, DTT, EDTA, DEPC, βME ve eserime	Nawani, vd., 2006

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada enzim kaynağı olarak Erzurum'un Ilıca ilçesi kaplıcasından Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından izole edilen ve yeni bir termofilik bakteri *Geobacillus stearothermophilus* AH22 (Adıgüzel vd., 2009) suşu kullanıldı.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, üretici firmalar ve modelleriyle birlikte markaları Tablo 12' de verilmiştir.

**Tablo 12.** Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601UV-Visible
Protein Elektroforezi	Bio-RAD	Mini Protean Tetra Cell
Santrifüj	ThermoFisher Scientific	Heraeus Multifuge 3 SR+ Centrifuge
Saf Su Cihazı	SartoriusStedim Biotech	Arium 61316 ProUV
Kuru Hava Banyolu İnkübatör	JEIO TECH	SI-600
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert	WNB 7-45
pH Metre	Thermo Scientific	ORION 3 Star pH Benchtop
Otoklav	Tomy	SS-325
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/ Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Velp Scientifica	Vortex Mixer
Terazi	Precisa	XB 220A
Steril Kabin	Tezsan	—
Güç Kaynağı	Thermo Scientific	EC 300 XL

## 2.2.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamımda kullanılan kimyasallar ve markaları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 13).

**Tablo 13.** Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları.

Firma Adı	Kimyasal Adı
Sigma /Aldrich Chem.Co(St.Louis.MO.USA)	CH <sub>3</sub> COOH, Glisin, NaOH, Folin Reaktifi, PMSF, 3,5 , <i>p</i> -Nitrofenil asetat, <i>p</i> -Nitrofenil bütirat, <i>p</i> -Nitrofenil oktaonat, <i>p</i> -Nitrofenil laurat, <i>p</i> -Nitrofenil palmitat, Fast Red TR. 1-Naphtylacetate, Triton X-100, Tris- Base.
Merck A.G(Darmstadt,Germany)	CH <sub>3</sub> COONa, MOPS, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Na-K Tartarat, NaHSO <sub>3</sub> , Pepton, Akrilamid, Tris, Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, APS, TEMED, EDTA, 2-Merkaptoetanol, MgCl <sub>2</sub> , BaCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , NiCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub> , NaCl, FeCl <sub>2</sub> , CuCl <sub>2</sub> , NaOH, NaClO <sub>4</sub> , Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , NaN <sub>3</sub> , NaCN, NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaAc, Na <sub>2</sub> CO <sub>4</sub> , NaNO <sub>3</sub> , NaHCO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , NaC <sub>8</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , NaHSO <sub>4</sub> , Bromofenol mavisi, SDS, Kateşin,
Pharmacia	DEAE Selüloz, Sefadeks G-150ve G-25 kolon dolgu maddeler,
Conda Pronodisa	Pepton
Ambresco	BSA
Fermentas	Protein markırı
Himedie	Agar

## 2.2.3. Kullanılan Çözeltiler

### 2.2.3.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. Asetat Tamponu (50 mM, pH 4.0): 0.205 g sodyum asetat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N asetik asit ile 4.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
2. Asetat Tamponu (50 mM, pH 5.0): 0.205 g sodyum asetat yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N asetik asit ile 5.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
3. MOPS Tamponu (50 mM, pH 6.0): 0.52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 6.0' ya ayarlanarak hacmi 50 mL'ye

tamamlandı.

4. MOPS Tamponu (50 mM, pH 7.0): 0.52 g MOPS yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 7.0' ye ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
5. Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8.0): 0.3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N HCl ile 8.0' e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
6. Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9.0): 0.3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N HCl ile 9.0' a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
7. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 10' a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
8. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 11' e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
9. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 12.0): 0.187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1 N NaOH ile 12' ye ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

### **2.2.3.2. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

1. Lowry A Çözeltisi (0.1 N NaOH içinde %2 (a/h)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ): 0.4 g NaOH ve 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C'de saklandı.
2. Lowry B Çözeltisi (%1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  çözeltisi): 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.
3. Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K Tartarat Çözeltisi): 2 g Na-K tartarat saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.
4. Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve lowry C karıştırılarak hazırlandı.
5. Lowry E Çözeltisi: 0.5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
6. Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1mg/mL): 5 mg BSA saf suda çözülüp hacmi 5 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.

7. 0.1 N NaOH içinde %0.1 (a/h) SDS Çözeltisi: 0.4 g NaOH ve 0.1 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.

### **2.2.3.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler**

1. Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris-HCl): 5.4225 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH' sı 8.8'e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C' de saklandı.
2. Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl ): 0.2850 g Tris bazı 200 mL saf suda çözülerek, pH' sı 6.8' e ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti +4 °C' de saklandı.
3. SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlandı.
4. Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (% 10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL' ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti -20 °C' de saklandı.
5. N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED): Satın alındığı şekliyle kullanıldı.
6. Akrlamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29.20 g akrilamid ve 0.80 g N,N'-metilenbisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL' ye tamamlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.
7. Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf suyla 100 mL' ye tamamlanması ile hazırlandı.
8. Bromofenol Mavisi (0.1): 10 mg bromofenol mavisinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
9. SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL pH 6.8 1 M Tris-HCl, 400 µL %10 SDS, 100 µL %0.1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 60 µL 2-merkaptolanol' ün karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20°C' de saklandı.
10. SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7.20 g Tris ve 1.50 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8.3' e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL' ye tamamlandı.
11. Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL pH 6.8 1 M Tris-HCl, 100 µL %0.1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C' de saklandı.

12. Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7.2 g Tris ve 1.5 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8.3'e ayarlandı ve çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
13. Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue-R250' nin 62.5 mL glasiyel asetik asit ve 93.5 mL metanol içinde çözülmesiyle hazırlandı.
14. Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyel asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.
15. Substrat Boyama Çözeltisi;
  - a) Renaturasyon çözeltisi: %5' lik (a/h) Triton-X 100' ün pH 7.5 0.1 M Tris-HCl içerisindeki çözeltisidir.
  - b) A çözeltisi: 8 mg  $\alpha$ -naftil asetat 2 mL asetonda çözüldükten sonra üzerine 18 mL 0.1 M Tris tamponu (pH 7.5) ilave edildi.
  - c) B çözeltisi: 20 mg Fast Red TR tuzu 20 mL 0.1 M Tris tamponunda (pH 7.5) çözüldü.

#### **2.2.3.4. Sıvı ve Katı Besiyerleri**

Luria-Bertani Besiyerinin (LB) Hazırlanması: 10 g tripton, 5 g maya ekstreği ve 5 g NaCl yaklaşık 980 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1N NaOH ile 7.5' e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1 L'ye tamamlanarak 121 °C'de ve 1.1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd., 1989).

Luria-Bertani Agar Besiyerinin (LB Agar) Hazırlanması: 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı ve 5 g NaCl ve 15 g agar yaklaşık 980 mL saf suda çözüldükten sonra pH' sı 1N NaOH ile 7.5' e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1 L'ye tamamlanarak 121 °C' de ve 1.1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Maniatis vd., 1989).



## 2.2.4. Deneysel Çalışmalar

### 2.2.4.1. *Geobacillus stearothermophilus* AH22 Suşunun Büyütülmesi

*Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşu Luria-Bertani Besiyeri (LB) ortamında 55 °C' de 16 saat boyunca büyütüldü. Elde edilen kültür soğutmalı (4 °C) ultrasantrifüjde 18.000 g' de 10 dakika santrifüjlenerek bakteriler çöktürüldü. Çöktürülen bu bakteriler sonikatörde parçalanıp lipaz kaynağı olarak kullanılmak üzere -20 °C ' de buzdolabına konuldu.

### 2.2.4.2. Hücre içi Lipazın Eldesi

Bakteri çökeleği 50 mM pH 7.5Tris tamponunda süspanse edildi. Elde edilen süspanسیون sonikatörde 5 dakika boyunca parçalandı. Parçalama işleminden sonra elde edilen homojenat soğutmalı santrifüjde 18.000 g' de 4 °C' de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham lipaz kaynağı olarak kullanıldı. Gerekli enzim aktivitesi bakıldı ve protein tayini yapıldıktan sonra hesaplamalar yapıldı.

### 2.2.4.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipaz aktivitesi *p*NPA (*p*-nitrofenil asetat), *p*NPB (*p*-nitrofenil butirat), *p*NPO (*p*-nitrofenil oktaonat), *p*NPL (*p*-nitrofenil laurat) substratları varlığında spektrofometrik olarak belirlendi. Substratların asetonitril içerisinde 10 mM konsantrasyonunda hazırlanmış çözeltisi, etil alkol ve 50 mM fosfat tamponu ile (pH 7.5) 1:4:95 (h/h/h) oranında karıştırılarak substrat karışımı hazırlandı. Bu karışımdan 980 µL alındı ve içerisine 20 µL enzim çözeltisi ilave edildikten sonra oda sıcaklığında absorbans değişimleri 405 nm dalga boyunda ölçüldü. Aktivite oda sıcaklığında dakikada 1 µmol *p*-nitrofenol açığa çıkarmak için gerekli enzim miktarı olarak belirlendi ve özgül aktivite mg protein başına düşen aktivite olarak hesaplandı.

#### **2.2.4.4. Safılaştırma Aşamaları**

##### **2.2.4.4.1. Sıcaklık Etkisi ile Proteinlerin Çöktürülmesi**

Sonikasyon sonrası elde edilen ham enzim kaynağı 50-90 °C arası sıcaklıklarda 15 dakika ve 30 dakika olmak üzere su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ısıyla beraber denatüre olan proteinleri çöktürmek için +4 °C' de 18.000 g' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra her bir örneğin süpernatant kısmında aktivite ve protein tayini yapılarak uygun sıcaklık ve inkübasyon süresi belirlendi.

##### **2.2.4.4.2. Dietilaminoetil-Selüloz (DEAE-Selüloz) Kolonu**

Isı şoku sonrası lipaz içeren protein karışımı 25 mM Tris tamponunda (pH 8.0) ile önceden dengeye getirilen DEAE-Selüloz kolonuna tatbik edildi. Kolon 0- 200 mM NaCl içeren Tris tamponuyla (pH 8.0) 50 şer birim artan tuz gradiyenti oluşturularak yıkandı. Ayrılan fraksiyonlar 5 mL' lik hacimler olarak toplandı. Her bir fraksiyonda protein ve aktivite tayini yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek Amicon Ultracel Membran 10.000 MWCO Milipore (+4 °C, 4000 g) ile konsantre edildi. Konsantre edilen enzim çözeltisinde aktivite ve protein tayini yapılarak özgül aktivite hesaplandı.

##### **2.2.4.4.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi**

###### **2.2.4.4.3.1. Sefadex G-150 Kolonu**

Jel filtrasyon kromatografisi için 60 cm x 3 cm ebatlarında bir kolon ve kolon dolgu maddesi olarak Sefadex G-150 kullanıldı. Sefadex G-150 boncukları pH 10.0 0.1 M olan NaHCO<sub>3</sub> tamponunda şişirildikten sonra 50 mM fosfat tamponuna (pH 7.5) tamponu içine alındı. Dolgu malzemesi ve kullanılan tüm çözeltilerin gazı bir vakum pompası yardımıyla alındıktan sonra Sefadex G-150 dolgu malzemesi pastör pipeti yardımıyla dikkatlice kolona yüklendi. Yükleme işleminin ardından kolon 1 L pH 7.5 50 mM fosfat tamponunun geçirilmesiyle dengeye getirildi. Sonra kolonun akış hızı 0.5 mL/dak olacak şekilde ayarlanıp DEAE-Selüloz kolonunda aktivite gösteren

fraksiyonlardan toplanan enzim çözeltisi kolona yüklendi. Proteinleri elüe edebilmek için kolondan protein çıkışı sona erene kadar denge tamponu geçirildi. Kolondan çıkan elüatlar 6'şar mL' lik fraksiyonlar halinde ayrı ayrı tüplerde toplandı. Toplanan elüatlarda 280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Protein gözlenen tüplerde aktivite ölçümü yapıldı. Aktivite gözlenen elüatlarda protein miktarını belirlemek amacıyla protein tayini yapıldı. Lipaz aktivitesinin yüksek olduğu ve protein içeriği olarak da benzerlik gösteren elüatlarda doğal elektroforezi yapıldı. Aktivite gösteren elüatlar birleştirildi. Elde edilen enzim elüatları, Amicon Ultracell Membran 10.000 MWCO Milipore (+4 °C, 4000 g) kullanılarak deriştirildi. Konsantre işleminden sonra elde edilen çözelti tekrardan aynı kolona yüklendi ve aynı işlemler tekrar edildi.

#### **2.2.4.4.3.2. Sefadeks G-25 Kolonu**

Sefadeks G-150 kolonunun aktivite gösteren fraksiyonları Amicon Ultracell Membran 10.000 MWCO Milipore ile konsantre edildikten sonra Sefadeks G-25 tatbik edildi. Bütün fraksiyonlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar elektroforez yapılarak benzer profil gösterenler birleştirilip konsantre edildi.

#### **2.2.4.5. Protein Tayini**

Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (Lowry vd., 1951) ve protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiği çizilebilmek amacıyla hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konuldu. Bu şekilde tüplerde BSA' nın nihai konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 µL olması sağlandı. Standart içeren tüplerin dışında ham enzim kaynağından, amonyum sülfatla çöktürülen ve amikon filtreden geçirilen protein karışımından ve saf proteinden ayrı bir deney tüpüne 5 µL ilave edildi. Standartların ve örneğin son hacimlerini 500 µL tamamlayacak şekilde 0.1N NaOH içindeki %0.1 (a/h) SDS çözeltisinden ilave edilip vorteksledi. Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi (%2 sodyum-potasyum tartarat, %1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ve 0.1N NaOH içerisinde %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ilave edilip vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 µL ilave

edildi ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. 650 nm’de absorbanslar okundu. Kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

#### 2.2.4.6. Elektroforez

Saflaşmanın derecesini belirlemek için %10’ lik doğal-PAGE ve molekül ağırlığını belirlemek için %12’ lik SDS-PAGE yapıldı.

##### 2.2.4.6.1. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS-PAGE, Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre %5’ lik yığma jeli ve %12’ lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 14).

Hazırlanan jel karışımı plakalar arasına yüklendikten sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Kuyucuğun birine enzimin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile molekül ağırlıkları 10-250 kDa arasında değişen proteinleri içeren standart protein çözeltisi yüklendi. Daha sonra diğer her bir kuyucuk yaklaşık 40 µg protein içerecek şekilde doğal SDS-PAGE yükleme boyası ile karıştırıldı ve kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Bu sayede üç boyutlu yapısı bozulan proteinler Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi.

**Tablo 14.** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları.

	%5’lik Yığma Jeli Bileşenleri (mL)	%12’ luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	4,0
%30 Akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
1.0 M Tris (pH 6.8)	0,5	---
1.5 M Tris (pH 8.8)	---	2,5
%10 SDS	0,04	0,1
% 10 APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, proteinler, yığma jelinden çıkana kadar 20 mA’de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1.5 saat 25 mA’ de yürütüldü. Tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi ilave edildi ve 3 saat boyunca boyamaya bırakıldı. Boyanan jel,

boyanın fazlasını uzaklaştırmak ve protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandı.

#### 2.2.4.6.2. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE)

Doğal PAGE, SDS içermeyecek şekilde hazırlanan %5' lik yığıma jeli ve %10' uk ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 15).

**Tablo 15.** Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları.

	%5' lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	%10' luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	3,1
% 30 Akrlamid/bisakrlamid	0,67	3,3
1.0 M Tris (pH 6.8)	0,5	---
1. M Tris (pH 8.8)	---	2,5
% 10 APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

Jel SDS-PAGE' de olduğu gibi ancak SDS içermeyecek şekilde hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Her bir kuyucuk yaklaşık 40 µg protein içerecek şekilde doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırıldı ve Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Elektrofrez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilerek, boya yığıma jelinden çıkana kadar 20 mA' de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 1-1.5 saat 25 mA' de yürütüldü.

#### 2.2.4.6.3. "Fast Red" ile Substrat Boyama

%12' lik SDS-PAGE yapıldıktan sonra 1 saat 60 °C' de renatürasyon çözeltisinde bekletildi. Daha sonra renatüre edilmiş %12' lik SDS-PAGE jeli ve %10' luk doğal-PAGE jeli de 60 °C' de Fast Red A ve B çözeltilerinin karışımında (1:1) 30 dakika bekletildi. Kırmızı-kahverengi bantların varlığı bir lipaz varlığını göstermektedir.

#### **2.2.4.6.4. “Coommassie Blue R 250” ile Boyama**

Fast Red boyamasından sonra elektroforetik jeller doğrudan Coommassie Blue R 250 çözeltisi ile boyandı. Böylece bütün proteinlere ait bantların varlığı gözlemlendi. %10' luk doğal-PAGE ile saflaştırma aşamalarındaki saflaştırma derecesi belirlendi. %12' lik SDS-PAGE jeli üzerinde ise standartlarla karşılaştırılarak mevcut lipazın molekül ağırlığı belirlendi.

#### **2.2.4.7. Kısmi Olarak Saflaştırılan *Geobacillus stearothermophilus* AH22 Lipazının Biyokimyasal Karakterizasyonu**

Lipazın kinetik özelliklerini araştırmak için, belirlenen en iyi substrat kullanılarak enzimin en iyi aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık değerleri; ısı ve pH kararlılığı; protein miktarının ve metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelendi. Ayrıca farklı substratlar için  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri tayin edilerek hesaplandı.

##### **2.2.4.7.1. pH' ın Etkisi**

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi, pH'ın bir fonksiyonu olarak farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat kullanılarak belirlendi. Bunun için, 50 mM konsantrasyonda hazırlanan; pH 4.0-5.0 arasında Asetat tamponu, pH 6.0-7.0 arasında MOPS tamponu, pH 8.0-9.0 arasında Tris-HCl tamponu ve pH 10.0-12.0 arasında Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Tespit edilen optimum pH değerinden faydalanılarak substrat konsantrasyonunun, protein miktarının ve diğer parametrelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

##### **2.2.4.7.2. Sıcaklığın Etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 10 °C'lik artışlarla 10-80 °C aralığında sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. Tampon ve substrat çözeltisi karışımları, belirlenen optimum pH değerinde ve belirtilen sıcaklık aralığında 15 dakika inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar sıcaklığın fonksiyonu olarak grafiğe aktarıldı. Grafikte gözlenen tek pik optimum sıcaklık değeri olarak alındı.

### 2.2.4.7.3. Protein Konsantrasyonunun Etkisi

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının konsantrasyonunun değiştirilmesiyle enzim aktivitesinin değişimini incelemek ve aktivenin en yüksek olduğu optimum protein miktarını belirlemek amacıyla, önceden belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta ve sabit substrat konsantrasyonunda proteinin değişen miktarlarına karşılık (0.5–100 µg/mL) aktivite değişimi ölçüldü ve grafiğe geçirildi.

### 2.2.4.7.4. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimin aktivite gösterdiği en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, oda sıcaklığında ve daha önceden belirlenen optimum pH ve protein konsantrasyonunda enzim aktivitesi *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat substratlarının değişen miktarlarına (0.01-1 mM) karşı belirlendi. Enzim konsantrasyonu ise protein miktarı reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyon 30 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. Diğer parametrelerin belirlenmesinde ölçülen en yüksek hız değerindeki substrat konsantrasyonu kullanıldı. Elde edilen veriler grafiğe geçirilerek Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla her bir substrat için  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.

### 2.2.4.7.5. Isıl Kararlılığın İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla enzim; oda sıcaklığı, 40, 60, 70, 80 °C ve 90 °C sıcaklıklarda enzimin aktivitesine bağlı olarak toplam 15 güne kadar değişen sürelerde inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. *Geobacillus stearothermophilus* AH22 lipazının kalan yüzde aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı.

### 2.2.4.7.6. pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4-10 arasında enzim-tampon karışımları +4 °C' de 30 gün boyunca inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde

hazırlanan ancak inkübasyona bırakılmamış enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bulunarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı.

#### 2.2.4.7.1. $\Delta H$ , $\Delta S$ ve $\Delta G$ Değerlerinin Hesaplanması

##### 2.2.4.7.1.1. Hız Sabitinin Hesaplanması

$$k = - \frac{1}{\text{zaman(saniye)}} \ln (\Delta t / \Delta o) \quad (1)$$

$k$  = Hız sabiti ( $s^{-1}$ )

$\Delta t$  = Kalan aktivite (ısıtma işleminden sonraki enzim aktivitesi)

$\Delta o$  = Isıtma işleminden önceki enzim aktivitesi

##### 2.2.4.7.1.2. Aktivasyon Enerjisinin ( $E_a$ ) Hesaplanması

$$\ln k = C - E_a/RT \quad (2)$$

2. eşitlik yardımıyla  $E_a$  bulunur.

$k$  = hız sabiti ( $s^{-1}$ )

$E_a$  = aktivasyon enerjisi ( $J \text{ mol}^{-1}$ )

$R$  =  $8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

$T$  = Kelvin sıcaklık ( $^{\circ}\text{K}$ )

Bu eşitliği  $y = mX + n$  şeklinde düşünüldüğü takdirde  $\ln k = (-E_a/R) 1/T + C$  olur. Şayet  $\ln k$ , y eksenini;  $1/T$ , X eksenini oluşturacak şekilde grafik çizildiğinde eğim  $-E_a/R$  olacaktır. Bu doğrunun eğiminden  $E_a$  değeri hesaplanır.



### 2.2.4.7.1.3. Serbest Enerjinin ( $\Delta G$ ) Hesaplanması

$$\Delta G^\# = RT \ln (kT/K) \quad (3)$$

$\Delta G^\#$  = Gibbs serbest enerji değişimi ( $J \text{ mol}^{-1}$ )

R = 8.3145  $J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = Kelvin sıcaklık ( $^\circ \text{K}$ )

K = Hız sabiti

### 2.2.4.7.1.4. Entalpi ( $\Delta H$ ) Değişiminin Hesaplanması

$$\Delta H^\# = E_a - RT \quad (4)$$

$\Delta H^\#$  = Entalpi değişimi ( $J \text{ mol}^{-1}$ )

### 2.2.4.7.1.5. Entropi ( $\Delta S$ ) Değişiminin Hesaplanması

$$\Delta S^\# = (\Delta H^\# - \Delta G^\#)/T \quad (5)$$

$\Delta S^\#$  = Entropi değişimi ( $J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

### 2.2.4.7.2. Bazı Kimyasallar, Deterjanlar, Anyonlar ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0.1, 0.5 ve 1.0 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi de aynı konsantrasyonlarda çalışıldı.

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisini incelemek amacıyla  $\text{OH}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$  ve  $\text{HSO}_3^-$  anyonlarının sodyum tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri

kullanıldı. Anyonların reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0.1, 0.5 ve 1.0 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı.

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini incelemek amacıyla Triton X-114, Triton X-100, Tween 80 ve SDS kullanıldı. Bu deterjanların 50 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Yüzey aktif maddelerin reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0-30 mM arasında olacak şekilde ilave edilerek, oda sıcaklığında ve optimum pH'da aktivite tayinleri yapıldı.

Ayrıca  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$ -ME) nihai konsantrasyonları sırasıyla 0.1, 0.5 ve 1.0 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu, anyon, deterjan ve kimyasal içermeyen karışımın aktivitesi elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak % bağıl aktiviteler hesaplandı. Öte yandan inhibitör etkisini incelemek üzere orlistat, kateşin, katekol, propil paraben, *p*-kumarik asit, 3,4- dihidroksi hidrosinamik asit ve PMSF kullanıldı. Bu maddelerin reaksiyon ortamında farklı konsantrasyonlarıyla çalışılarak enzim aktivitesini yarıya düşüren madde miktarları ( $IC_{50}$ ) belirlendi.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. İntraselüler Lipazın Eldesi**

Luria-Bertani Besiyeri (LB) ortamında 55 °C' de 16 saat boyunca büyütülen *G. stearothermophilus* AH22 suşu soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek bakteriler çöktürüldükten sonra pH 7.5 50 mM fosfat tamponunda süspanse edilerek sonikatörde 5 dakika boyunca parçalandı. Parçalama işleminden sonra elde edilen homojenat soğutmalı santrifüjde 18.000 g' de 4 °C'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi ve 100 mL süpernatant elde edildi. Elde edilen ham enzim kaynağının protein içeriği 9.32 mg/mL ve özgül aktivitesi ise 0.22 EU/mg protein olarak bulundu (Tablo 16).

#### **3.2. Saflaştırma Aşamaları**

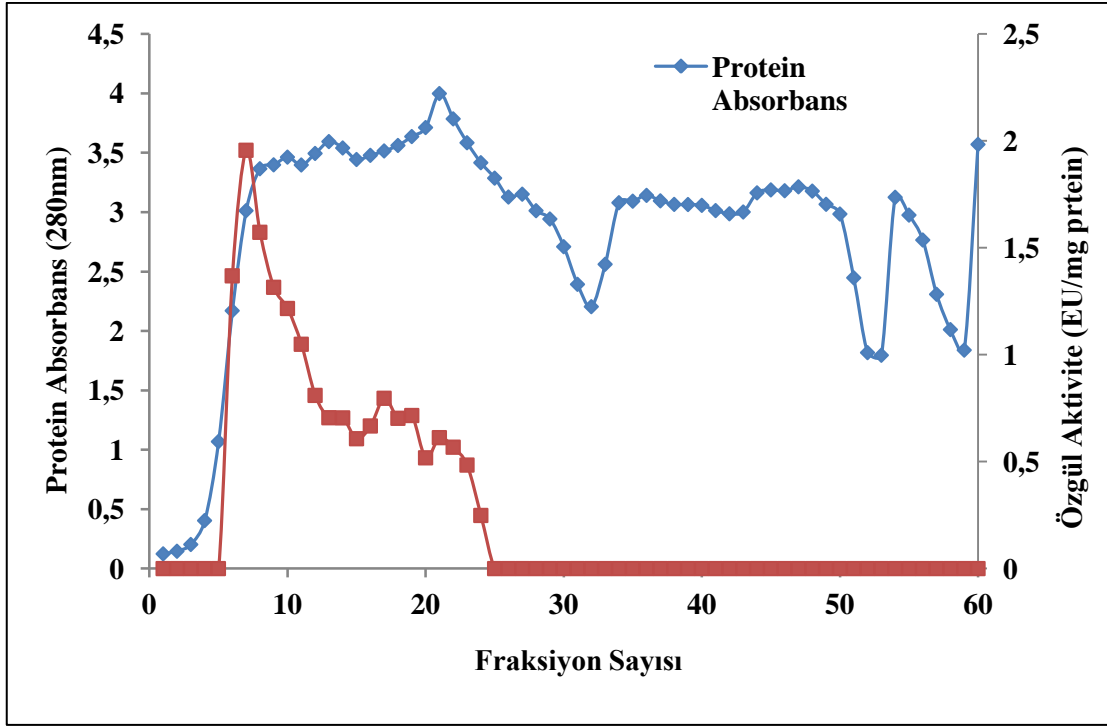
##### **3.2.1. Sıcaklık Etkisi ile Proteinlerin Çöktürülmesi**

Sonikasyon sonrası elde edilen enzim kaynağı 50-90 °C arası sıcaklıklarda 15 dakika ve 30 dakika olmak üzere su banyosunda inkübe edildi. Ardından ısıyla beraber denatüre olan proteinleri çöktürmek için santrifüj edildi. Santrifüjden sonra her bir örneğin süpernatant kısmında aktivite ve protein tayini yapılarak uygun sıcaklığın 70 °C ve inkübasyon süresinin 30 dakika olduğu belirlendi. Uygun sıcaklıkta yapılan ısı muamelesinden sonra yapılan protein tayini ve aktivite çalışmalarında protein miktarı 6.5 mg/mL, özgül aktivitesi 0.28 EU/mg protein ve enzimin saflaştırma katsayısı 1.3 olarak belirlendi (Tablo 16).

##### **3.2.2. Dietilaminoetil-Selüloz (DEAE-Selüloz) Kolonu**

Isı şoku sonrası lipaz içeren protein çözeltisi pH 8.0 25 mM Tris tamponu ile dengeye getirilmiş olan DEAE- Selüloz kolonuna tatbik edildi. Kolon 0- 200 mM NaCl içeren pH 8 Tris tamponuyla 50' şer birim artan tuz gradiyenti oluşturularak yıkandı. Ayrılan fraksiyonlar 5 mL' lik hacimler olarak toplandı. Her bir fraksiyonda protein ve aktivite tayini yapıldı ve 6-24 arası fraksiyonlarda aktivite gözlemlendi (Şekil 6). Aktivite

gösteren fraksiyonlar birleştirilerek Amicon Ultracell Membran 10.000 MWCO Milipore ile konsantre edildi. Konsantre edilen enzim çözeltisinde aktivite ve protein tayini yapılarak protein miktarı 2.6 mg/mL ve özgül aktivitesi ise 1.2 EU mg<sup>-1</sup> olarak hesaplandı (Tablo 16).



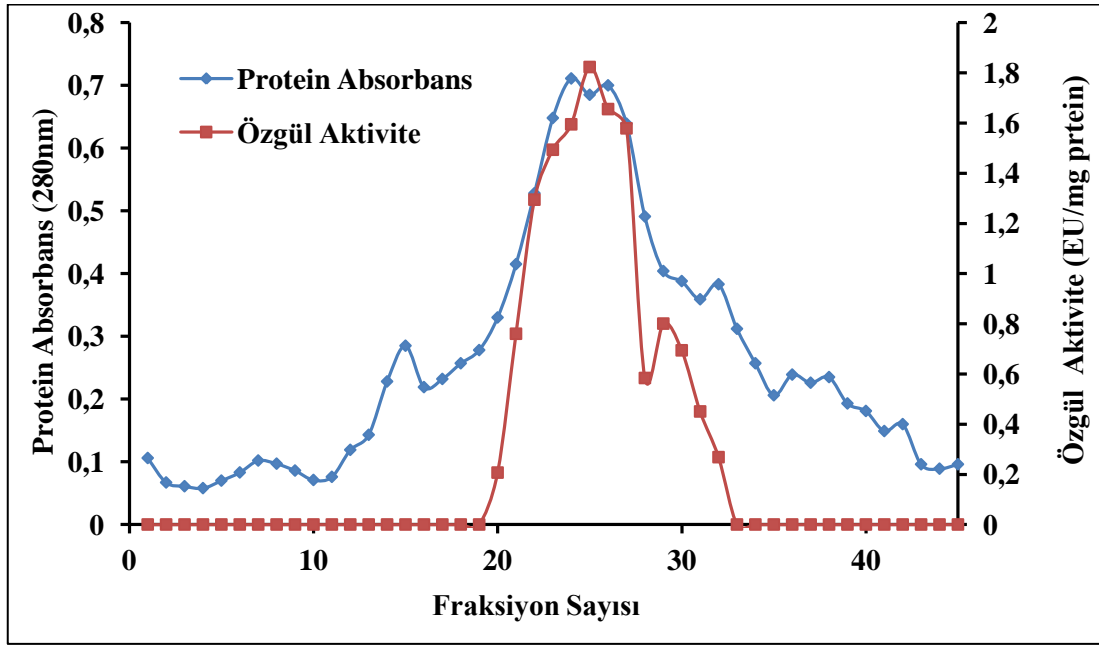
Şekil 6. DEAE- Selüloz kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve özgül aktivite değerleri.

### 3.2.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi

#### 3.2.3.1. Sefadeks G-150 Kolonu

Dengeye getirilmiş Sefadeks G-150 kolonuna DEAE- Selüloz kolonunda aktivite gösteren fraksiyonların birleştirilmesiyle elde edilen 29 mL enzim çözeltisi yüklendi. Kolondan protein çıkışı sona erene kadar denge tamponu olan pH 7.5 50 mM fosfat tamponu geçirildi. Kolondan çıkan elüatlar 6' şar mL' lik fraksiyonlar halinde ayrı ayrı tüplerde toplandı. Toplanan elüatlarda 280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Ayrıca her bir fraksiyon için protein ve aktivite çalışmaları yapıldı. 21-31 arasındaki fraksiyonlarda aktivite gözlemlendi. Protein yoğunluğunun fazla olduğu fraksiyonlarda aktivitenin de yüksek olduğu gözlemlendi. Protein içeren diğer fraksiyonlarda aktivitenin olmaması

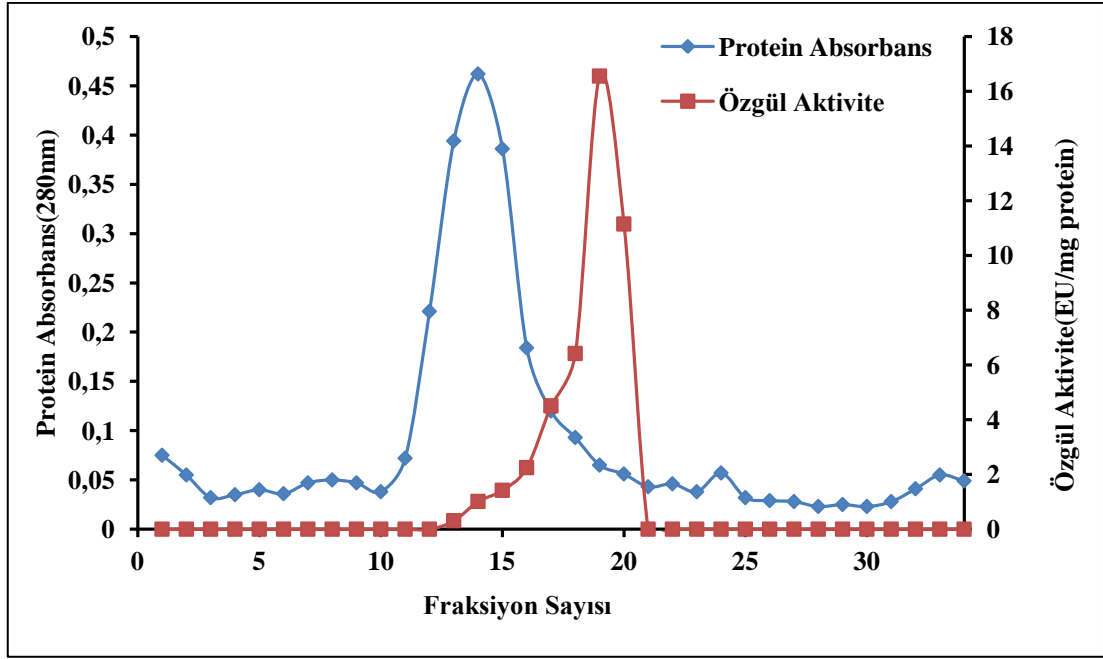
saflaştırma için enzim dışı proteinlerin bir kısmının uzaklaştırıldığını göstermektedir (Şekil 7). Lipaz aktivitesinin yüksek olduğu elüatlarda protein elektroforezi yapıldı. Elektroforez sonrası benzer protein bantının gözlemlendiği elüatlar birleştirildi. Amicon Ultracell Membran 10.000 MWCO Milipore kullanılarak konsantre edilen enzim çözeltisinde protein miktarı 2.32 mg/mL ve özgül aktivitesi ise 2.3 EU mg<sup>-1</sup> protein olarak hesaplandı (Tablo 16) . Konsantre işleminden sonra elde edilen çözelti tekrardan aynı kolona yüklendi ve aynı işlemler tekrar edildi.



Şekil 7. Sefadeks G-150 kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve özgül aktivite değerleri.

### 3.2.3.2. Sefadeks G-25 Kolonu

Sefadeks G-150 kolonu sonrası konsantre edilen enzim çözeltisi Sefadeks G-25 kolonuna tatbik edildi. Bütün fraksiyonlarda aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar elektroforez yapılarak benzer profil gösterenler birleştirilip konsantre edildi ve 11 mL enzim çözeltisi elde edildi. Protein yoğunluğunun azaldığı 15-21 nolu Fraksiyonlarda aktivitenin yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 8). aktivitenin yüksek olduğu tüpler birleştirildikten sonra Amicon Ultracell Membran 10.000 MWCO Milipore kullanılarak konsantre edildi. Konsantre edilen enzim çözeltisinde protein miktarı 0.91 mg/mL ve özgül aktivitesi ise 3.96 EU mg<sup>-1</sup> protein olarak hesaplandı (Tablo 16).



**Şekil 8.** Sefadeks G-25 kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve özgül aktivite değerleri.

Saflaştırma aşamalarında ham enzim özütünün ve uygulanan kromatografik yöntemlerde elde edilen tüm enzim çözeltilerinin protein miktarları Lowry yöntemiyle belirlenip özgül aktivite hesaplandı (Tablo 16).

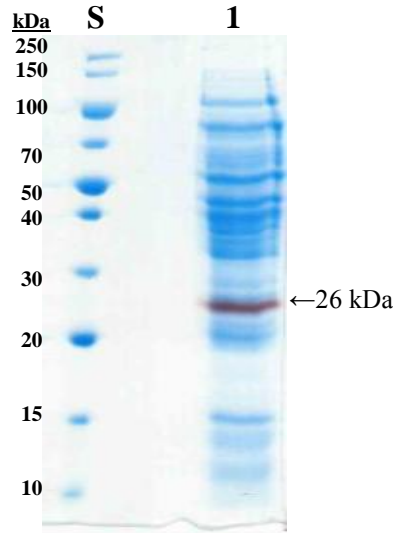
**Tablo 16.** *G. stearothermophilus AH22*' ten kısmi olarak saflaştırılan lipaz enzimine ait saflaştırma tablosu.

	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite(EU/mL)	Toplam Aktivite (EU)	Özgül Aktivite (EU/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	Verim(%)
Ham Enzim Özütü	100	9,32	932	2,01	201	0,216	1	100
Isı Şoku sonrası (70 °C de 30 dk)	95	6,5	617,5	1,8	171	0,28	1,3	85
DEAE-Selüloz	30	2,6	78	3,15	94,5	1,21	5,6	47
Sefadeks G-150	13	2,32	30,2	5,375	69,875	2,31	10,7	34,7
Sefadeks G-150 2. Yükleme	12,5	1,37	17,125	4,1	51,25	2,99	13,85	25,5
Sefadeks G-25	11	0,91	10	3,60	39,6	3,96	18,3	19,7

Ayrıca uygulanan bu kolonlardan başka da enzim içeren protein çözeltisi hidrofobik bir kolon olan octyl-sepharose kolonuna tatbik edildi. Fakat toplanılan fraksiyonların hiçbirinde aktivite gözlenmedi. Bu nedenden dolayı bu kolon saflaştırılma aşamalarından çıkarıldı.

### 3.2.4. Elektroforez ve Substrat Boyaması

SDS-PAGE Sambrook vd. (1989) göre %5' lik yığıma jeli ve %12' lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 14). Saflaştırma aşamalarından alınan her bir örnek bir kuyucuğa tatbik edildi. Kullanılan standart proteinler referans alınarak molekül ağırlığı yaklaşık 26 kDa olarak belirlendi (Şekil 9).

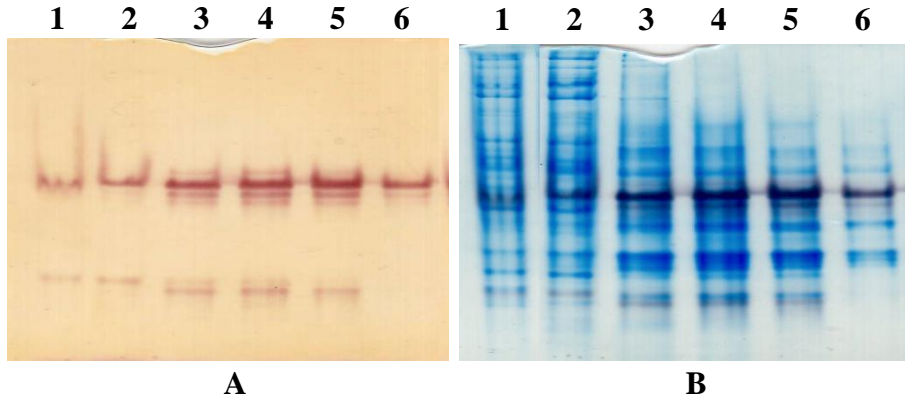


**Şekil 9.** SDS-PAGE Elektroforezi  
S: Standart; 1: Ham enzim çözeltisi.

%10' lik PAGE yapıldıktan sonra jel 60 °C de Fast Red substrat boyama çözelti karışımında 30 dakika bekletildi. Kırmızı-kahverengi bantların varlığı lipaz enziminin aktivitesinin varlığını göstermektedir (Şekil 10 A).

Fast Red boyamasından sonra elektroforetik jel doğrudan Coomassie Blue R 250 çözeltisi ile boyandı. Böylece bütün proteinlere ait bantların varlığı gözlemlendi. Kuyucuklardaki bantlara bakıldığında saflaştırılma aşamalarında proteinlerin büyük bir kısmının uzaklaştırıldığı fakat tam olarak bir saflaştırma değil de kısmi bir saflaştırmanın

gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 10 B).



**Şekil 10.** A: Substrat Boyaması, B: Doğal PAGE elektroforezi.

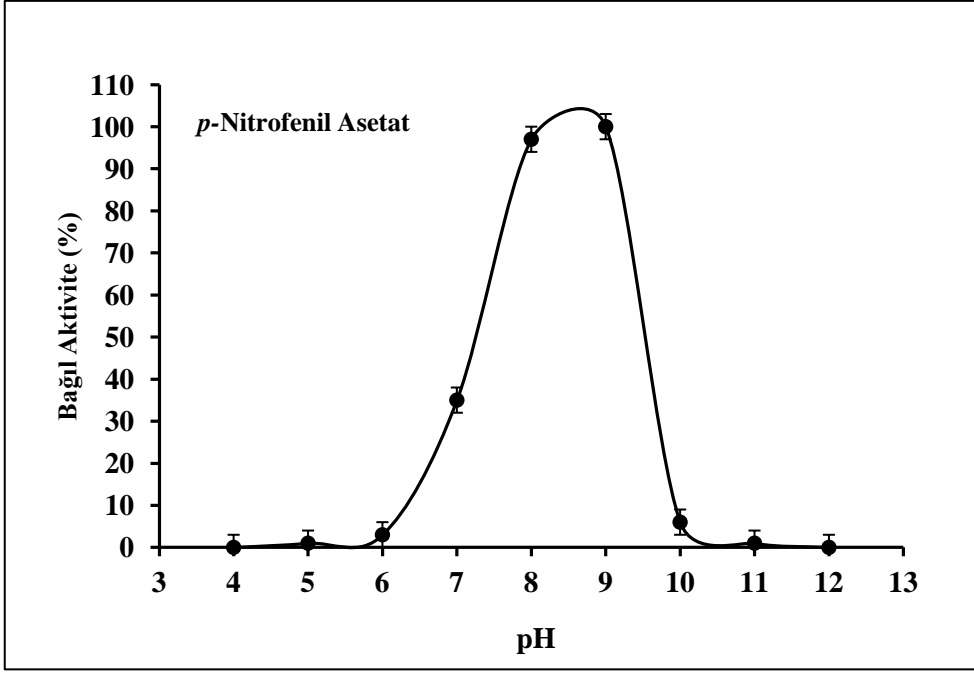
1: Ham enzim çözeltisi; 2: Isı şoku sonrası (30 dak. 70°C); 3: DEAE Selüloz kolonundan sonra birleştirilmiş fraksiyonlar; 4: Sefadeks G-150 kolonundan sonra birleştirilmiş fraksiyonlar; 5:2. Sefadeks G-150 kolonundan sonra birleştirilmiş fraksiyonlar; 6: Sefadeks G-25 kolonundan sonra birleştirilmiş fraksiyonlar.

### 3.2.5. Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

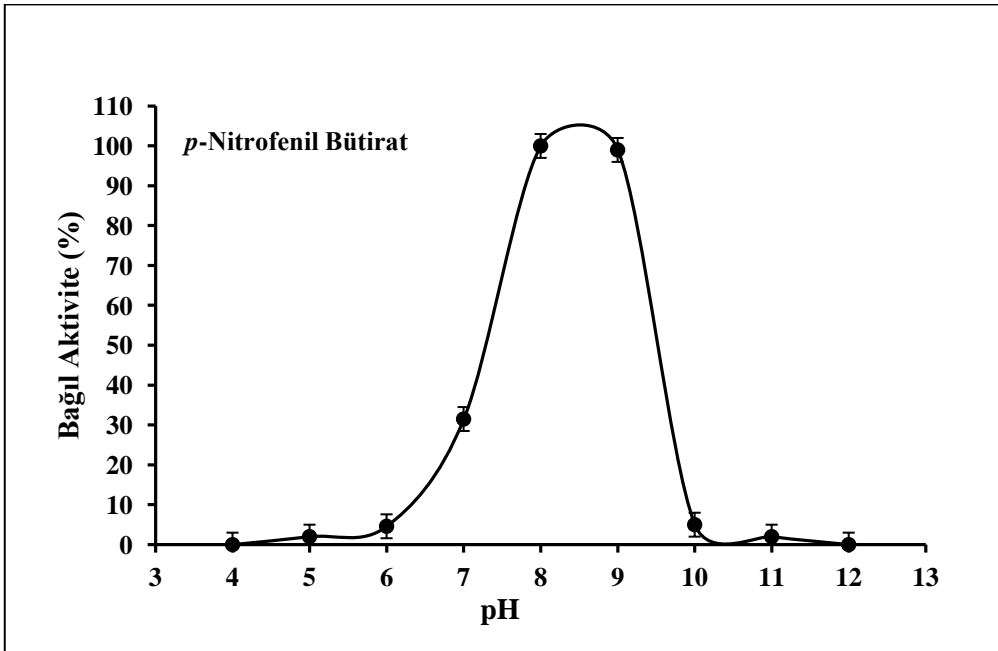
#### 3.2.5.1. pH' ın Etkisi

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının optimum pH değeri farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat kullanılarak belirlendi. Elde edilen veriler grafiğe geçirildi. Optimum pH değerleri *p*-nitrofenil asetat için 8-9 arası, *p*-nitrofenil bütirat için 8-9, *p*-nitrofenil oktaonat için 8- 10 arası ve *p*-nitrofenil laurat için ise 10-11 arası olarak belirlendi. Genel olarak bakıldığında *p*-nitrofenil laurat hariç diğer substratlarda optimum pH'ın 8-9 civarında olduğu gözlemlendi (Şekil 11–14). pH 10' dan sonra ise substratların kendiliğinden hidroliz olduğu gözlemlendi.

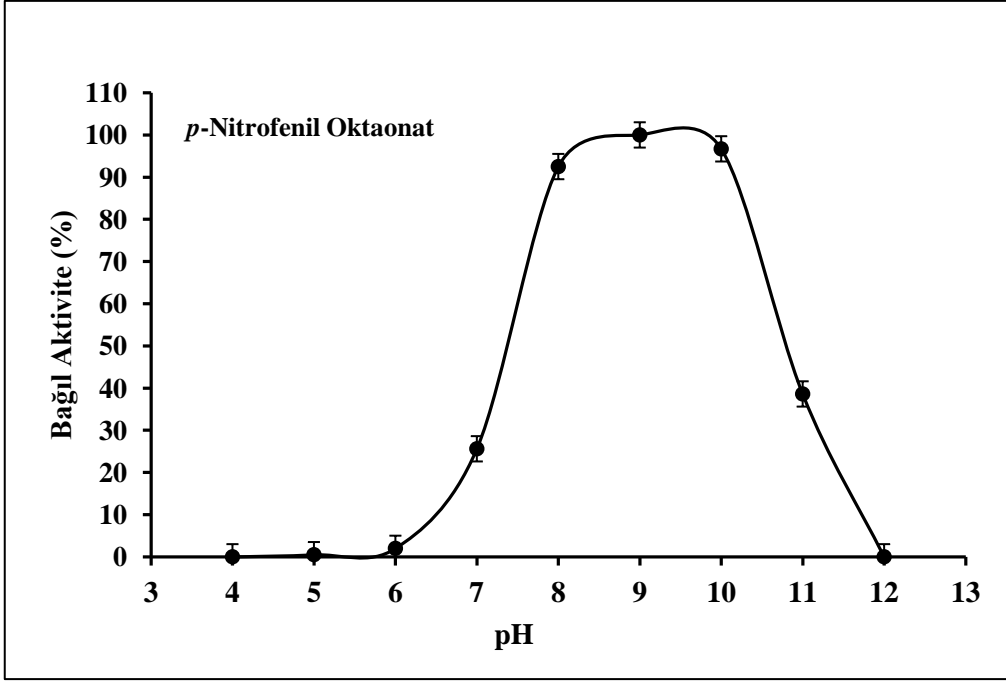




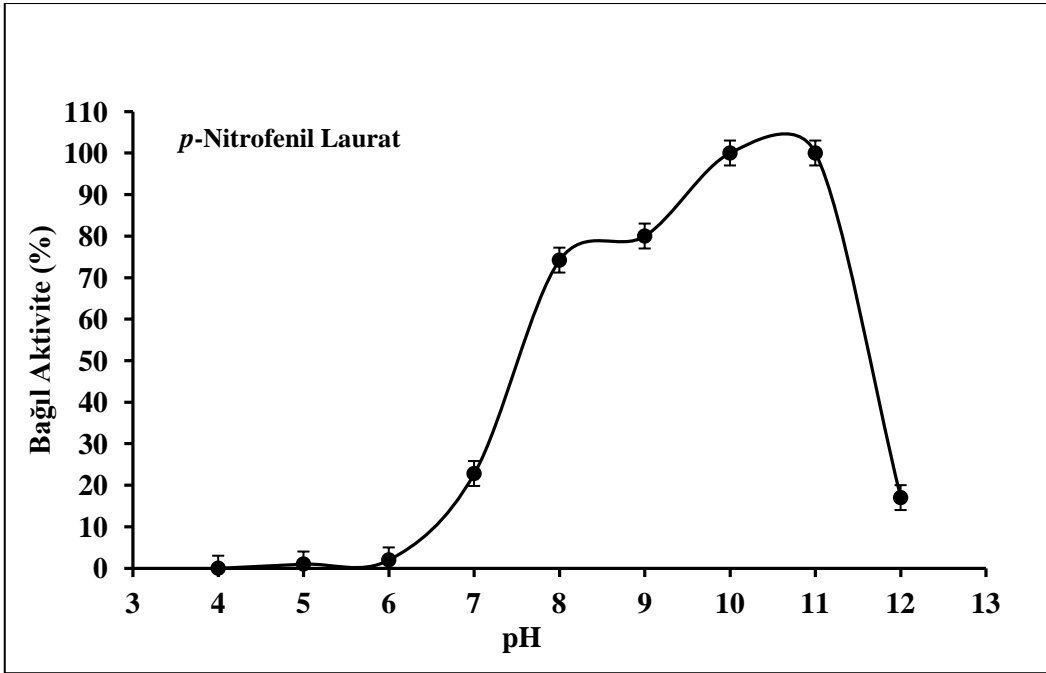
Şekil 11. *p*-Nitrofenil asetat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.



Şekil 12. *p*-Nitrofenil bütirat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.



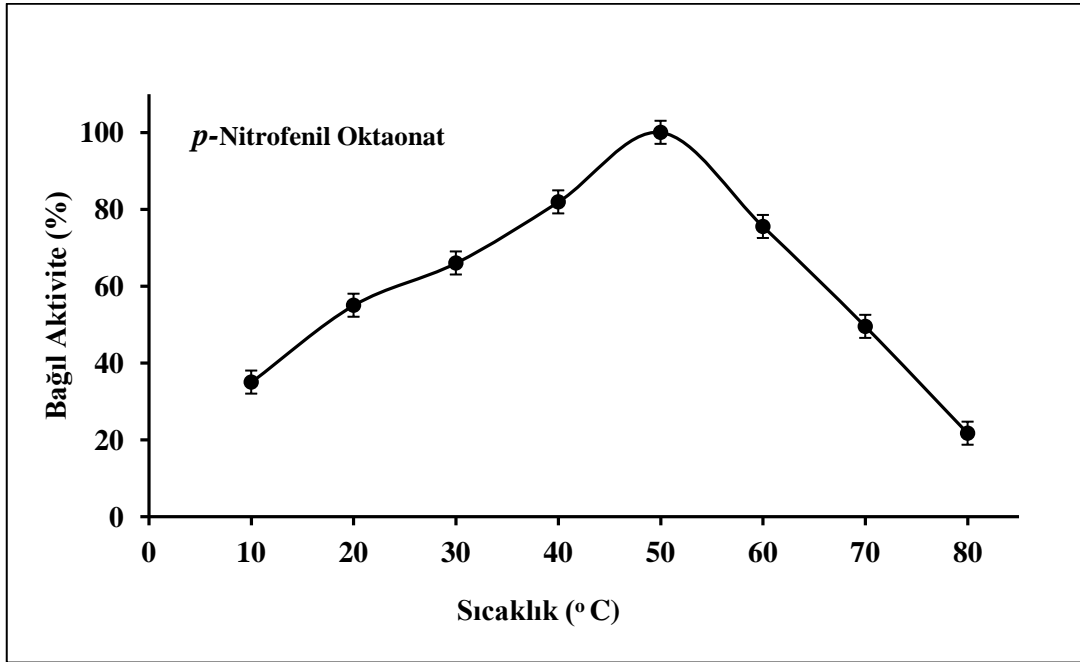
Şekil 13. *p*-Nitrofenil oktaonat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.



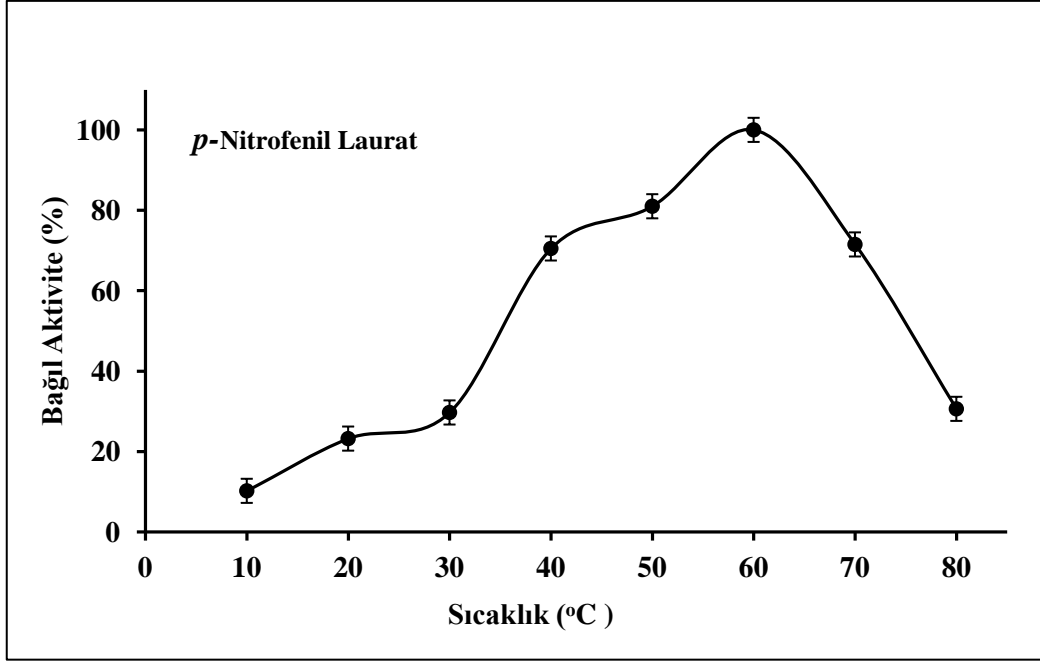
Şekil 14. *p*-Nitrofenil laurat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.

### 3.2.5.2. Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 10 °C' lik artışlarla 10-80 °C aralığında sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. Tampon ve substrat çözeltisi karışımları, belirlenen optimum pH değerinde ve belirtilen sıcaklık aralığında, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat substratları kullanılarak yapılan 15 dakika inkübasyon sonucunda elde edilen veriler sıcaklığın fonksiyonu olarak grafiğe aktarılarak her iki substrat için optimum sıcaklık değeri belirlendi. Optimum çalışma sıcaklığı *p*-nitrofenil oktaonat için 50 °C, *p*-nitrofenil laurat için ise 60 °C olarak belirlendi (Şekil 15-16). *p*-nitrofenil oktaonat substratı için 40 ve 60 °C' de aktivitenin yaklaşık %80' i, 30 °C' de yaklaşık %60' ı, 70 °C' de ise %50' sinin korunduğu gözlemlendi (Şekil 3.9). *p*-nitrofenil laurat için 40 ve 70 °C' de aktivitenin yaklaşık %70' i, 50 °C' de ise %80' inin korunduğu gözlemlendi (Şekil 15).



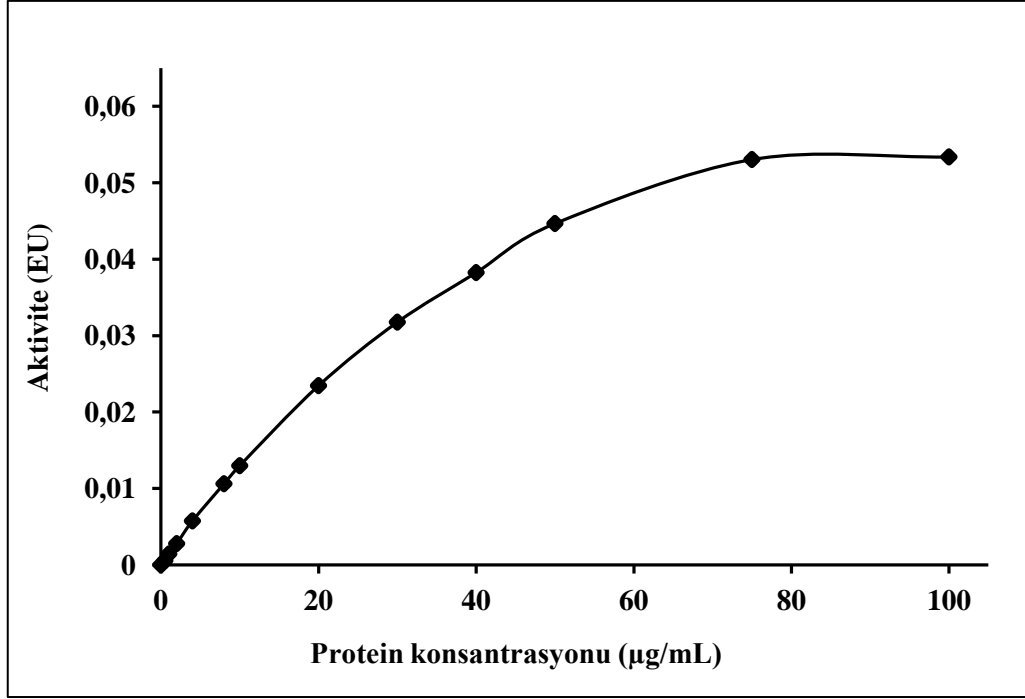
Şekil 15. *p*-Nitrofenil oktaonat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 16. *p*-Nitrofenil laurat substratı varlığında enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

### 3.2.5.3. Protein Konsantrasyonunun Etkisi

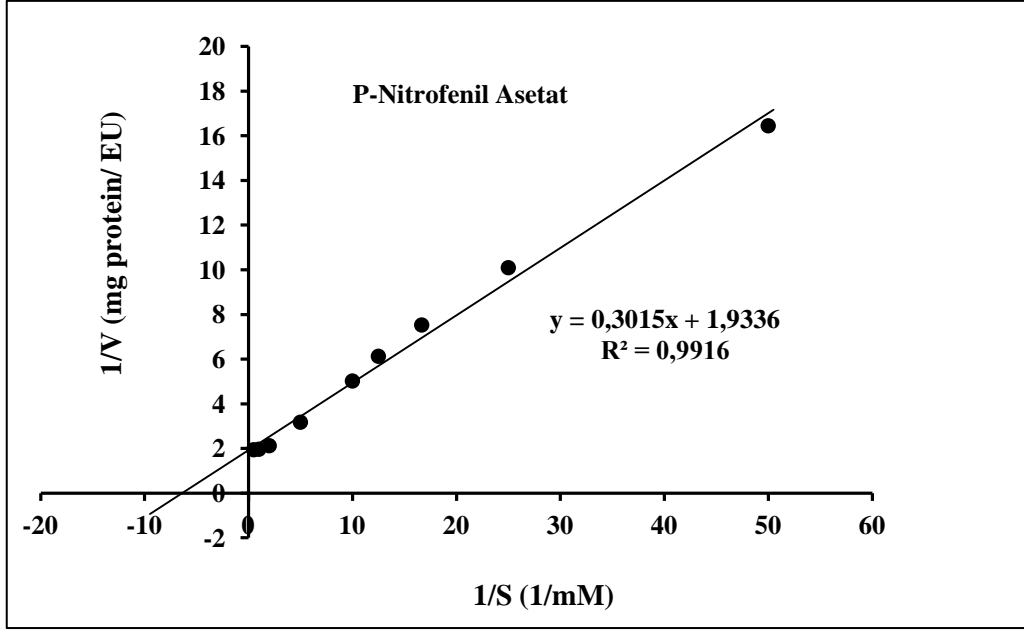
*G. stearothermophilus* AH22 lipazının konsantrasyonunun değiştirilmesiyle enzim aktivitesinin değişimini incelendi. Aktivenin en yüksek olduğu optimum protein miktarını belirlemek amacıyla, önceden belirlenen optimum pH ve oda sıcaklığında sabit substrat miktarına karşılık proteinin değişen miktarlarına karşılık (0.5–100 µg/mL) aktivite değişimi grafiğe geçirilerek enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein miktarı 75µg/mL olarak belirlendi (Şekil 17).



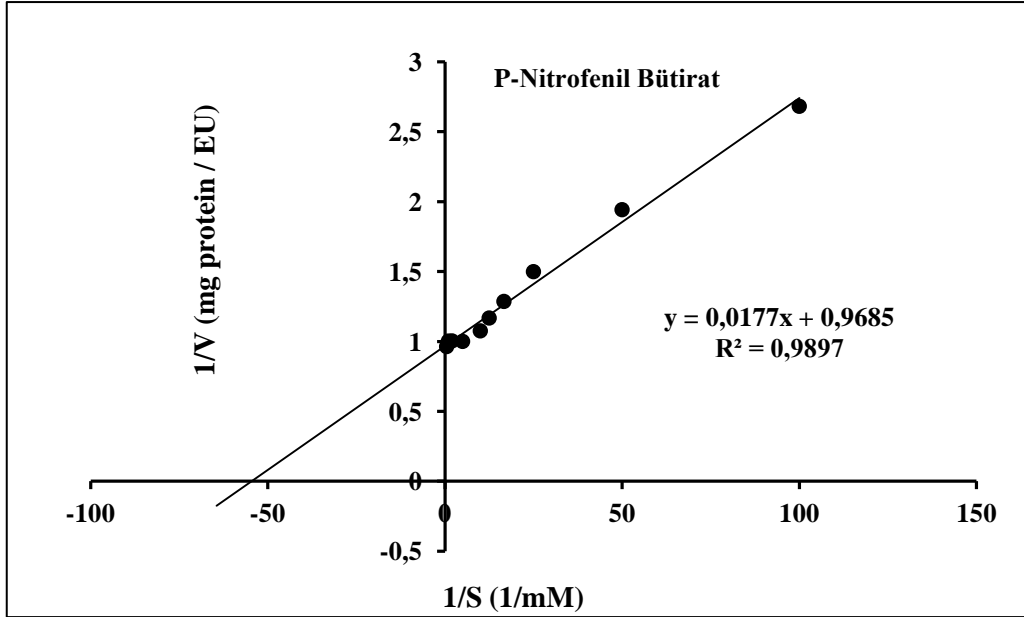
Şekil 17. Enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.

#### 3.2.5.4. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

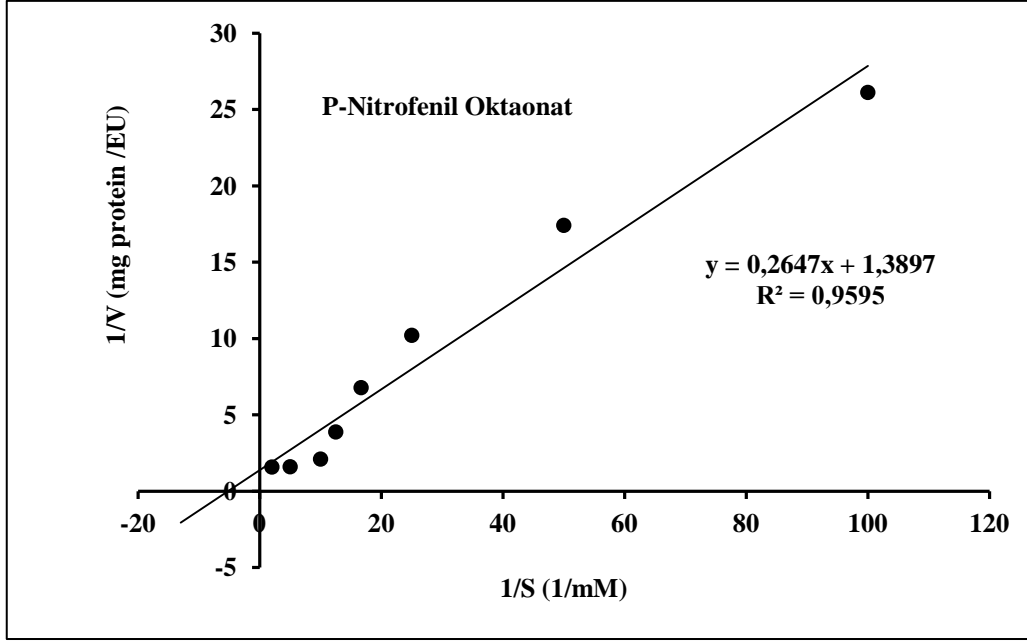
Enzimin aktivite gösterdiği en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, daha önceden belirlenen oda sıcaklığında ve optimum pH'da enzim aktivitesi farklı substratların değişen miktarlarına (0.01-1.0 mM) karşı belirlendi. Enzim konsantrasyonu ise reaksiyon karışımlarında nihai protein konsantrasyon 30 µg/mL olacak şekilde ayarlandı. Substrat olarak *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat kullanıldı. Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla her bir substratın  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.  $K_m$  değerleri *p*-nitrofenil asetat için 0.156 mM, *p*-nitrofenil bütirat için 0.018 mM, *p*-nitrofenil oktaonat için 0.190 mM ve *p*-nitrofenil laurat için 0.55 mM olarak bulundu.  $V_{maks}$  değerleri ise sırasıyla 0.52 EU  $mg^{-1}$ , 1.03 EU  $mg^{-1}$ , 0.72 EU  $mg^{-1}$  ve 0.15 EU  $mg^{-1}$  olarak belirlendi (Şekil 18–21).



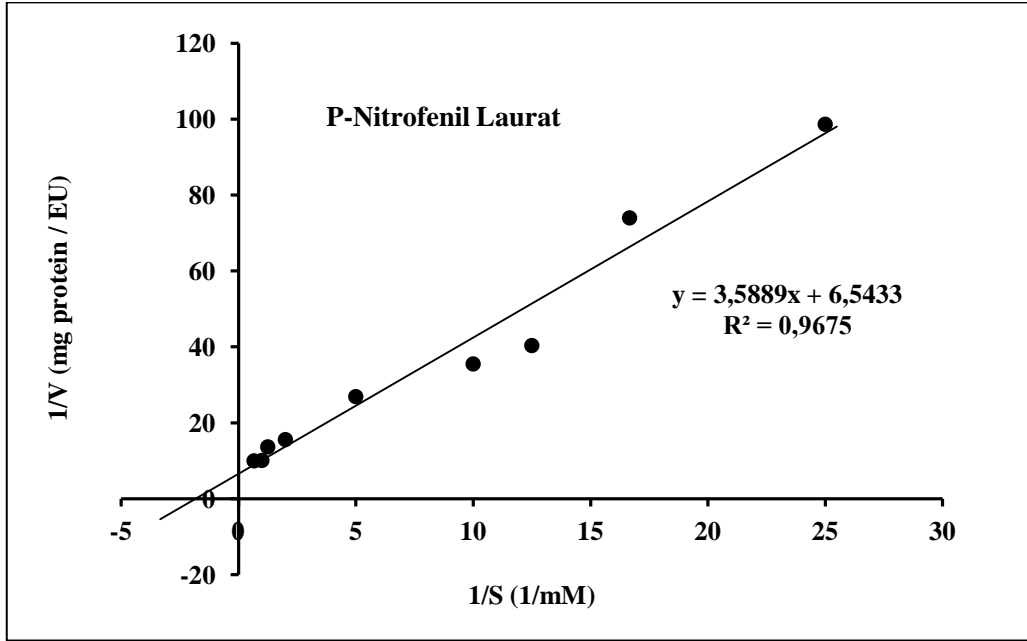
Şekil 18. *G. stearothermophilus* AH22 lipazı için *p*-nitrofenil asetat substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 19. *G. stearothermophilus* AH22 lipazı için *p*-nitrofenil bütirat substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



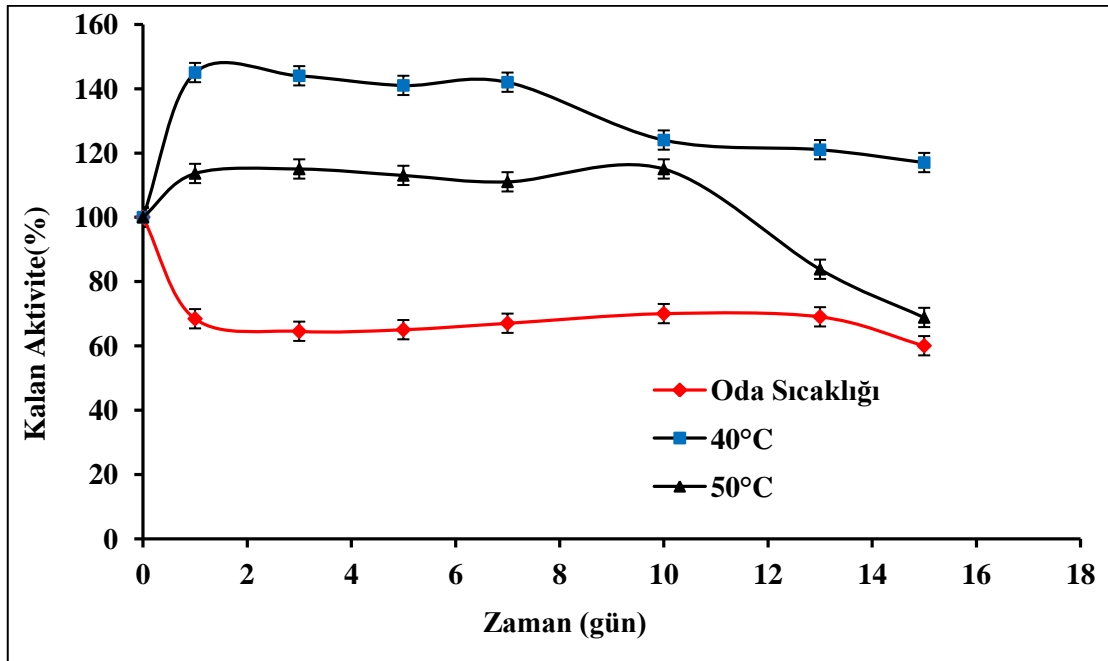
Şekil 20. *G. stearothermophilus* AH22 lipazı için *p*-nitrofenil oktaonat substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 21. *G. stearothermophilus* AH22 lipazı için *p*-nitrofenil laurat substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.

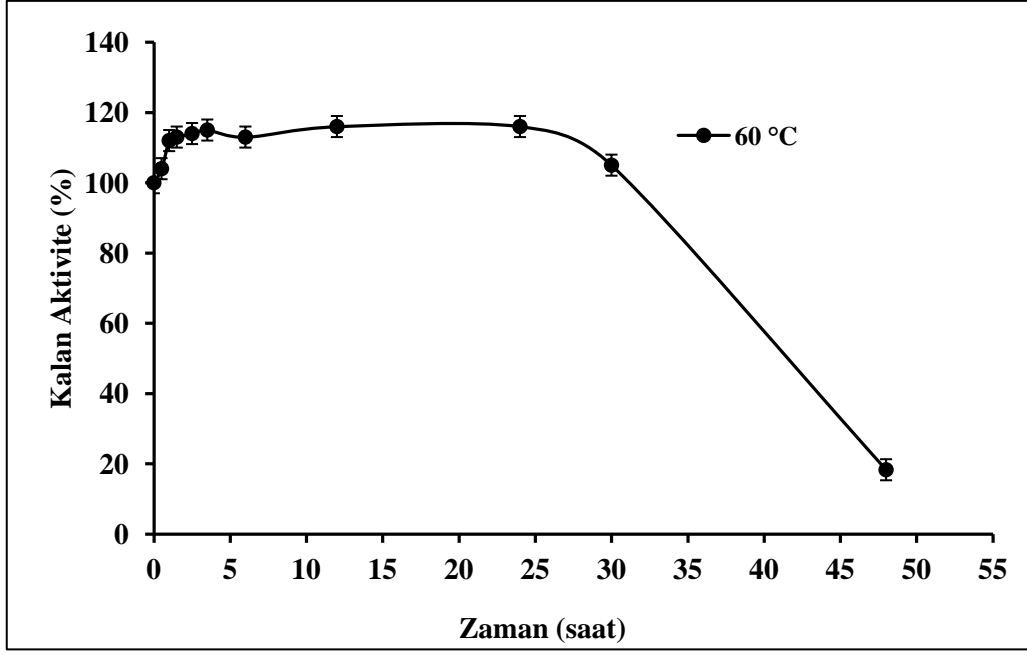
### 3.2.5.5. Isıl Kararlılığın İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla enzim; oda sıcaklığı, 40, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda enzimin aktivitesine bağlı olarak 15 dakikadan 15 güne kadar değişen sürelerde inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. *G. stearothermophilus* AH22 lipazının kalan yüzde aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı. 40 ve 50 °C’ lerde 15 gün inkübasyon sonucunda enzimin aktivitesini hemen hemen tamamını, oda sıcaklığında ise 1 günün sonunda yaklaşık % 70’ ini, 5 günün sonunda % 65’ ini ve 15 günün sonunda % 60’ ını koruduğu gözlemlendi. (Şekil 22). 60 °C’ de 48 saat sonunda aktivitesinin yaklaşık %80’ ini kaybetmiştir (Şekil 23). 90 ve 80 °C’lerde 15 dakika sonunda enzimin aktivitesinin yaklaşık % 93’ini, 70 °C’ de ise 15 dakika sonunda yaklaşık % 68’ ini kaybettiği gözlemlendi (Şekil 24).

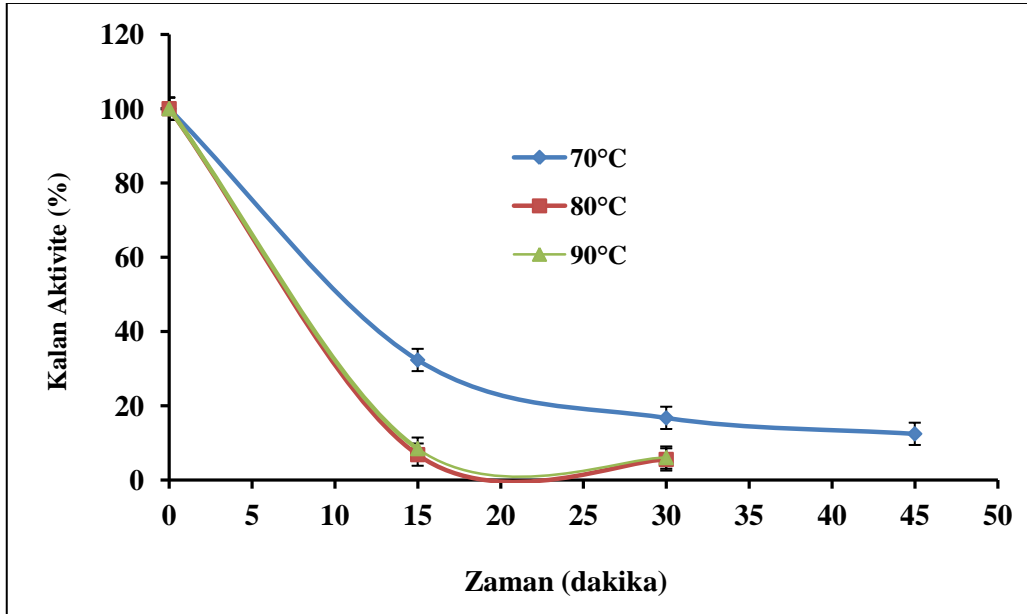


Şekil 22. *G. stearothermophilus* AH22 lipazının oda sıcaklığı, 40 ve 50 °C’ deki ısıl kararlılık eğrisi.





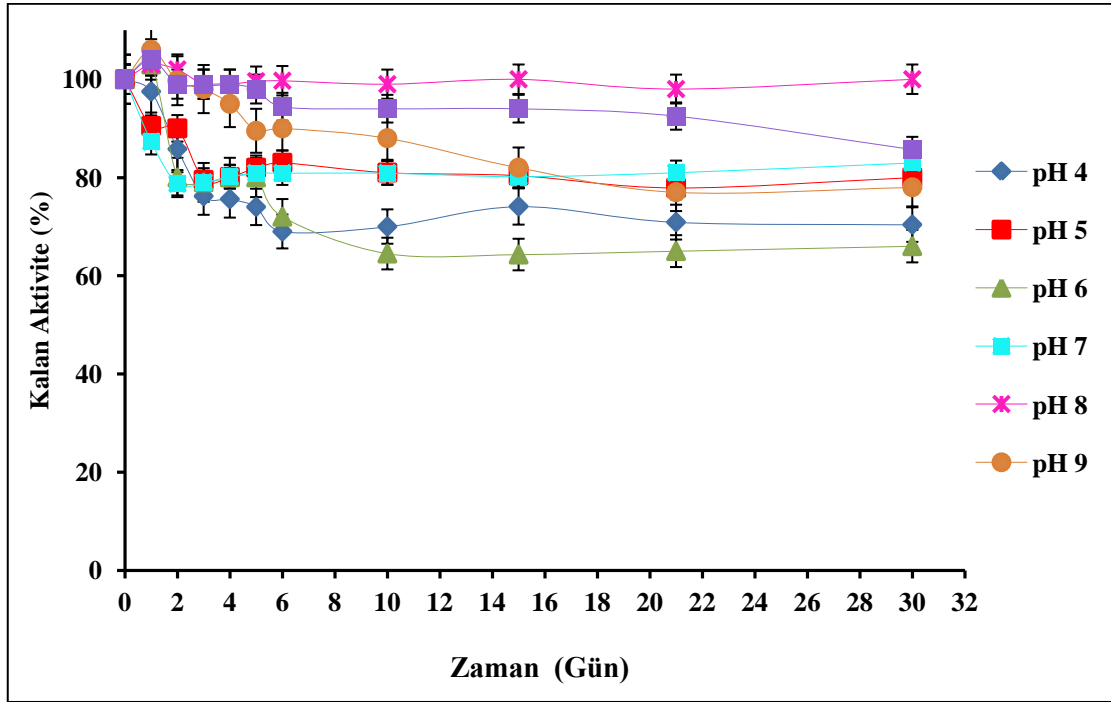
Şekil 23. *G. stearothermophilus* AH22 lipazının 60 °C'deki ısıl kararlılık eğrisi.



Şekil 24. *G. stearothermophilus* AH22 lipazının 70, 80 ve 90 °C'deki ısıl kararlılık eğrisi.

### 3.2.5.6. pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4-10 arasında enzim-tampon karışımları +4 °C’ de 30 gün boyunca inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında ve *p*-nitrofenil bütirat substratı varlığında aktivite tayinleri yapıldı. *G. stearotherophilus* AH22 lipazının geniş bir pH aralığında yüksek kararlılık gösterdiği gözlemlendi (Şekil 25). 1 günün sonunda pH 5.0 ve 7.00’ de enzimin başlangıçtaki aktivitesinin %90’ ının korunduğu, diğer bütün pH değerlerinde ise hemen hemen tamamının korunduğu gözlemlendi. 5 günün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0’ de enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %80’ inin, pH 8.0, 9.0 ve 10.0’ da ise tamamına yakınının korunduğu belirlendi. 10 günün sonunda pH 4.0, 5.0 ve 6.0’ da başlangıçtaki aktivitenin yaklaşık % 65’ i, pH 7.0’ de %80’ i, pH 8.0, 9.0 ve 10.0’ da ise tamamına yakınının korunduğu gözlemlendi.



Şekil 25. *G. stearotherophilus* AH22 lipazının +4 °C’ deki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği.

### 3.2.5.7. $\Delta H$ , $\Delta S$ ve $\Delta G$ Değerlerinin Hesaplanması

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının  $E_a$  değeri *p*-nitrofenil bütirat substratı varlığında  $129520.4 \text{ J mol}^{-1}$  olarak hesaplandı ve termodinamik verilerden de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ' ye kadar kararlı olduğu tespit edildi (Tablo 17).

**Tablo 17.** *G. stearothermophilus* AH22 lipazına ait termodinamik parametreler.

Sıcaklık ( $^\circ\text{K}$ )	$k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\Delta G^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta H^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}$ )	$\Delta S^\#$ ( $\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ )
298	$2,00 \times 10^{-7}$	295589	127043	-566
313	$2,00 \times 10^{-7}$	310595	126918	-587
323	$5,00 \times 10^{-7}$	323063	126835	-608
333	$2,00 \times 10^{-6}$	336988	126752	-631
343	$5,00 \times 10^{-4}$	362937	126669	-689
353	$2,00 \times 10^{-4}$	370914	126586	-692
363	$4,00 \times 10^{-4}$	383597	126502	-708

### 3.2.5.8. Bazı Kimyasallar, Detarjanlar, Anyonlar ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının  $0.1$ ,  $0.5$  ve  $1.0 \text{ mM}$ ' lik konsantrasyonlarında çalışıldı. İçlerinde etkili bir şekilde enzim aktivitesini  $\text{Hg}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  iyonları hariç diğer katyonların enzim aktivitesini farklı miktarlarda artırdığı gözlemlendi.  $\text{Zn}^{2+}$  iyonlarının  $0.1 \text{ mM}$ ' lik konsantrasyonunda %26.3,  $0.5 \text{ mM}$ ' lik konsantrasyonunda %37.8 oranında inhibe ettiği belirlendi.  $0.1 \text{ mM}$   $\text{Hg}^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin %56' sını korunurken  $0.5 \text{ mM}$   $\text{Hg}^{2+}$  iyonu varlığında ise enzim aktivitesinin % 27.8'sini korunmaktadır.  $\text{Mn}^{2+}$  iyonun  $0.1$  ve  $0.5 \text{ mM}$ ' lik konsantrasyonunda aktiviteyi sırasıyla % 35 ve 36 oranında artırdığı tespit edildi. EDTA'nın ise enzim aktivitesini genel olarak artırdığı belirlendi (Tablo 18).

**Tablo 18.** Bazı metal iyonlarının *G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine etkisi.

Metal iyonları	Bağıl Aktivite (%)		
	0.1 mM	0.5 mM	1 mM
Kontrol	100	100	100
Mn <sup>2+</sup>	135	136	98
Ca <sup>2+</sup>	105	119	91,5
Cu <sup>2+</sup>	158	121	125
Ba <sup>2+</sup>	112	124	153
Co <sup>2+</sup>	145	127	152
Zn <sup>2+</sup>	72,7	62,2	99
Fe <sup>2+</sup>	122	103	96,8
Ni <sup>2+</sup>	105	124	83,5
Mg <sup>2+</sup>	104,5	120,7	93,8
Hg <sup>2+</sup>	56	27,8	29,1
EDTA	105	119	106

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisini incelemek amacıyla OH<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, B<sub>4</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>, C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ve HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonlarının kullanıldı. Anyonların reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0.1, 0.5 ve 1.0 mM olacak şekilde ilave edilerek, anyon içermeyen reaksiyon karışımının aktivitesi ile kıyaslanarak % bağıl aktivite hesaplandı ve optimum şartlar altındaki bağıl aktivite Tablo 19 'de verildi. İyonların 0.1 mM' lık konsantrasyonlarının varlığındaki aktivitelere bakıldığında SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> anyonunun %26 oranında inhibe ettiği, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> iyonunun %22 oranında aktiviteyi artırdığı, Cl<sup>-</sup> iyonunu ise aktiviteyi etkilemediği gözlemlendi. 0.5 mM' lık iyon konsantrasyonunda OH<sup>-</sup> anyonunun % 23' lük, CN<sup>-</sup> ve HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonlarının % 22' lik bir inhibisyon sağladığı, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> anyonunun % 28' lik, N<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonunun %27' lik aktivite artışına neden olduğu, C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> ve NO<sub>2</sub><sup>-</sup> anyonlarının ise aktiviteyi çok az etkilediği ya da hiç etkilemediği görüldü. 1 mM N<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonunun aktivitede % 30' luk bir artış sağladığı, 1 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonlarının sırasıyla % 17 ve 15' lik bir oranda inhibe ettiği, 1 mM Cl<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ve SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> anyonlarının ise aktiviteyi çok az etkilediği veya hiç etkilemediği gözlemlendi.

**Tablo 19.** Bazı anyonların *G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine etkisi.

Anyonlar	Bağıl Aktivite (%)		
	0.1 mM	0.5 mM	1 mM
Kontrol	100	100	100
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	122	103	111
Cl <sup>-</sup>	100	100	100
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	99	101	99
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	89	82	102
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	93	113	116
N <sub>3</sub> <sup>-</sup>	85	127	130
C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	100	110	112
HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	80	78	85
WO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	83	87	97
SO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	74	128	97
B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>-2</sup>	81	96	104
OH <sup>-</sup>	116	77	88
CN <sup>-</sup>	82	78	93
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	99	98	83

İnhibitör etkisi olan bazı kimyasallar ve bazı yüzey aktif maddelerin *G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin inhibitörü olan PMSF, SH-grubu (tiyol grubu) inhibitörü olan  $\beta$ -merkaptoetanol (2ME), kateşin, katekol, propil paraben, *p*-kumarik asit, 3,4- dihidroksi hidro sinamik ve lipazın bilinen etkili inhibitörü olan orlistat, yüzey aktif madde olarak da; Triton X-114, Triton X-100, Tween 80 ve SDS kullanıldı. Kimyasal ve deterjan içermeyen reaksiyon karışımının aktivitesi ile kıyaslanarak % bağıl aktiviteler hesaplandı (Tablo 20).  $\beta$ -merkaptoetanol ( $\beta$ -ME) nihai konsantrasyonları sırasıyla 0.1, 0.5 ve 1.0 mM olacak şekilde ilave edilerek, oda sıcaklığında aktivite tayinleri yapıldı. Buna göre  $\beta$ -merkaptoetanol enzim aktivitesini genel olarak artırdığı gözlemlendi (Tablo 20).

**Tablo 20.** Bazı deterjanlar ve kimyasalların *G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine etkisi.

Bazı yüzey aktif maddeler ve kimyasallar	Konsantrasyon (mM)	Bağıl Aktivite (%)	Bazı yüzey aktif maddeler ve kimyasallar	Konsantrasyon (mM)	Bağıl Aktivite (%)
Kontrol	-	100	Kontrol	-	100
Triton X-114	2,0	67	PMSF	0,5	69,5
	10,0	47		1,0	63
	20,0	23		2,0	43
Triton X-100	1,5	85	Katekol	1,0	80
	7,5	57		5,0	62
	15,0	37		10,0	48
Tween-80	0,8	65	Kateşin	0,05	59
	4,0	45,6		0,1	31
	8,0	24,5		0,25	23,5
SDS	3,0	31	Propil paraben	0,5	51,5
	15,0	20		1,0	42
	30,0	12		2,0	29
$\beta$ -merkaptöetanol	0,1	114	<i>p</i> -Kumarik acid	0,5	64
	0,5	107		1,0	53
	1,0	106		2,0	37,5
Orlistat	0,004	68	3,4-dihydroxy hydro- cinnamic acid	1,0	80
	0,008	51		2,5	43
	0,01	45,5		5,0	23

Ayrıca inhibitör etkisi incelenen orlistat, kateşin, propil paraben, *p*-kumarik asit 3,4- dihidroksi hidro sinamik asit ve PMSF' ye ait IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.0085 mM, 0.06 mM, 0.5 mM, 1.25 mM, 1.7 mM ve 1.6 mM olarak hesaplandı (Tablo 21). Buna göre en etkin inhibisyon özelliği orlistata ait olduğu gözlemlendi.

**Tablo 21.** Lipaz üzerinde inhibitör etkisi olan bazı kimyasalların IC<sub>50</sub> Değerleri.

Kimyasal Adı	IC <sub>50</sub> Değerleri (mM)
Orlistat	0,0085
Kateşin	0,06
Propil paraben	0,5
<i>p</i> -Kumarik asit	1,25
3,4- Dihidroksi hidro sinamik asit	1,7
PMSF	1,6
Katekol	8,5
Triton X-114	8,4
Triton X-100	9,3
Tween-80	3,2
SDS	1,2

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada Erzurum ilindeki Ilıca kaplıcalarından izole edilen ve yeni bir termofilik bakteri olan *G. stearothermophilus* AH22 suşundan lipaz enzimi ısı şoku ve kromatografik yöntemler kullanılarak kısmi olarak saflaştırıldı ve enzimin biyokimyasal özellikleri ile kinetik parametreleri belirlendi.

Mikrobiyal kaynaklı lipazların saflaştırılması için farklı kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Lipazların saflaştırılmasında kullanılan önemli tekniklerden bazıları iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisidir. İyon değişim kromatografisinde proteinler, verilen pH değerindeki net yüklerine göre ayrılırlar. Matriks, proteinlerle elektrostatik çekimlerine göre ilişki kurar (Scopes, 1994). Bu kromatografik yöntem birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (Hiol vd., 1999; Brush vd., 1999). Jel filtrasyon kolon kromatografisi ise proteinleri molekül büyüklüklerine göre ayırmaktadır. *G. stearothermophilus* AH22 suşundan intraselüler 100 mL ham enzim kaynağı alınarak ön saflaştırma işlemi olarak 70 °C 'de ısı şoku uygulandı. Santrifüjden sonra elde edilen protein çözeltisi sırasıyla iyon değişim kromatografisi kolonu olarak DEAE-Selüloz, jel filtrasyon kromatografisi kolonu olarak da Sefadex G-150 ve Sefadex G-25 dolgu maddelerinin yüklendiği kolonlara tatbik edildi ve enzim bu kromatografik yöntemler kullanılarak kısmi saflaştırıldı. Ham enzim kaynağında enzimin özgül aktivitesi 0.216 EU mg<sup>-1</sup> protein, ısı muamelesi sonrası 0.28 EU mg<sup>-1</sup> protein, iyon değişim kolonu DEAE-Selüloz sonrası 1.21 EU mg<sup>-1</sup> protein, jel filtrasyon kolonları Sefadex G-150 sonrası 2.31 EU mg<sup>-1</sup> protein, 2. Sefadex G-150 sonrası 2.99 EU mg<sup>-1</sup> protein ve son olarak da Sefadex G-25 sonrası 3.99 EU mg<sup>-1</sup> protein olarak bulundu (Tablo 16). Bu sonuçlara göre enzim % 19.7 verimle 18.3 kat saflaştırıldı. *Bacillus stearothermophilus* MC 7' den lipaz enzimi ultrafiltrasyon işleminden Sefadex G-200 ve DEAE-Selüloz kolonları kullanılarak %10.2 verimle 19.25 kat saflaştırılmıştır (Kambourova vd., 2003). *Pseudomonas luteola*'dan lipaz enzimi ayırma işleminin ardından sırasıyla DEAE kolonu, aseton çöktürme ve Toyopearl HW-55F exclusion kolonu aşamaları kullanılarak %16 verimle 17 kat saflaştırılmıştır (Litthauer vd., 2002).

Uygulanan kromotografik saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen enzim elüatı elektroforetik olarak analiz edildi. Hazırlanan %10' luk doğal poliakrilamid jel elektroforezine enzim elüatının tatbik edilmesi,  $\alpha$ -naftil asetat-Fast Red substrat boyaması ve ardından da Commassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucu mevcut protein bantlarında azalma enziminin kısmi olarak saflaştırıldığını desteklemektedir (Şekil 10 B). Hazırlanan %10' luk doğal poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edilen saf enzim elüatının  $\alpha$ -naftil asetat-Fast Red substrat boyaması sonucu gözlenen kahverengi bantlar lipaz enzimi olduğunun bir işaretidir ( Şekil 10 A).

Lipazların molekül ağırlıkları 11 ile 92 kDa arasında değişen proteinlerdir ve tek polipeptid zincirinden oluşur (Kraulis, 1991; Lawson vd., 1994; Schmid ve Verger, 1998, Tablo 11). Molekül ağırlığı 11 kDa olan lipaz *Mortierella alliacea* suşundan (Jermsuntiea vd., 2011), 92 kDa lipaz enzimi ise *Pseudomonas gessardii* suşundan (Ramani vd., 2010) saflaştırılmıştır (Tablo 11). Ayrıca SDS-PAGE sonrası çizilen grafikten *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşundan kısmi olarak saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesi yaklaşık 26 kDa olarak bulundu(Şekil 9). *Aspergillus carneus*'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 27 kDa (Saxena vd., 2003), *Thermomyces lanuginosus* ve *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304' dan saflaştırılan lipaz enziminin molekül ağırlığı 33 kDa (Zheng vd., 2011; Dheeman vd., 2011b), *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 ve *Rhizopus oryzae* suşlarından saflaştırılan lipazın molekül kütlesi 32 kDa (Hiol vd., 2000; Cao vd., 2012), *Aeromonas caviae* AU04 suşundan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 39 kDa (Velu vd. , 2012), *Bacillus coagulans* BTS-3'dan saflaştırılan lipaz enziminin molekül ağırlığı 31 kDa (Kumar vd., 2005), *Mucor sp.* ve *Pseudomonas luteola*'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 42 kDa (Abbas vd., 2002; Litthauer vd., 2002), *Penicillium sp.* DS-39 (DSM 23773), *Bacillus stearothermophilus* P1 ve *Geobacillus sp.* SBS-4S'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 43 kDa (Dheeman vd., 2011a; Sinchaikul vd., 2001; Tayyab vd., 2011) *Mucor hiemalis f. Hiemalis* lipazının molekül ağırlığı 49 kDa (Hiol vd., 1999), *Staphylococcus sp.* ve *Yarrowia lipolytica*'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 38 kDa (Daoud vd., 2013; Yu vd., 2007) ve *Bacillus thermocatenulatus* suşundan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı ise 40 kDa (Rúa vd., 1997) olarak bulunmuştur (Tablo 11). *G. stearothermophilus* AH22 suşundan kısmi olarak saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesi bu sonuçlarla uyumludur.



Optimum pH değeri enzim aktivitesinin ifade edilmesinde önemli bir faktördür. Enzimin endüstriyel olarak kullanıldığı birçok alan mevcuttur. Enzimin pH'ya duyarlı olmaması ve optimum pH değeri endüstride daha kolay kullanılmasını sağlar. Bakteriyal lipazlar pH 4.8 asidik bir optimum pH'ya sahip *P. fluorescens* SIK W1 lipazı hariç alkali veya nötral pH'da aktivite gösterirler. Ancak *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *B. atrophaeus* SB-2 ve *B. licheniformis* SB-3 suşlarından elde edilen lipazlar pH 3-12 aralığında aktivite gösterir. *B. licheniformis* MTCC-10498 için maksimum lipaz üretimi pH 7.5'da gözlenmiştir (Bradoo vd., 1999; Litthauer vd., 2002; Sharma vd., 2012). *G. stearothermophilus* AH22 suşundan kısmi olarak saflaştırılan lipaz için aktivitenin pH'ya olan bağlılığı pH 4.0-12.0 aralığında *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat substratları kullanılarak yapılan aktivite tayiniyle incelendi ve inceleme sonucunda enzimin en iyi aktiviteyi *p*-nitrofenil asetat için pH 9.0' da, *p*-nitrofenil bütirat için pH 8.0-9.0'da, *p*-nitrofenil oktaonat için pH 9.0'da ve *p*-nitrofenil laurat için ise pH 10.0 ve 11.0 arasında gösterdiği gözlemlendi (Şekil 11-14). pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren bu grafiklere göre enzimin asidik pH' larda çok düşük aktivite gösterdiği hatta hiç aktivite göstermediği ve hafif alkali pH'larda *p*-nitrofenil substratlarını hidroliz etme yeteneğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte literatürde yapılan incelemelere göre *Bacillus cereus* C71'dan saflaştırılan lipaz için optimum pH değeri 9.0 olarak belirlenmiş ve enzimin pH 7.5 ile 9.5 arasında aktivitesinin % 70'inden fazlasını koruduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2007). Li vd. (2014) tarafından *Pseudomonas stutzeri* PS59 suşundan saflaştırılan lipaz için optimum pH 8.5 olarak tespit edilmiş ve enzimin pH 8.0 ve 9.0' da aktivitesinin % 90 'ını koruduğu, pH 7.0 ve 10.0' da ise aktivitesinin %50 sinden fazlasını kaybettiği rapor edilmiştir (Li vd., 2014). Yapılan diğer çalışmalara göre *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 ve *Bacillus sphaericus* MTCC 7542 lipazları için optimum pH değeri 8.0 olarak belirlenmiştir (Cao vd., 2012; Tamilarasan ve Kumar, 2012). Bu veriler doğrultusunda *G. stearothermophilus* AH22 lipazı optimum pH bakımından literatürle uyumlu olduğu söylenilebilir.

Bakteriyal lipazların genellikle optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 30-60 °C aralığındadır. *G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesinin sıcaklıkla değişimi *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat substratları kullanılarak 10-80 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde incelendi (Şekil 15-16). Aktivite; *p*-nitrofenil oktaonat substratı

için 10 °Cden 50 °C' ye kadar, *p*-nitrofenil laurat substratı için ise 10 °C' den 60 °C' ye kadar lineer bir şekilde artarak maksimum seviyeye ulaştığı gözlemlendi. *p*-nitrofenil oktaonat substratı için maksimum aktivitenin 60 ve 70 °C' de önemli bir kısmının (%75 ve %50), *p*-nitrofenil laurat substratı için ise 70 °C' de önemli bir kısmının (%71) korunduğu görüldü. 70 °C' den sonra her iki substrat için de ani bir düşüşle %20-30 seviyelerine inmiştir. *p*-nitrofenil oktaonat substratı için 30, 40,60 ve 70 °C sıcaklıklarda maksimum aktivitenin sırasıyla %66, 82, 75 ve 50'sini koruduğu görüldü. Lipaz aktivitesinin büyük bir kısmının oldukça geniş bir sıcaklık aralığında korunmuş olması, bu enzimin 30' dan 70 °C' ye kadar herhangi bir sıcaklıkta kolaylıkla kullanılabileceğini ve çeşitli endüstriyel uygulamalar açısından büyük avantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde kayıtlı farklı çalışmalarda lipazların optimum sıcaklığı *G. stearothermophilus* AH22 lipazı ile benzerlik göstermektedir. *Mortierella alliacea* lipazının optimum sıcaklığı 50 °C (Jermuntiea vd., 2011), *Pseudomonas luteola*, *Bacillus coagulans* BTS-3, *Bacillus stearothermophilus* P1 ve *Staphylococcus aureus* lipazlarının optimum sıcaklığı 55 °C (Litthauer vd., 2002; Kumar vd., 2005; Sinchaikul vd., 2001; Sarkar vd., 2012), *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Geocillus* sp. SBS-4S, *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 ve *Thermomyces lanuginosus* lipazlarının optimum sıcaklığı 60 °C (Lee vd., 2001; Tayyab vd., 2011; Dheeman vd., 2011b; Zheng vd., 2011) olduğu belirlenmiştir. Bunların dışında farklı mikroorganizmalardan saflaştırılan lipazların optimum sıcaklıkları 20 °C (Li vd., 2014; Cai vd., 2009; Liu vd., 2008; Florczak vd., 2013; Chen vd., 2007, Tablo 1.11) ile 80 °C (Chen vd., 2007; Rúa vd., 1997; Masomian vd., 2012, Tablo 11) arasında değişmektedir. Bu veriler doğrultusunda *G. stearothermophilus* AH22 lipazının termofilik olarak davrandığı söylenebilir.

*G. stearothermophilus* AH22 lipazı için aktivitenin protein konsantrasyonuna bağlılığı incelendiğinde 75 µg/mL' lik konsantrasyona kadar reaksiyon karışımındaki enzim miktarının aktiviteyi arttırdığı görüldü (Şekil 17). Daha yüksek konsantrasyon değerlerinde ise lipaz aktivitesinin enzim miktarından bağımsız olduğu ve maksimum enzim miktarına ulaşıldıktan sonra aktivitenin enzim miktarından etkilenmediği belirlendi.

*G. stearothermophilus* AH22 lipazı için en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla protein konsantrasyonu sabit tutularak değişen konsantrasyonlarda substrat içeren bir dizi reaksiyon karışımında aktivite ölçümleri yapıldı. Substrat olarak *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat kullanıldı. Bu substratlar için elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 18–21) ve  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.  $K_m$  değerleri *p*-nitrofenil asetat için 0.156 mM, *p*-nitrofenil bütirat için 0.018 mM, *p*-nitrofenil oktaonat için 0.190 mM ve *p*-nitrofenil laurat için 0.55 mM olarak bulundu.  $V_{maks}$  değerleri ise sırasıyla 0.52 EU mg<sup>-1</sup>, 1.03 EU mg<sup>-1</sup>, 0.72 EU mg<sup>-1</sup> ve 0.15 EU mg<sup>-1</sup> olarak belirlendi.  $K_m$  değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür ve ne kadar küçük olursa enzimin substrata olan ilgisinin o kadar büyük olduğunu gösterir. Bu sonuçlara göre kullanılan substratlar içerisinde en küçük  $K_m$  değeri 0.018 mM olarak *p*-nitrofenil bütirata ait olduğu için enzimin bu substrata ilgisinin daha çok olduğu söylenilebilir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde substrat olarak pNPL kullanıldığında, *Bacillus* sp.'den elde edilen lipazın  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0.5 mM ve 0.139 µM/min/mL (Nawani, vd., 2006), *Aureobasidium pullulans* HN2.3 lipazının 0.608 mM ve 0.039 mM dak<sup>-1</sup> (Liu vd., 2008), *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 lipazının 83.47 µM ve 500 EU/mg protein olarak belirlenmiştir. Substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) kullanılan çalışmalarda  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipazı için 0.099 mM ve 2.53 mmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Dheeman vd., 2011b), *Spirulina platensis* lipazı için 0.02 mM ve 38.9 µmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Saygıdeğer Demir ve Tükel, 2010), *Mucor hiemalis f. corticola* lipazı için 1.327 mM ve 91.11 µmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Ülker ve Alpay Karaoğlu, 2012), *Bacillus stearothermophilus* MC 7 lipazı için 0.33 mM ve 188 µM dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Kambourova vd., 2003), *Burkholderia multivorans* V2 lipazı için 1.56 mM ve 5.62 µmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Dandavate vd., 2009) ve *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipazı için ise 70.4 mM ve 2.24 µmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Gaur vd., 2008) olarak bildirilmiştir. Tayyab vd., (2011) substrat olarak *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA) kullanarak *Geoacillus* sp. SBS-4S lipazının  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerini sırasıyla 3.8 mM ve 2273 µmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> olarak belirlemişlerdir.

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının ısı kararlılığını incelemek amacıyla enzim; 25, 40, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda enzimin aktivitesine bağlı olarak toplam 15 güne kadar değişen sürelerde inkübe edildi. Bu sürelerin bitiminde optimum

şartlar altında aktivite tayini yapıldı. *G. stearothermophilus* AH22 lipaz kalan yüzde aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı. 40 °C’de 15 gün inkübasyon sonucunda enzimin başlangıç aktivitesinin hemen hemen tamamını; 50 °C’de 10 güne kadar tamamını, 13. günde % 83’ ünü, 15 gün sonunda ise % 69’unu koruduğu; 25 °C’ de ise 1 günün sonunda yaklaşık %70’ ini, 5 günün sonunda % 65’ ini ve 15 günün sonunda %60’ını koruduğu gözlemlendi (Şekil 22). Enzimin bu sıcaklıklardaki yüksek kararlılığı endüstriyel işlemlerde kullanımı açısından uygun bir enzim olduğunu göstermektedir. 60 °C’ de 30 saat boyunca enzim başlangıçtaki aktivitesinin hemen hemen tamamını, 48 saat sonunda ise yaklaşık %20’ini korumuştur (Şekil 23). 90 ve 80 °C’ lerde 15 dakika sonunda enzimin aktivitesinin yaklaşık % 93’ ini, 70 °C de ise 15 dakika sonunda yaklaşık % 68’ ini kaybettiği gözlemlendi (Şekil 24). Termodinamik veriler incelendiğinde enzimin 60 °C’ nin üzerinde üç boyutlu yapısının bozulmasından (denatürasyon) dolayı aktivitesinin kaybettiği düşünülmektedir (Tablo 17). *Aeromonas caviae* AU04 lipazının 40 ve 50 °C’de 3 saat inkübasyonundan sonra sırasıyla %98 ve 75 olarak aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir (Velu vd., 2012). Öte yandan *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipazı ise 50- 60 °C’ de 3 saat inkübasyondan sonra yüksek bir kararlılıkla aktivitesinin %100’ünü korumuştur (Dheeman vd., 2011b). *Spirulina platensis* ’dan saflaştırılan lipazın 25, 35, 45 ve 55 °C’ de 24 saat inkübasyondan sonraki kalan aktiviteleri sırasıyla %95, 45, 33 ve 25 olarak bildirilmiştir (Saygıdeğer Demir ve Tükel, 2010). Bu veriler doğrultusunda *G. stearothermophilus* AH22 lipazının diğer mikroorganizmalardan elde edilen lipazlara göre daha yüksek ısı kararlılığına sahip olduğu söylenilebilir.

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4.0-10.0 arasında enzim-tampon karışımları +4 °C’de 30 gün boyunca inkübe edilerek farklı zaman aralıklarında aktivite ölçümleri yapıldı. *G. stearothermophilus* AH22 lipazının geniş bir pH aralığında yüksek kararlılık gösterdiği gözlemlendi (Şekil 23). 1 günün sonunda pH 5.0 ve 7.0’ de enzimin başlangıçtaki aktivitesinin %90’nın korunduğu, diğer bütün pH değerlerinde ise hemen hemen tamamının korunduğu gözlemlendi. 5 günün sonunda pH 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0’ de enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 80’ inin, pH 8.0, 9.0 ve 10.0’ da ise tamamına yakınının korunduğu belirlendi. 10 günün sonunda pH 4.0, 5.0 ve 6.0’ da başlangıçtaki aktivitenin yaklaşık %65’ i, pH 7.0’ de %80’ i, pH 8.0, 9.0 ve 10.0’ da ise tamamına

yakınının korunduğu gözlemlendi. Enzimin geniş bir pH aralığında kararlı olması ve özellikle alkali pH'larda stabilitesini korumuş olması nedeniyle deterjan endüstrisi için önemli bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir.

Metal iyonları, proteinlerin çoğunda üç boyutlu yapıların oluşmasında ve aktif merkezde substratların katalizlerinde doğrudan veya dolaylı olarak önemli rol oynamaktadırlar. Bazı enzimler, aktiviteleri için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Bu sebeple metal iyonları proteinler karşısında farklı ligand özellikleri gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). Metal iyonları katalitik işleme farklı yollarla yardımcı olurlar; ya substrata bağlanarak reaksiyon için onun doğru yönelimini sağlarlar, ya da oksidasyon sayılarındaki dönüşümlü değişimlerle redoks reaksiyonlarına katılırlar ya da substratın negatif yükünü elektrostatik olarak kararlı hale getirirler (Uslan, 1997). *G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla,  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  metal iyonlarının klorür tuzlarının ve EDTA'nın reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0.1, 0.5 ve 1.0 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesine göre elde edilen sonuçlar kıyaslanarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı (Tablo 18).  $Hg^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonları hariç diğer katyonların enzim aktivitesini farklı miktarlarda artırdığı gözlemlendi.  $Zn^{2+}$  iyonlarının 0.1 mM 'lık konsantrasyonunda %26.3, 0.5 mM'lık konsantrasyonunda ise %37.8 oranında inhibe ettiği belirlendi. 0.1 mM  $Hg^{2+}$  iyonu varlığında enzim aktivitesinin %56' sını korurken 0.5 mM  $Hg^{2+}$  iyonu varlığında ise enzim aktivitesinin %27.8' sini korumaktadır. Benzer şekilde *B. stearothermophilus* MC 7 lipazı  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$  iyonları tarafından sırasıyla yaklaşık %90, 100, 85, 60 ve 50 oranında inhibe edilirken ve  $Ca^{2+}$  iyonlarının varlığında ise %10 oranında aktive edilmiştir (Kambourova vd., 2003). *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 lipazının  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonlarının 1 mM'lık varlığında aktivitesinin %78.1 ve 41.5' ini, 10 mM'lık varlığında ise %23.7 ve 5.9' unu koruduğu,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Li^{+}$  iyonlarının varlığında aktivitenin değiştirmedığı yada çok az miktarda azaldığı,  $Ca^{2+}$  iyonlarının varlığında ise 1 mM için %21.3, 10 mM için %17.8 oranında arttığı rapor edilmiştir (Cao vd., 2012). Lipaz- metal arasındaki ilişki ile ilgili Lee ve Rhee (1993) tarafından

iki mekanizma önerilmiştir. Buna göre birincisi diğer enzimlerde olduğu gibi katalitik bölgenin direk inhibisyonu, ikincisi ise lipazlar için özel olan metallerle iyonize yağ asitleri arasında kompleks oluşumu için arayüzeyde bunların çözünürlüğünün ve davranışlarının değişmesidir.

*G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine bazı anyonların etkisini incelemek amacıyla  $\text{OH}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$  ve  $\text{HSO}_3^-$  anyonlarının sodyum tuzlarının reaksiyon karışımlarında nihai konsantrasyonları 0.1, 0.5 ve 1.0 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Anyon içermeyen karışımın aktivitesi % 100 kabul edilerek anyon varlığındaki aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplandı (Tablo 19).  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  iyonlarının varlığında enzim aktivitesinde bir değişiklik olmadığı,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  ve  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  anyonlarının ise aktiviteyi az bir miktarda artırdığı gözlemlendi.  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$  ve  $\text{SO}_3^-$  iyonlarının ise benzer şekilde enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlendi.

İnhibe edici bazı kimyasal maddeler ve bazı deterjanların *G. stearothermophilus* AH22 lipazının aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin inhibitörü olan PMSF, SH-grubu (tiyol grubu) inhibitörü olan  $\beta$ -merkaptöetanol (2ME), kateşin, katekol, propil paraben, *p*-kumarik asit, 3,4- dihidroksi hidro sinamik ve lipazın bilinen etkili inhibitörü olan orlistat, deterjan olarak da; Triton X-114, Triton X-100, Tween 80 ve SDS kullanıldı. Kimyasal ve deterjan içermeyen reaksiyon karışımın aktivitesi % 100 kabul edilerek kimyasal ve deterjan varlığındaki aktiviteler ile kıyaslanarak % bağıl aktiviteler hesaplandı (Tablo 20). Ayrıca inhibitör etkisi incelenen orlistat, kateşin, propil paraben, *p*-kumarik asit ve 3,4- dihidroksi hidro sinamik asite ait  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplanarak Tablo 21’ de verildi. Buna göre en etkin inhibisyon özelliği orlistata ait olduğu gözlemlendi.  $\beta$ -merkaptöetanol enzim aktivitesini yaklaşık %10 civarında artırmıştır. Bunun aksine *Pseudomonas aeruginosa* PseA, *Pseudomonas Gessardii* ve *Bacillus* sp. lipazlarının  $\beta$ -merkaptöetanol tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir (Gaur vd., 2008; Ramani vd., 2010; Nawani, vd., 2006). Serin inhibitörü olan PMSF ‘ nin 0.5, 1.0 ve 2.0 mM varlığında enzim aktivitesinin sırasıyla % 69.5, 63 ve 43 oranında korunduğu gözlemlendi. Bu da büyük bir oranda inhibe ettiğini göstermektedir. 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 aktivasyonu ile ilgili olarak aktif merkezlerini örten bir kapak yapısına sahiptirler. Bu nedenle bazı lipazlar PMSF tarafından inhibe olmaz veya çok az inhibisyon görülür (Snellman vd., 2002; Li ve Zhang, 2005; Gaur vd., 2008). Benzer şekilde *Aneurinibacillus thermoaerophilus* HZ'dan saflaştırılan lipaz 1.0 ve 5.0 mM PMSF varlığında sırasıyla % 64.9 ve 41.4 oranında aktivitesini koruduğu rapor edilmiştir (Masomian vd., 2013). Yine aynı şekilde *Aureobasidium pullulans* HN2.3 lipazı 1.0 ve 5.0 mM PMSF varlığında sırasıyla %73.1 ve 67.2 oranında aktivitesini korumuştur (Liu vd., 2008). Öte yandan *G. stearothersophilus* AH22 lipazı aktivitesi üzerinde kateşin, katekol, propil paraben, *p*-kumarik asit, 3,4- dihidroksi hidrosinamik asit ve orlistatin inhibisyon etkisine bakıldığında ise her bir bileşenin enzimi farklı oranlarda inhibe ettiği görülmektedir (Tablo 20). Lipazın bilinen inhibitörü olan orlistatin 0.004, 0.008 ve 0.012 mM'lık konsantrasyonlarında enzim sırasıyla %32, 49 ve 54.5 oranında inhibe edilirken, bir fenolik bileşik olan kateşin 0.05, 0.1 ve 0.25 mM olarak bulunduğu ortamda ise *G. stearothersophilus* AH22 lipazının aktivitesi sırasıyla % 41, 69 ve 76.5 gibi büyük bir oranda inhibe edildi. Diğer fenolik bileşiklerin etkisi incelendiğinde ise katekolun 1.0, 5.0 ve 10.0 mM olarak bulunduğu reaksiyon karışımında *G. stearothersophilus* AH22 lipazının aktivitesi sırasıyla % 80, 62 ve 48 oranında korunurken, Propil parabenin 0.5, 1.0 ve 2.0 mM varlığında sırasıyla % 48.5, 58 ve 71 oranında, *p*-kumarik asidin 0.5, 1.0 ve 2.0 mM varlığında % 36, 47 ve 62.5 oranında inhibe edilmektedir. 3,4- dihidroksi hidrosinamik asidin 1.0, 2.5 ve 5.0 mM olarak bulunduğu ise enzim aktivitesi sırasıyla %80, 43 ve 23 oranında korunmaktadır. Besin maddelerinin büyük bir kısmı önemli oranda lipid içermekte olup, yağlı bir diette 50-120 g lipid bulunur ve bunun %95 inden fazlası uzun zincirli yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bunların sindirimi de lipazlar aracılığıyla olmaktadır. Bağırsak lümeninde trigliserid molekülleri gastrik ve pankreatik lipazlar tarafından hidrolize edilerek, iki molekül yağ asidi ve bir molekül monogliserit açığa çıkarılır. Trigliserit hidroliz ürünleri ince bağırsak tarafından emilir, şilomikronlar içinde lenf sistemine salgılanırlar daha sonra ise emilen monomerler epitel hücrelerinde başka enzimler tarafından tekrar trigliseride dönüştürülür. Sonuç olarak lipazlar kısmen inhibe edildiğinde monoaçilgliserollerin ve serbest yağ asitlerinin oluşumu önlediğinden diyeteki yağın

emilimi indirekt olarak bloke edilmiş olur. Bu durum da özellikle obezite savaşmak için tedavi amaçlı olarak lipaz inhibitörlerinin önemini ortaya koymaktadır.

Triton X-114, Triton X-100, Tween 80 ve SDS deterjanlarının varlığında *G. stearothermophilus* AH22 lipazının genel olarak büyük oranda inhibe olduğu görülmektedir (Tablo 20). 2.0 mM'lık Triton X-114 varlığında aktivite %67 korunurken, 1.5 mM Triton X-100' de % 85, 3 mM SDS'de ise bu oran %31'e kadar düşmektedir. Bu deterjanların farklı oranda varlığındaki aktivitelere bakıldığında 10 mM'lık Triton X-114' de % 47, 7.5 mM'lık Triton X-100' de %57, 4 mM'lık Tween 80'de %45.6, 30 mM'lık SDS'de ise %20 oranında aktivitenin korunduğu görülmektedir. 20 mM Triton X-114, 15 mM Triton X-100, 8 mM Tween 80 ve 30 mM SDS varlığında ise enzimin aktivitesinin sırasıyla %77, 67, 75.5 ve 88' ini kaybettiği görülmektedir. Bu veriler doğrultusunda; bu deterjanların IC<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında 1.2 mM gibi küçük bir değerle enzim aktivitesi üzerine en yüksek inhibisyonu SDS'nin gösterdiği gözlemlendi (Tablo 21). Benzer şekilde literatür verilerine bakıldığında *Staphylococcus aureus* lipazının SDS (1 mM' da % 23.44 10 mM' da %72.43 inhibisyon) Triton X -100 (1 mM' da %24.52, 10 mM 'da % 29 inhibisyon) ve Tween 80 (1 mM' da %19.21, 10 mM' da %22.05 inhibisyon) ile, *Pseudomonas luteola* lipazının SDS (% 0.01' de % 15, % 0.5' de % 35 ve % 5' de %100 inhibisyon), Triton X -100 (% 0.01' de % 15, % 0.5' de % 17 ve % 5' de % 27 inhibisyon) ve Tween 80 (% 0.01' de % 13, % 0.5' de 20 ve % 5' de % 61 inhibisyon) ile, *Pseudomonas* sp. lipazının Tween 20 (%0.01' de %83 inhibisyon ), Tween 80 (%0.01' de % 95 inhibisyon), SDS (% 0.01' de % 74 inhibisyon) ve Sodyum dodesil benzene sülfonat (%0.01' de % 78 inhibisyon) ile, *Geococcus* sp. SBS-4S lipazının ise Tween 20 (% 55 inhibisyon), SDS (% 95 inhibisyon), Tween 80 (% 58 inhibisyon), ve Triton-X 100 (% 65 inhibisyon) ile inhibe edildiği rapor edilmiştir (Sarkar vd., 2012; Litthauer vd., 2002; Gao vd., 2000; Tayyab vd., 2011). Bu iyonik deterjanların enzimin üç boyutlu yapısını koruyan kuvvetlerle etkileşime girerek enzimi denatüre ettiği ve bu nedenle enzimin kararlılığını koruyamadığı düşünülmektedir. Diğer yandan bu deterjanların daha yüksek konsantrasyonları varlığında 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. Son olarak da bu maddeler için, inhibisyon etkisinin bir



ölçütü olan IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı ve orlistat, kateşin, propil paraben, *p*-kumarik asit ve 3,4- dihidroksi hidro sinamik asite ait IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.0085 mM, 0.06 mM, 0.5 mM, 1.25 mM ve 1.7 mM olarak belirlendi (Tablo 21).

Sonuç olarak; *G. stearothermophilus* AH22 suşundan lipaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış, çeşitli substrat varlığında optimum pH ve sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığı, metal iyonlar, anyonlar, çeşitli deterjanlar ve bazı kimyasalların etkisi, kinetik bazı parametreler açısından incelendi ve çeşitli organizmalardaki lipazlarla oldukça benzer biyokimyasal özellikler gösterdiği belirlendi. Ayrıca AH22 lipazının ısıl, pH ve metal kararlılıkları göz önüne alındığında, lipaz enziminin kullanıldığı birçok endüstri alanında bu enzimin kullanılma potansiyeline sahip olduğu düşünülebilir.

## 5. ÖNERİLER

Bu çalışmada yeni bir termofilik bakteri olan *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşundan lipaz enzimi kısmi olarak saflaştırıldı ve biyokimyasal özellikleri karakterize edildi. Kağıt, deterjan ve tekstil gibi bir çok endüstrinin ihtiyaç duyduğu önemli enzimlerden biri olan lipaz üzerine birçok araştırma yapılmakta ve özellikle ısı kararlılığı yüksek olan ekstraselüler ve intraselüler lipazların üretimi için yeni mikrobiyal kaynakların ortaya çıkarılmasına önem verilmektedir. Endüstrinin yeni üretilen lipazlardan en büyük beklentisi kolay saflaştırılabilmesi, yüksek ısı kararlılık göstermeleri ve pH'dan aktivitelerinin etkilenmemeleridir.

Kısmi olarak saflaştırılan *G. stearothermophilus* AH22 lipazının deterjan, kağıt, ilaç ve gıda endüstrileri gibi endüstrinin birçok alanında kullanılabileceğini düşünülmektedir. Bu amaçla, daha sonraki dönemlerde bu enzimin endüstriyel uygulanmasına yönelik araştırmalar yapılabilir. 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. Son zamanlarda enzim üretimini daha verimli hale getirebilmek için yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlardan biri rekombinant DNA teknolojisidir. Enzimin endüstriyel boyutta daha fazla üretilmesi için, enzimi kodlayan gen bölgesi tespit edilip, prokaryot bir organizmaya klonlanabilir. Bu şekilde enzimin bol miktarda üretilmesi sağlanabilir. Bölge spesifik mutasyonlarla, çalışmada saflaştırılan enzimin optimum pH değeri 7' den daha aşağıya düşürülebilir ve optimum sıcaklık değeri ve ısı kararlılığı yükseltilebilir.

Pekçok endüstriyel, analitik ve klinik süreçte, enzimler substrat çözeltisi ile karıştırılırlar ve ürüne dönüştürüldükten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Bu nedenle enzimin immobilize edilerek defalarca kullanımı endüstriyel işlemlerdeki maliyeti azaltacaktır. Böylelikle, saflaştırılan enzimin immobilizasyon sonrası, enzimin kararlılığı da artacağı için ileri derecede karakterize edilebilir ve kararlılığı artırılabilir. Bu sayede enzimin endüstriyel açıdan kullanımı kolaylaştırılabilir.

Enzimlerin karakterizasyonunda inhibitör çalışmaları da büyük önem arz etmektedir. Lipazlarda inhibisyon çalışmaları obezitenin önlenmesi çalışmalarında kullanıldığı bilinmektedir. Bilinen inhibitörlerin ve bu çalışmada kullanılan bileşiklerin haricinde var olan ya da yeni sentezlenmiş bileşiklerin de enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenebilir.

Ayrıca, enzimin elektroforezde saptanan bantları kesilerek, elde edilecek saf lipazın amino asit sekanslarının çıkarılması ve üç boyutlu yapısının aydınlatılabilir. Enzimin izoelektrik noktasının belirlenmesi amacıyla izoelektrik odaklama elektroforezi yapılabilir.

## KAYNAKLAR

- Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V. and Comeau, L., 2002.** Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 968–975. PII: S0141-0229(02)00190-4.
- Adams, M.W.W., Perler, F.B. and Kelly, R.M., 1995.** Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. *Biotechnology*, 13, 662–668.
- Adiguzel A., Ozkan H., Baris O., Inan K., Gulluce M., Sahin F., 2009.** Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiology Methods*, 79, 321–328.
- Aguilar, A., 1996.** Extremophile Research in the European Union: from Fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*, 18, 89-92.
- Aires-Barros, M.R. and Cabral, J.M.S., 1991.** Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 1302– 1307.
- Annenkov, G.A., Klepikov, N.N., Martynova, L.P. and Puzanov, V.A., 2004.** Wide range of the use of natural lipases and esterases to inhibit *Mycobacterium tuberculosis*. *Probl Tuberk Bolezn Legk*, 6, 52-56.
- Basheer, S. M., Chellappan, S., Beena, P.S., Sukumaran, R.K., Elyas, K.K. and Chandrasekaran, M., 2011.** Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnology*, 28,6, 627-638. DOI:10.1016/j.nbt.2011.04.007.
- Becker, P., Reesh, I.A., Markossian, S., Antranikian, G. and Markl, H., 1997.** Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 184-190.
- Björkling, F., Godtfredsen, S. E. and Kirk, O., 1991.** The future impact of industrial lipases. *Trends in Biotechnology*, 9, 360-363.
- Bock, W. C., Katz, A.G., Markham, G.D. and Glusker, J. P., 1999.** Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions. *Journal of American Chemical Society*, 121, 7360-7372.
- Boominathan, R., Mishra, P. and Chand, S., 1995.** Isolation of lipase from the culture filtrate of *Humicola lanuginosa*. *Bioseparation*, 5, 235– 239.
- Bornscheuer, U.T. and Kazlauskas, R.J.** *Hydrolases in organic synthesis regio and stereoselective biotransformations.* Wiley-VCH, 1999 Weinheim.
- Bradoo, S., Saxena, R.K. and Gupta, R., 1999.** Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB1 in aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, 35, 57– 62.

- Brock, T. D., 1985.** Life at high temperatures. *Science*, 230, 132-138.
- Brockman, H.W., Mornsen, W.E. and Tsuijita, T., 1988.** The biology, biochemistry and technology of lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 891-896.
- Brush, T.S., Chapman, R., Kurzman, R. and Williams, D.P., 1999.** Purification and Characterization of Extracellular Lipases from *Ophiostoma piliferum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7, 2131-2138. PII: S0968-0896(99)00142-X.
- Buchon, L., Laurent, P., Gounot, A.M. and Guespin, M.J.F., 2000.** Temperature dependence of extracellular enzyme production by psychotrophic and psychrophilic bacteria. *Biotechnology Letters*, 22, 1577-1581.
- Cai, Y., Wang, L., Liao, X., Ding, Y. and Sun, J., 2009.** Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. *Process Biochemistry*, 44, 786-790. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.03.011.
- Cao, Y., Zhuang, Y., Yao, C., Wu, B. and He, B., 2012.** Purification and characterization of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 and its application for efficient resolution of (R, S)-1-phenylethanol. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 55- 60. DOI: 10.1016/j.bej.2012.03.004.
- Castro, M.J.M. and Cabral, J.M.S., 1988.** Reversed micelles in biotechnological process. *Biotechnology Advances*, 6, 151- 167.
- Chahinian, H., Vanot, G., Ibrik, A., Rugani, N., Sarda, L. and Comeau, L.C., 2000.** Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 215- 222.
- Chartrain, M., Katz, L., Marcin, C., Thein, M., Smith, S., Fisher, E., Goklen, K., Salmon, P., Brix, T., Price, K. and Greasham, R., 1993.** Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme Microbial Technology*, 15, 575-580.
- Chattopadhyay, M., Banik, A.K. and Raychaudhuri, S., 1999.** Production and purification of lipase by a mutant strain of *Rhizopus arrhizus*. *Folia Microbiology*, 44, 37- 40.
- Chen, L., Coolbear, T. and Daniel, R.M., 2004.** Characterization of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal*, 14, 495-504.
- Chen, S., Qian, L. and Shi, B., 2007.** Purification and properties of enantio selective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochemistry*, 42, 988-994. DOI:10.1016/j.procbio.2007.03.010
- Chowdary, G.V., Ramesh, M.N., and Prapulla, S.G., 2001.** Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis. *Process Biochemistry*, 36, 331-9.

- Commenil, P., Belingheri, L., Sancholle, M. and Dehorter, B., 1995.** Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids*, 30, 356–357.
- Copeland, R.A., 2000.** Protein–Ligand Binding Equilibria, in *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. John Wiley & Sons, Inc., Publication, Second edition, ISBN: 0-471-35929-7, 390 p, New York, USA, 76-108
- Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H. and Madamwar, D., 2009.** Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource Technology*, 100, 3374–3381. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.011.
- Daoud, I., Kamoun, J., Ali, M.B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., Gargouri, Y., Ali, Y.B. and Aloulou, A., 2013.** Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 232– 237. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2013.03.018.
- Davidson, W.S., 1998.** A novel alkaline lipase from *Aspergillus carneus*: production, purification, characterization and potential industrial applications. Doktota tezi, University of Delhi, Delhi, India.
- Dharmsthiti, S. and Ammaranond, P., 1996.** Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 26, 111 –116.
- Dharmsthiti, S. and Luchai, S., 1999.** Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiology Letters*, 179, 241-246.
- Dheeman, D.S., Henehan, G.T.M. and Frias, J.M., 2011b.** Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. *Bioresource Technology*, 102, 3373–3379. DOI:10.1016/j.biortech.2010.11.074.
- Dheeman, S.D., Antony-Babu, S., Frías, J.M. and Henehan, G.T.M., 2011a.** Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72, 256– 262. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.06.013.
- Di Tusa, C.A., Christensen, T., McCall, K.A., Fierke, C.A. and Toone, E.J., 2001.** Thermodynamics of Metal Ion Binding. 1.Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase. *Biochemistry*, 40, 5338-5344.
- Dong, H., Gao, S., Han, S. and Cao, S., 1999.** Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in nonaqueous media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30, 251–256.

- Ducret, A., Trani, M. and Lortie, R., 1998.** Lipase catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 212-216.
- Dunhaupt, A., Lang, S. and Wagner, F., 1991.** Properties and partial purification of *Pseudomonas cepacia* lipase. In: Alberghina, L., Schmid, R.D., Verger, R. (Eds.), *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. GBF Monographs. VCH, Weinheim, 389–392.
- El Khattabi, .M, Van Gelders, P. and Bitter, W., 2003.** Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(5-6), 329-338.
- Estell, D.A., 1993.** Engineering enzymes for improved performance in industrial applications. *Journal of Biotechnology*, 28, 25-30.
- Everly, C. and Alberto, J., 2000.** Stressors, stress and survival: overview. *Frontier in Bioscience*, 5, 780–786.
- Fakhreddine, L., Kademi, A., Abdelkader, N.A. and Baratti, J.C., 1998.** Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strains. *Biotechnology Letters*, 20 (9), 879-883.
- Ferrer, M., Plon, F.J., Nuero, O.M., Reyes, F., Ballesteros, A., 2000.** Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75, 569–576.
- Florczyk, T., Daroch, M., Wilkinson, M.C., Bialkowska, A., Bates, A.D., Turkiewicz, M., and Iwanejko L.A., 2013.** Purification, characterisation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of LipG7 an enantioselective, cold-adapted lipase from the Antarctic filamentous fungus *Geomyces* sp. P7 with unusual thermostability characteristics. *Enzyme and Microbial Technology*, 53, 18– 24. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2013.03.021.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B. 2000.** What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochemie.*, 82, 1033-1041.
- Fredrich, A. and Antrakian, G., 1996.** Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2875–2882.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H., 2001.** Biodiesel fuel production by transformation of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (5), 405-416.
- Gandhi, N., Sawant, S. and Joshi, J., 1995.** Studies on the lipozyme catalyzed synthesis of butyl laurate. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 1-12.
- Gao, X.G., Cao, S.G. and Zhang, K.C., 2000.** Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas*

- strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 74–82. PII: S0141-0229(00)00191-5.
- Gargouri, Y., Moreau, H. and Verger, R., 1989.** Gastric lipases: biochemical and physiological studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1044, 20-25.
- Gaur, R., Gupta, A. and Khare, S.K., 2008.** Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*, 43, 1040–1046. DOI:10.1016/j.procbio.2008.05.007.
- Gerritse, G., Hommes, R.W. and Quax, W.J., 1998.** Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2644-2651.
- Ghanem, E.H., Al-Sayed, H.A., Saleh, K.M., 2000.** An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 459– 464.
- Gilbert, E.J., Cornish, A., Jones, C.W., 1991.** Purification and properties of extracellular lipases from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology*, 137, 223–229.
- Gotor, V., 1992.** Enzymatic aminolysis, hydrazinolysis and oximolysis reactions. *Microbial Reagents in Organic Synthesis*, Nato, ASI series, 381, 199-208.
- Gotor, V., 2002.** Lipases and (R) –oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. *Journal of Biotechnology*, 96, 35-42.
- Gotor, V., Brieva, R., Gonzalez, C. and Rebolledo, F., 1991.** Enzymatic aminolysis and transamidation reactions. *Tetrahedron*, 47, 9207-9214.
- Gotz, F., 1991.** Staphylococcal lipases and phospholipases. In: Alberghina, L., Schmid, R.D., Verger, R. (Eds.), *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. GBF Monographs, VCH, Weinheim, 285–292.
- Goyal, N., Gupta, J.K. and Soni, S.K., 2005.** A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus sp. I-3* and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 7, 723-734.
- Guagliardi, A., Martino, M., Iaccarino, I., de Rosa, M., Rossi, M. and Bartolucci, S., 1996.** Purification and Characterization of the Alcohol Dehydrogenase from a Novel Strain of *Bacillus steraothermophilus* Growing at 70 °C. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28, 239-246.
- Gupta, N., Mehra, G. and Gupta, R., 2004.** A glyceol-inducible thermostable lipase from *Bacillus sp.*, medium optimization by a Plackett –Burman design and by response surface methodology. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 361-368.
- Haas, M.J., Cichowicz, D.J. and Bailey, D.G., 1992.** Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. *Lipids*, 27, 571– 576.



- Haki, G.D. and Reakshit, S.K., 2003.** Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89, 17-34.
- Handelsman, T. and Shoham, Y., 1994.** Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. *The journal of the General and Applied Microbiology*, 40, 435-443.
- Hasan, F., Shah, A.A. and Hameed, A., 2006.** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.
- Hassing, G.S., 1971.** Partial purification and some properties of a lipase from *Corynebacterium acnes*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 242, 381– 394.
- Higaki, S., Kitagawa, T., Kagoura, M., Morohashi, M. and Yamagishi, T., 2000.** Correlation between *Propioni bacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. *Journal of Dermatology*, 27, 519–522.
- Hilal, N., Kochkodan, V., Nigmatullin, R., Goncharuk, V. and Al-Khatib, L., 2006.** Lipase immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: Comparison of various approaches to membrane preparation. *Journal of Membrane Science*, 268, 198-207.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Druet, D. and Comeau, L., 1999.** Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 80–87. PII: S0141-0229(99)00009-5.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L. and 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. PII: S0141-0229(99)00173-8.
- Hong, M.C. and Chang, M.C., 1998.** Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1. *Biotechnology Letter*, 20, 1027– 1029.
- Horiuti, Y. and Imamura, S., 1977.** Purification of lipase from *Chromobacterium viscosum* by chromatography on palmitoyl cellulose. *Journal of Biochemistry*, 81, 1639–1649.
- Hou, C.T. and Johnston, T.M., 1992.** Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service culture collection. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 69, 1088-1079.
- Houde, A., Kademi, A. and Leblanc, D., 2003.** Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 155-170.
- Hsu, A.F., Jones, K., Foglia, T.A. and Marmer, W.N., 2002.** Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 36, 181-186.

- Huang, F.C., Ju, Y.H. and Huang, C.W., 1997.** Enrichment of  $\lambda$ -linolenic acid from borage oil via lipase-catalyzed reaction. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 74, 977-981.
- Huge-Jensen, B., Galluzzo, D.R. and Jensen, R.G., 1987.** Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. *Lipids*, 22, 559-565.
- Imamura, S. and Kitaura, S., 2000.** Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. *Journal of Biochemistry*, 127, 419-425.
- Ingham, E., Holland, K.T., Gowland, G. and Cunliffe, W.J., 1981.** Partial purification and characterization of lipase (EC 3.1.1.3) from *Propionibacterium acnes*. *Journal of General Microbiology*, 124, 393-401.
- Isobe, K. And Nokihara, K., 1991.** Physiological properties of mono and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii*. In: Alberghina, L., Schmid, R.D., Verger, R. (Eds.), *Lipases: Structure Mechanism and Genetic Engineering*. GBF Monographs. VCH, Weinheim, 345-348.
- Isobe, K., Akiba, T. and Yamaguchi, S., 1988.** Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 41-47.
- Isobe, M. and Sugiura, M., 1977.** Purification of microbial lipases by glass beads coated with hydrophobic materials. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 1987-1991.
- Iwai, M. and Tsujisaka, Y., 1984.** Fungal lipase. In: *Lipases*. (eds.) Borgstrom, B., and Brockman, H.L., Elsevier Science Publisher. Amsterdam, pp, 443-469.
- Jacobsen, T. and Poulsen, O.M., 1992.** Separation and characterization of 61- and 57-kDa lipases from *Geotrichum candidum* ATCC 66592. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 75-80.
- Jacobsen, T., Olsen, J. and Allermann, K., 1989.** Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microbial Technology*, 11, 90-95.
- Jaeger, K.E. and Reetz, T.M., 1998.** Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trend in Biotechnology*, 16, 396-403.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T., 1999.** Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review Microbiology*, 53, 315-351.
- Jermuntiea, W., Aki, T., Toyoura, R., Iwashita, K., Kawamoto, S. and Ono, K., 2011.** Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. *New Biotechnology*, 28, 2, 158-164. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.09.007.

- Ji, Q., Xiao, S., He, B. and Liu, X., 2010.** Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66, 264–269. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.06.001.
- Jinwal, U.K., Roy, U, Chowdhury, A.R., Bhaduri, A.P., and Roy, P K., 2003.** Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11, 1041–1046. PII: S0968-0896(02)00516-3.
- Jose, J., Kurup, G.M., 1999.** Purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus pumilus*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 1213–1217.
- Joseph, B., Shrivastava, N. and Ramteke, P.W., 2012.** Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: Isolation, partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10, 137–144. DOI: 10.1016/j.jgeb.2012.02.001.
- Joshi, C. and Khare, S.K., 2013.** Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled *Jatropha* seed cake, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 32-37. DOI: 10.1016/j.bcab.2012.08.006.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R. and 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. DOI: 10.1016/S1381-1177(03)00045-6.
- Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T. and Lefuji, H., 2000.** Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, 36, 317-324.
- Kazlauskas, R.J. and Bornscheuer, U.T., 1998.** Biotransformations with Lipases. In: *Biotechnology*. (eds.) Rehm, H. J., Pihler, G., Stadler, A., and Kelly, P. J. W., VCH. New York, 8, 37-192.
- Kim, H.K., Sung, M.H., Kim, H.K. and Oh, T.K., 1994.** Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. Strain 398. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58 (5), 961-962.
- Kim, J.W., Shim, Y.S. and Yoon, S.S., 1997.** Isolation and purification of a lipase from *Pseudomonas* sp. Y0103 isolated from raw milk. *Korean Journal of Dairy Science*, 19, 17–24.
- Kim, M.H., Kim, H.K., Lee, J.K., Park, S.Y. and Oh, T.K., 2000.** Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*, high level production, purification and calcium-dependent thermostability. *Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology*, 64, 280–286.

- Kiyota, H., Higashi, E., Koike, T. and Oritani, T., 2001.** Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 1035-8.
- Klaus, D., 1998.** An enzyme process for the physical refining of seed oils. *Chemical Engineering and Technology*, 21,278-281.
- Klibanov, A.M., 1997.** Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology*, 15, 97-101.
- Klibanov, A.M. 1990.** Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Accounts of Chemical Research*, 23, 114-120.
- Kojima, Y., Yokoe, M. and Mase, T., 1994.** Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1564– 1568.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. and 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.
- Krahe, M., Antranikian, G. and Markel, H., 1996.** Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 18, 271–285.
- Kraulis, P.J., 1991.** Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal Application Crystallography*, 24, 946-950.
- Krieger, N., Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R., Melo, E.H.M., Lima- Filho, J.L. and Cabral, J.M.S., 1997.** Purification of the *Penicillium citrinum* lipase using AOT reversed micelles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69, 77– 85.
- Krieger, N., Taipa, M.A., Melo, E.H.M., Lima-Filho, J.L., Aires- Barros, M.R. and Cabral, J.M.S., 1999.** Purification of the *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. *Bioprocess Engineering*, 20, 59– 65.
- Kristjansson, J. K. and Stetter, K. O., 1992.** Thermophilic Bacteria, Kristjansson, J. K.(Ed.), CRC Pres, Boca Raton, pp. 1-18.
- Kulkarni, N. and Gadre, R.V., 1999.** A novel alkaline, thermostable, protease-free lipase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters*, 21, 897-899.
- Kumar, A. and Kanwar, S.S., 2011.** Synthesis of isopropyl ferulate using silica-immobilized lipase in an organic medium. *Enzyme Research*, 1-8.
- Kumar, S. and Nussinov, R., 2001.** How do thermophilic proteins deal with heat? A review. *Cellular and Molecular Life Science*, 58, 1216–1233.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S. and Gupta, R., 2005.** Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and

- alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. Protein Expression and Purification, 41, 38–44. DOI:10.1016/j.pep.2004.12.010.
- Kundu, M., Basu, J., Guchhait, M. and Chakrabarti, P., 1987.** Isolation and characterization of an extracellular lipase from the conidia of *Neurospora crassa*. Journal of General Microbiology, 133, 149– 153.
- Lang, S., Katsiwela, E., Kleppe, F. and Wagner, F., 1991.** *Ustilago maydis* lipolytic enzymes: characterization and partial purification. In: Alberghina, L., Schmid, R.D., Verger, R. (Eds.), Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering. GBF Monographs. VCH, Weinheim, 361– 364.
- Latha, K. and Ramarethinam, S., 1999.** Studies on lipid acyl hydrolases during tea processing. Annual Review of Plant Physiology, 3, 73-78.
- Lawson, D.M., Brzozowski, A.M., Rety, S., Verma, C. and Dodson, G.G., 1994.** Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through x-ray crystallography and intuitive modelling. Protein Engineering, 7, 543-550.
- Lee, D.W., Kim, H.W., Lee, K.W., Kim, B.C., Chose, E.A., Lee, H.S., Kim, D.S. and Pyun, Y.R., 2001.** Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. Enzyme and Microbial Technology, 29, 6, 363-371. DOI:10.1016/S0141-0229(01)00408-2.
- Lee, D.W., Kim, H.W., Lee, K.W., Kim, B.C., Choe, E.A., Lee, H.S., Kim, D.S. and Pyun, Y.R., 2001.** Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1, Enzyme and Microbial Technology, 29, 363-371. PII: S0141-0229(01)00408-2.
- Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J., Kim, D.S., Suhartono, M.T. and Pyun, Y.R., 1999.** Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS Microbiology Letters, 179, 393-400.
- Lee, K.K.B., Poppenborg, L.H. and Stuckey, D.C., 1998.** Terpene ester production in a solvent phase using a reverse micelle-encapsulated lipase. Enzyme and Microbial Technology, 23, 253-260.
- Lee, S.Y., Rhee, J.S., 1993.** Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. Enzyme and Microbial Technology, 15, 617–623.
- Leow, T.C., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M. and Salleh, A.B., 2004.** High level expression of thermostable lipase from *Geobacillus* sp. Strain T1. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 68(1), 96-103.
- Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C., 1993.** Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. European Journal of Biochemistry, 216, 155–160.

- Li, H. and Zhang, X. 2005.** Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. *TW1*. *Protein Expression and Purification*, 42, 153-159.
- Li, M., Yang, L.R., Xu, G. and Wu, J.P., 2013.** Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254. *Bioresource Technology*, 148, 114-120. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.101
- Li, X.L., Zhang, W.H., Wang, Y.D., Dai, Y.J., Zhang, H.T., Wang, Y., Wang, H.K. and Lu, F.P., 2014.** A high-detergent-performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 suitable for detergent formulation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 16-24. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.01.006.
- Lin, J.F., Lin, Q., Li, J., Fei, Z.A., Li, X.R., Xu, H., Qiao, D.R. and Cao, Y., 2012.** Bacterial diversity of lipase-producing strains in different soils in southwest of China and characteristics of lipase. *African Journal Microbiology Research*, 6(16), 3797-3806.
- Lin, S.F., Chiou, C.M., Yeh, C.M. and Tsai, Y.C., 1996a.** Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1093–1095.
- Lin, S.F., Lee, J.C. and Chiou, C.M., 1996b.** Purification and characterization of a lipase from *Neurospora* sp. TT-241. *J. American Oil's Chemical Society*, 73, 739– 745.
- Litthauer, D., Ginster, A. and Eeden Skein, E.V., 2002.** *Pseudomonas luteola* lipase: A new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 209–215. PII: S0141-0229(01)00469-0.
- Liu, Z., Chi, Z., Wang, L. and 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. DOI: 10.1016/j.bej.2008.01.014.
- Llarch, A., Logan, N.A., Castellvi, J., Prieto, M.J. and Guinea, J., 1997.** Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on deception island, south Shetland Archipelago. *Microbiological Ecology*, 34, 58-65.
- Lopez, C., Guerra, N.P. and Rua, M.L., 2000.** Purification and characterization of 2 isoforms from *Candida rugosa* lipase-B. *Biotechnology Letter*, 22, 1291– 1294.
- Lopez, G., 1999.** DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life. *Journal of Molecular Evolution*, 46, 439–452.
- Lott, J.A. and Lu, C.J., 1991.** Lipase isoforms and amylase isoenzymes-assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis. *Clinical Chemistry*, 37, 361-368.
- Lowe, S.E., Jain, M.K. and Zeikus, J.G., 1993.** Biology, ecology, and

- biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiological Reviews*, 57, 451–509.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luria, S.E., Adams, J.N. and Ting, R.C., 1960.** Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology*, 12, 348-390.
- Macrae, A.R. and Hammond, R.C., 1985.** Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3, 193-219.
- Macrae, A.R., 1983.** Extracellular microbial lipases. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*.(eds.) Fogarty, W.M., Applied Science Publishers Ltd. England, 225-250.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 2000.** Brock Biology of Microorganisms. Prentice-Hall Inc., 9th edn., New Jersey, 783-784.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN: 10 0-87969-309-6, 1626 p, New York, USA.
- Margolin, A.L., 1993.** Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 266-280. DOI:10.1016/0141-0229(93)90149-V
- Mase, T., Matsumiya, Y. and Akiba, T., 1995.** Purification and characterization of a new lipase from *Fusarium* sp. YM-30. *Bioscience, Biotechnology Biochemistry*, 59, 1771– 1772.
- Masomian, M., Abd Rahman, R.N.Z.R., Salleh,, A.B. and Basri, M., 2013.** A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. *Process Biochemistry*, 48, 169–175. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.11.002.
- Maugard, T., Rejasse, B. and Legoy, M.D., 2002.** Synthesis of water-soluble retinol derivatives by enzymatic method. *Biotechnology Progress*, 18, 424-428.
- Metzger, J.O. and Bornscheuer, U., 2006.** Lipids as renewable resources: Current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 13-22.
- Miquel, P., 1988.** Monographied'un Bacille Vant Au-Delade 70 °C, *Annual Micrographic*, 1, 3-10.
- Mitsubishi, K., Yamashita, M., Hwan, Y.S., Ihara, F., Nihira, T. and Yamada, Y., 1999.** Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing

- hydrolysis of oleyl benzoate from *Acinetobacter nov.* sp. strain KM109. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 1959–1964.
- Mojovic, L., Siler, M.S., Kukic, G. and Vunjak, N.G., 1993.** Rhizopus arrhizus lipase catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 438-443.
- Mozaffar, Z. and Weete, J.D., 1993.** Purification and properties of an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. *Lipids*, 28, 377–382.
- Munoz, A. and Katerndahl, D.A., 2000.** Diagnosis and management of acute pancreatitis. *American Academy of Family Physician*, 62, 164–174.
- Muraoka, T., Ando, T. and Okuda, H., 1982.** Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *Journal of Biochemistry*, 92, 1933–1939.
- Mustranta, A., Forssel, P. and Poutanen K., 1993.** Application of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 133-139.
- Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A. and Tominaga, Y., 1996.** Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: high level production and purification. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 488–492.
- Naoe, K., Nishino, M., Ohsa, T., Kawagoe, M. and Imai, M., 1999.** Protein extraction using sugar ester reverse micelles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 221–226.
- Nawani, N. and Kaur, J., 2000.** Purification, characterization and thermo stability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 206, 91-96.
- Nawani, N., Dosanjh, N.S. and Kaur, J., 1998.** A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, 20 (10), 997-1000.
- Nawani, N., Khurana, J. and Kaur, J. 2006.** A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290, 17-22. DOI: 10.1007/s11010-005-9076-4.
- Nini, L., Sarda, L., Comeau, L.C., Boitard, E., Dubes, J.P., and Chahinian, H., 2001.** Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1534, 34-44.
- Nishio, T., Chikano, T. and Kamimura, M., 1987.** Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 181–186.
- Noor, I.M., Hasan, M. and Ramachandran, K.B., 2003.** Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, 39, 13-20.



- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M. and Ishukawa, H., 2000.** Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89 (5), 451– 457.
- Oh, B.C., Kim, H.K., Lee, J.K., Kang, S.C. and Oh, T.K., 1999.** *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiology Letters*, 179, 385– 392.
- Omar, I.C., Hayashi, M. and Nagai, S., 1987.** Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* no.3. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 37–45.
- Orru, R.V.A., Archelas, A., Furstoss, R. and Faber, K., 1999.** Epoxide hydrolases and their synthetic applications. In: *Biotransformations, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. (eds.) Faber, K., Springer-Verlag. Heidelberg. Germany, 63, 145-167.
- Osterberg, E., Blomstrom, A.C. and Holmberg, K., 1989.** Lipase catalysed transesterification of unsaturated lipids in microemulsion. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 66 (9), 1330-1333.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V.T., 1999.** The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 29(2), 119-131.
- Patel, M.T., Nagarajan, R. and Kilara, A., 1996.** Hydrolysis of milk fat by lipase in solvent-free phospholipids reverse micellar media. *Journal of Food Science*, 61 (1), 33-39.
- Patil, K.J., Chopda, M.Z. and Mahajan, R.T., 2011.** Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science Technology*, 4(8), 971-982.
- Petersen, M.T.N., Fojan, P. and Petersen, S.B., 2001.** How do Lipases and Esterases Work: The Electrostatic Contribution. *Journal of Biotechnology*, 85(2), 115-147.
- Pezzilli, R., Talamini, G. and Gullo, L., 2000.** Behaviour of serum pancreatic enzymes in chronic pancreatitis. *Digestive and Liver Disease*, 32(3), 233–237.
- Pleiss, J., 2000.** Molecular basis of specificity and stereoselectivity of microbial lipases toward triacylglycerols. In: *Enzymes in Lipid Modification*. (eds.) Bornscheuer, U., Wiley-VCH. Weinheim, pp: 85-99.
- Pratuangdejkul, J. and Dharmsthiti, S., 2000.** Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Microbiology Research*, 155, 95–100.
- Qian, J.H. and Xu, J.H., 2004.** Catalytic performance of a highly enantioselective (R)-ester hydrolase from a new isolate *Acinetobacter* sp. CGMCC 0789. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27, 227-32.

- Rahman, R.N.Z., Leow, T.C., Basri, M. and Salleh A.B., 2005.** Secretory expression of thermostable T1 lipase through Bacteriocin Release Protein (BRP). *Protein Expression and Purification*, 40 (2), 411-416.
- Ramani, K., Kennedy, L.J., Ramakrishnan, M. and Sekarana, G., 2010.** Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochemistry*, 45, 1683–1691. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.06.023.
- Ramteke, P.W., Joseph, B. and Kuddus, M., 2005.** Extracellular lipases from anaerobic microorganisms of Antarctic. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 293–294.
- Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Musani, R., Samad, M.Y. and Basri, M., 1997.** Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3, 153–159.
- Ru'a, M. L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A. and Schmid, R.D., 1997.** Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*, 56, 89–102. PII: S0168-1656(97)00079-5.
- Sakiyama, T., Yoshimi, T., Miyake, A, Umeoka, M, Tanaka, A., Ozaki, S. and Nakanishi, K., 2001.** Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1), 27-32.
- Sarkar, P., Yamasaki, S., Basak, S., Bera, A. and Bag, P.K., 2012.** Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea rhizosphere*. *Process Biochemistry*, 47, 858-866. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.02.023.
- Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A. and Giri, B., 2003.** Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 39, 239-247. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00068-2.
- Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Sheda Dvidson, W., Bradoo, S. and Gulati, R., 1999.** Microbial lipases, potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, 77, 101-115.
- Saygideğer Demir, B. and Tukul, S.S., 2010.** Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64, 123–128. DOI:10.1016/j.molcatb.2009.09.011.
- Schmid, R.D. and Verger, R., 1998.** Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37, 1608-1633.
- Schmidt-Dannert, C., 1999.** Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 7, 2123-2130.

- Schmidt-Dannert, C., Rua, M.L. and Schmid, R.D., 1997.** Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenuatus*: screening, purification, cloning, overexpression and properties. In: Rubin, B., Dennis, E.A. (Eds.), *Lipases*. Academic Press, New York, 194–220.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M.L., Atomi, H. and Schmid, R.D., 1996.** Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1301, 105–114.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U. and Schmid, R.D., 1994.** Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermotenuatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1214, 45-53.
- Schuepp, C., Kermasha, S., Michalski, M.C. and Morin, A., 1997.** Production, partial purification and characterization of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *Process Biochemistry*, 32, 225–232.
- Scopes, K. R., 1994.** *Protein Purification, Principles and Practise*. 3rd Edition, Springer-Verlag Inc., New York, 380.
- Sharma, A. K., Tiwari, R. P. and Hoondal G. S., 2001a.** Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. *Journal of Basic Microbiology*, 41, 6, 363-366.
- Sharma, C.K., Sharma, P.K. and Kanwar, S.S., 2012.** Optimization of production conditions of lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498. *Research Journal of Recent Sciences*, 1(7), 25-32.
- Sharma, R., Chisti, Y. and 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. and Gupta, J.K., 2002.** Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*, 37, 1075-1084.
- Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H.I. and Kato, Y., 1998.** Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 304–307.
- Shaw, J.F., Chang, C.H. and Wang, Y.J., 1989.** Characterization of three distinct forms of lipolytic enzyme in a commercial *Candida* lipase preparation. *Biotechnology Letters*, 11, 779–784.
- Shen, D., Xu, J.H., Gong, P.F., Wu, G.H. and Liu, Y.Y., 2000.** Isolation of esterase producing *Trichosporon brassicae* and its catalytic performance in kinetic resolution of ketoprofen. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 1101-6.

- Shimada, Y., Koga, C., Sugihara, A., Nagao, T., Takada, N., Tsunasawa, S. and Tominaga, Y., 1993.** Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, 349–352.
- Shu, C.H., Xu, C.J. and Lin, G.C., 2006.** Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, 41, 734-738. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.09.007
- Sigurgisladottir, S., Konraosdottir, M., Jonson, A., Kristjansson, J.K. and Matthiasson, E., 1993.** Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot spring. *Biotechnology Letters*, 15(4), 361-366.
- Simons, J.W., Adams, H., Cox, R.C. and Verheij, H.M., 1996.** The lipase from *Staphylococcus aureus*: Expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. *European Journal of Biochemistry*, 242, 760–769.
- Simons, J.W.F.A., van Kampen, M.D. and Verheij, H.M., 1998.** Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*-comparison of the substrate specificity with those of other microbial lipases. *European Journal of Biochemistry*, 253, 675–683.
- Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F.M. and Chen, S.T., 2001.** Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, purification, and characterization, *Protein Expression and Purification*, 22, 388–398. DOI:10.1006/prev.2001.1456.
- Snellman, E.A., Sullivan, E.R. and Colwell, R.R. 2002.** Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur. Journal of Biochemistry*, 269, 5771-5779.
- Sonnet, P.E. and Gazzillo, J.A., 1991.** Evaluation of lipase selectivity of hydrolysis. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 68, 11-15.
- Soumanou, M.M., Bornscheuer, U.T., Schmid, U. and Schmid, R.D., 1999.** Crucial role of support and water activity on the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. *Biocatalysis Biotransformations*, 16, 443-459.
- Spener, F., Hedrich, H.C., Menge, U. and Schmid, R.D., 1991.** Intrinsic activity and catalytic residues of the lipase from *Geotrichum candidum*. In: Alberghina, L., Schmid, R.D., Verger, R. (Eds.), *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. GBF Monographs. VCH, Weinheim, 325–334.
- Stocklein, W., Sztajer, H., Menge, U. and Schmid, R.D., 1993.** Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1168, 181–189.
- Sugihara, A., Shimada, Y. and Tominaga, Y., 1988.** Purification and characterization of *Asperigillus niger* lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(6), 1592-1592.

- Sugihara, A., Shimada, Y. and Tominaga, Y., 1990.** Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. *Journal of Biochemistry*, 107, 426–430.
- Sugihara, A., Tani, T. and Tominaga, Y., 1991.** Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *Journal of Biochemistry*, 109(2), 211-216.
- Sugiura, M. and Isobe, M., 1974.** Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*: III. Purification of a low molecular weight lipase and its enzymatic properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 341, 195-200.
- Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A. and Wiwat, C., 2010.** Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105, 228–235. DOI: 10.1016/j.jip.2010.06.011.
- Suzuki, M., Yamamoto, H. and Mizugaki, M., 1986.** Purification and general properties of a metal—insensitive lipase from *Rhizopus japonicus* NR. 400. *Journal of Biochemistry*, 100, 1207–1213.
- Sztajer, H., Lunsdorf, H., Erdman, H., Menge, U. and Schmid, R., 1992.** Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1124, 253–261.
- Tahoun, M.K. and Ali, H.A., 1986.** Specificity and glyceride synthesis by mycelial lipases of *Rhizopus delemar*. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 429-432.
- Takamoto, T., Shirasaka, H., Uyama, H. and Kobayashi, S., 2001.** Lipase-catalysed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent. *Chemistry Letters*, 6, 492-493.
- Talon, R., Dublet, N., Montel, M.C. and Cantonnet, M., 1995.** Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Current Microbiology*, 30, 11-16.
- Tamilarasan, K. and Kumar, M.D., 2012.** Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1, 309-313. DOI:10.1016/j.bcab.2012.07.001.
- Taylor, F., 1989.** Stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* with *p*-chloromercuribenzoic acid. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68, 141-143.
- Tayyab, M., Rashid, N. and Akhtar, M., 2011.** Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 3, 272-278. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.11.015.
- Terstappen, G.C., Geerts, A.J. and Kula, M.R., 1992.** The use of detergent- based aqueous two-phase systems for the isolation of extracellular proteins: purification

- of a lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 16, 228-235.
- Thomson, C.A., Delaquis, P.J. and Mazza, G., 1999.** Detection and measurement of microbial lipase activity: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(2), 165-187.
- Toida, J., Arikaea, Y., Kondou, K., Fukuzawa, M., Ohnishi, K. and Sekiguchi, J., 1998.** Purification and characterization of triacylglycerol- lipase from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62, 759-763.
- Toida, J., Kondou, K., Fukuzawa, M., Ohnishi, K. and Sekiguchi, J., 1995.** Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1199-1203. DOI: 10.1271/bbb.59.1199
- Torossian, K. and Bell, A.W., 1991.** Purification and characterization of an acid-resistant triacylglycerol lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 13, 205-211.
- Tyski, S., Hryniewicz, W. and Jeljaszewic, J., 1983.** Purification and some properties of the *Staphylococcal* extracellular lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 749, 312-317.
- Undurraga, D., Markovits, A. and Erazo, S., 2001.** Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil modification. *Process Biochemistry*, 36, 933-939.
- Uslan, H.A. 1997.** Enzimoloji, Enzim etki mekanizmaları ve aktif merkez tayini. Telefoncu, A. (Ed), Lisansüstü Yaz Okulu, 21-27 Eylül, 35-42 s., Kuşadası, Türkiye.
- Ülker, S. and Alpay Karaoğlu, Ş., 2012.** Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. corticola* isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 4, 385-390. DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.04.023.
- van Oort, M.G., Debeer, A.M.Th.J., Dijkman, R., Tjeenk, M.L., Verheij, H.M., de Haas, G.H., Wenzig, E. And Gotz, F., 1989.** Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry*, 28, 9278-9285.
- Veeraragavan, K. and Gibbs, B.F., 1989.** Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnology Letters*, 11, 345-348.
- Veeraragavan, K., Colpitts, T. And Gibbs, B.F., 1990.** Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1044, 26-33.
- Velu, N., Divakar, K., Nandhinidevi, G. and Gautam, P., 2012** Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1, 45-50. DOI: 10.1016/j.bcab.2011.08.004.

- Verger, R., 1997.** Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* 15, 32-38.
- Vicente, M.L.C., Aires-Barros, M.R. and Cabral, J.M.S., 1990.** Purification of *Chromobacterium viscosum* lipases using reversed micelles. *Biotechnology Techniques*, 4, 137-142.
- Vieille, C. and Zeikus, J.G., 2001.** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 1-43.
- Vieille, C., Burdette, D.S. and Zeikus, J.G., 1996.** Thermozyms. *Biotechnology Annual Review*, 2, 1-83.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J. and Haas, M.J., 2000.** Customizing lipases for Biocatalysis: a survey of chemical, physcal and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.
- Vulfson, E.N., 1994.** Lipases: their Structure, Biochemistry and Application. (eds.) Woolley, P., and Petersen, S. B., Cambridge University Press. United Kingdom, 271-288.
- Wang, Y., Srivastava, K.C., Shen, G.J. and Wang, H.Y., 1995.** Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79 (5), 443-438.
- Weber, N., Klein, E. and Mukerjee, K. D., 1999.** Long chain acyl thioesters prepared by solvent free thioesterification and transesterification catalysed by microbial lipases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 401-404.
- Whellcuright, S.M., 1991.** Protein Characteristics. *Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing*, Oxford University Pres, New York, 26-40.
- Wingender, J., Voltz, S. and Winkler, U.K., 1987.** Interaction of extracellular *Pseudomonas* lipase with alginate and its potential use in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 139-145.
- Wu, X.Y., Jaaskelainen, S. and Linko, Y.Y., 1996.** Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59, 145-150.
- Yamada, Y., Kuboi, R. and Komasaawa, I., 1994.** Extraction of enzymes and their activities in AOT reverse micellar systems modified with nonionic surfactants. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 27, 404-409.
- Yamaguchi, S. and Mase, T., 1991.** Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 720-725.
- Yan, F., Yong-Goe, J., Kazuhiko, I., Hiroyasu, I., Susumu, A., Tohru, Y., Hiroshi, N., Shugui, C., Ikuo, M. and Yoshitsugu, K., 2000.** Thermophilic phospholipase

- A2 in the cytosolic fraction from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77, 1075-1084.
- Yeo, S.H., Nihira, T. and Yamada, Y., 1998.** Purification and characterization of tert-butyl ester-hydrolyzing lipase from *Burkholderia* sp. YY62. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 62, 2312-2317.
- Yeoh, H.H., Wong, F.M. and Lin, G., 1986.** Screening for fungal lipases using chromogenic lipid substrates. Mycologia, 78, 298-300.
- Yu, M., Qin, S. and Tan, T., 2007.** Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry, 42, 384-391. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.09.019.
- Zhang, I.Q., Zhang, Y.D., Xu, L., Li Yang, X.C., XU. G.L., Wu, X.X., Gao H.Y., Du, W.B., Zhang, X.T. and Zhang, X.Z., 2001.** Lipase catalyzed synthesis of RGD Diamide in aqueous water-miscible organic solvents. Enzyme and Microbial Technology, 29, 129-35.
- Zheng, Y.Y., Guo, X.H., Song, N.N. and Li, D.C., 2011.** Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning, expression and characterization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 69, 127-132. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.01.006.



## ÖZGEÇMİŞ

31.07.1981 yılında Ardahan'ın Posof ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kars'da tamamladı. Lise öğrenimini ise Yalova'da tamamladı. 2000 yılında başladığı lisans eğitimini 2004 Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde birincilikle tamamladı. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisansa başladı ve bir yıl KTÜ Yabancı Diller Bölümünde hazırlık okudu. 2008 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans programını tamamladı. 2010 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında başladığı doktora öğrenimini halen devam ettirmektedir. Kasım 2005' de KTÜ Fen bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandı ve 2006 Aralık'da bu görevinden ayrıldı. 2007-2012 yılları arasında Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalıştı. 2012 yılından beri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' nde araştırma görevlisi olarak görev yapmakta olan Arife Pınar EKİNCİ orta seviyede İngilizce bilmektedir.

### **Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları;**

#### **Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:**

1. İslamoğlu F., Kahveci B., Özil M., Akyüz E., Menteşe E., **Ekinci A.P.**, 2009. Determination of the Protonation Constants of Triazole Derivatives in Non-Aqueous Solvents. Asian Journal of Chemistry, 21(2), 1453-1459.
2. Uydu H.A., **Ekinci A.P.**, Atak M, Demir A., 2014. Protective roles of Cimin grape tissues on oxidative stress markers in the cellular system model. Turkish Journal of Medical Sciences, 44, 42-49.
3. **Ekinci A.P.**, Dinçer B., Baltaş N., Adıgüzel A., 2015. Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. ( Kabul edildi)

**Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:**

1. H. A. Uydu, M. Bilici, G. Rumeli, D. A. Ataç, A. Özen, **A.P. Ekinci** and N. Aktaş. The comparison of the effect of red grape juice and its wine on LDL oxidation in vitro. 3<sup>1st</sup> FEBS Kongresi, İstanbul 2006.
2. Murat Küçük, Ali Osman Sarıkaya, Nesibe Arslan Burnaz, Nimet Baltaş, **Arife Pınar Ekinci**, Emine Akyüz, Ahmet Yaşar, Fatma Yaylacı Karahalil, Ömer Ertürk, Kamil Coşkunçelebi, Sevgi Kolaylı ve Nurettin Yaylı. Use of Acid Hydrolysis/Catalysis (AGC) in Essential Oil Production by Hydro/Steam Distillation: Changes in Yield, Chemical Composition and Biological Activities (**sözlü**). 6<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemistry Days (AACD), Denizli 2008.

**Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

1. Murat Küçük, Nimet Aktaş, Emine Akyüz, **Arife Pınar Ekinci**, Celal Duran, Nuri Yıldırım, Ali Osman Sarıkaya, Sevgi Kolaylı, Şengül Karaoğlu, Kamil Coşkunçelebi, Nesibe Arslan Burnaz. Sulu Bitki Özütlerinin Asit Hidrolitik/Katalitik (AHC) Dönüşümleri ve Biyolojik Aktivitelere Değişiklikler (**sözlü**). XXI. Ulusal Kimya Kongresi, Malatya 2007.
2. Murat Küçük, **Arife Pınar Ekinci**, Nuri Yıldırım, Emine Akyüz, Ali Osman Sarıkaya, Nesibe Arslan Burnaz, Nimet Aktaş, Şengül Karaoğlu, Kamil Coşkunçelebi. Mor Sümbül'ün Asit Hidrolizi/Kataliziyle (AHC) Elde Edilen Uçucu Yağlarının Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri. XXI. Ulusal Kimya Kongresi, Malatya 2007.
3. **Arife Pınar Ekinci**, Hüseyin Avni Uydu, Mehtap Bilici, Nur Karali, Canan Top. Erzincan Üzümünün Plazma ve Eritrositlerde Antioksidan Etkisinin *in Vitro* İncelenmesi. XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, Nevşehir, 2008.
4. Hüseyin Avni Uydu, **Arife Pınar Ekinci**, Mehtap Bilici, Nur Karali, Canan Top. Erzincan Üzümünün Eritrosit Lipit Peroksidasyonuna Etkisinin Zaman ve Doza Bağlı İncelenmesi. XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, Nevşehir, 2008.
5. Fatih İslamoğlu, İsmail Aksu, Musa Özil, Emine Akyüz, Emre Menteşe, **Arife Pınar Ekinci**, Bahittin Kahveci, Bazı Yeni 3-Alkil(Aril)-4-(p-Karboksilfenil)-4,5-dihidro-1H-1,2,4-Triazol-5-On Türevi Bileşiklerin Asitlik Sabitlerinin Spektrofotometrik

Yöntem İle İncelenmesi. V. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Bildiri Özetleri Kitabı, 211, Erzurum, 2010.

6. Hüseyin Avni Uydu, Adem Demir, Mehtap Bilici, **Arife Pınar Ekinci**. Siyah Ve Yeşil Çay İle Atıklarının Antioksidan Özelliklerinin Karşılaştırılması. XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, 2011.
7. Nimet Baltaş, Barbaros Dinçer, Sevgi Kolaylı, **Arife Pınar Ekinci**, Ahmet Adıgüzel, Medine Güllüce. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (sözlü). XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya 2012.
8. **Arife Pınar Ekinci**, Barbaros Dinçer, Nimet Baltaş, Ahmet Adıgüzel. *Geobacillus stearothermophilus* AH22 Suşundan Lipazın Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (sözlü). XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir, 2013.
9. Nimet Baltaş, Murat Durmaz, Barbaros Dinçer, **Arife Pınar Ekinci**, Ahmet Adıgüzel. Tam Hücre İmmobilizasyonu ile *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Katalaz Enziminin Karakterizasyonu (sözlü). XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir, 2013.
10. Nimet Baltaş, Barbaros Dinçer, Sevgi Kolaylı, **Arife Pınar Ekinci**, Ahmet Adıgüzel. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu. XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir 2013.
11. Nimet Baltaş, Havva Atasever, **Arife Pınar Ekinci**, Barbaros Dinçer, Ahmet Adıgüzel. Termofilik *Anoxybacillus gonensis* D4 Suşundan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Üretimi. I. Biyokimya Günleri, Karamanmaraş, 2013.

## **Projeler**

1. Bazı Yeni 1,2,4-Triazol-5-On Türevi Bileşiklerinin Asitlik Sabitlerinin Potansiyometrik ve Spektrofotometrik Yöntemler ile İncelenmesi", Rize Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (RÜBAP), Proje Kod No: 2008.102.02.3, Araştırmacı (Tamamlandı).
2. Yeni İzole Edilmiş Bir Termofilik Bakteriden Lipaz Enziminin İzolasyonu ve İmmobilizasyonu (RÜBAP), Proje Kod No: 2010.102.02.3., Araştırmacı (Tamamlandı).
3. Çay ve Onların Atık Ekstraktlarının Hücresel Ortamda Biyofonksiyonlarının

Karşılaştırılması, Rize Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (RÜBAP), Proje Kod  
No: 2011.102.02.2., Araştırmacı (Tamamlandı).