

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Geobacillus stearothermophilus AH22 BAKTERİSİ
MEMBRANINA BAĞLI LİPAZIN KARAKTERİZASYONU

ENGİN İSKENDER

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ BARBAROS DİNÇER

TEZ JÜRİLERİ

PROF. DR. ONUR ATAKİŞİ

DOÇ. DR. NİMET BALTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

RİZE-2019

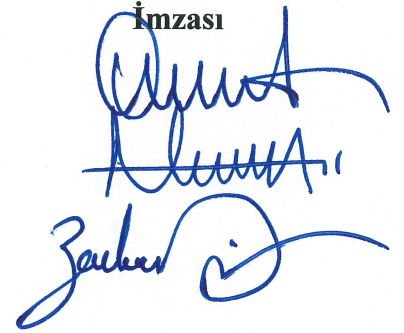
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Geobacillus stearothermophilus* AH22 BAKTERİSİ MEMBRANINA BAĞLI
LİPAZIN KARAKTERİZASYONU**

Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER danışmanlığında Engin İSKENDER tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 25/01/2019 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Onur ATAKİŞİ
Üye	: Doç. Dr. Nimet BALTAŞ
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER

İmzası



Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır. Tezde yer alan deneysel çalışmalar, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca; ilgisini, sevgisini ve sonsuz anlayışını benden esirgemeyen maddi ve manevi desteği ile her an yanımda olan, engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, bütün çalışmama ışık tutan, her aşamasında ilgi ve desteğini gördüğüm çok değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmada kullanılan *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 suşunu temin eden Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, laboratuvar çalışmalarımnda her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Özlem FAİZ, sayın Doç. Dr. Nimet BALTAŞ ve Kimya Bölümü personeline tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, verdiğim kararlarda desteklerini her zaman arkamda hissettiğim maddi ve manevi yanımda olan canım ailemede tüm kalbimle teşekkür ederim.

Engin İSKENDER

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Geobacillus stearothermophilus* AH22 Bakterisi Membranına Bağlı Lipazın Karakterizasyonu” 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.
08/01/2019


Engin İSKENDER

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 BAKTERİSİ MEMBRANINA BAĞLI LİPAZIN KARAKTERİZASYONU

Engin İSKENDER

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER

Lipazlar veya diğer adıyla triaçilgliserol açilhidrolazlar (E.C. 3.1.1.3), lipid içeren atık suların enzimatik degradasyonunda, organik sentez tepkimelerinde, deterjan sanayinde, tekstil sanayinde, biyosüpfaktanların sentezinde, kağıt üretiminde, farmasötiklerde, agrokimyasal (tarım kimyası) endüstride, pestisitlerde, gıda endüstrisinde, süt endüstrisinde, kozmetiklerde, oleokimyasal endüstride, deri gibi birçok endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Bu çalışmada *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 membranına bağlı lipaz üretebilme kapasitesi belirlenerek, lipazı en iyi üretebileceği ortam tespit edildi. Üretilen membrana bağlı lipazın en iyi aktivite gösterdiği pH, sıcaklık gibi bazı parametreler belirlendikten sonra, *p*- Nitrofenil asetat (pNFA), *p*-Nitrofenil bütirat (pNFB), *p*-Nitrofenil oktaonat (pNFO), *p*-Nitrofenil laurat (pNFL) substratları varlığında K_m ve V_{maks} değerleri olan kinetik verileri elde edildi. Ah22 membrana bağlı lipazın en yüksek aktiviteyi çalışmada kullanılan substralarının varlığında pH 9,0'da ve düşük karbon zincirli yağ asidine sahip substratları 20-40 °C'de, uzun karbon zincirine sahip substratların ise 50-60 °C'de gösterdiği tespit edildi. V_{maks}/K_m (dk^{-1}) oranlarına bakıldığında 0,068 oranı ile en iyi etkileştiği substratı pNFB olurken bunu sırasıyla pNFL, pNFO ve pNFA takip ettiği belirlendi. Ayrıca liyofilizasyon yöntemiyle kurutulan hücreler toz haline getirildikten sonra da lipaz aktivitesini gösterdiği gözlemlendi. Ancak tekrar kullanım açısından yaş hücrelerin toz halindeki hücrelere oranla daha verimli olduğu belirlendi. Ah22 membrana bağlı lipazın aktivitesinin anyon ve katyonlar varlığında fazla değişmediği, ancak deterjanlar ve β -ME varlığında kayda değer oranda azaldığı tespit edildi.

2019, 57 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Geobacillus*, *stearothermophilus*, Lipaz, Membran.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF LIPASE BOUND TO MEMBRANE OF *Geobacillus* *stearothermophilus* AH22 BACTERIA

Engin İSKENDER

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Master Thesis
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Barbaros DİNÇER

Lipases, also known as triacylglycerol acylhydrolases (EC 3.1.1.3), are used in many industrial applications such as in enzymatic degradation of lipid-containing effluents, organic synthesis reactions, detergent industry, textile industry, synthesis of biosurfactants, paper production, pharmaceuticals, agrochemical (agricultural chemistry) industry, pesticides, food industry, the dairy industry, cosmetics, oleochemical industry and leather. In this study, the capacity to produce the *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 membrane-bound lipase and the best the medium with which lipase could be produced was determined. Following of determination of certain parameters such as pH and temperature, where the produced membrane-bound lipase exhibits the best activity, the kinetic data as K_m and V_{max} were obtained in the presence of p-Nitrophenyl acetate (pNFB), p-Nitrophenyl octanoate (pNFO) and p-Nitrophenyl laurate (pNFL) substrates. The highest activity of Ah22 membrane-bound lipase was found at pH 9.0 in the presence of the substrates, at 20-40 °C in substrates with low carbon chain fatty acid and at 50-60 °C in substrates with long carbon chain. In terms of V_{max} / K_m (min^{-1}) ratios, pNFB was the most effective substrate with 0.068, followed by pNFL, pNFO and pNFA. In addition, it was observed that the cells dried by lyophilisation showed lipase activity after they were pulverized. However, in terms of re-use, it was determined that wet cells were more efficient than powdered cells. It was found that the activity the Ah22 membran-bound lipase had not changed much in the presence of anions and cations, but decreased significantly in the presence of detergents and β -ME.

2019, 57 pages

Keywords: *Geobacillus*, *stearothermophilus*, Lipase, Membrane.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Lipazlar ve Özellikleri	6
1.3. Bakteriyel Lipazların Literatürde Yer Alan Özellikleri.....	8
1.3.1. pH ve Sıcaklık Özellikleri	8
1.3.2. Organik Çözücülerde Kararlılığı	9
1.3.3. Metal İyonlarının Etki Özelliği.....	10
1.3.4. Lipaz İnhibitörleri.....	11
1.4. Lipaz Katalizli Reaksiyonlar ve Tepkime Mekanizmaları	12
1.5. Lipazların Katalitik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması	16
1.5.1. Spesifik Olmayan Lipazlar	16
1.5.2. 1,3-Spesifik Lipazlar	17
1.5.3. Yağ Asidine Özgün Lipazlar	17
1.6. Lipazların Uygulama Alanları	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1. Materyal.....	21
2.2. Yöntem	21
2.2.1. Kullanılan Araçlar	21
2.2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	21
2.2.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	22
2.3. Deneysel Çalışmalar	23
2.3.1. Sıvı Besiyeri Hazırlanması	23
2.3.2. Lipaz Üretimi için Uygun Çalışma Ortamının Belirlenmesi.....	24
2.3.3. Ah 22 Membranına Bağlı Lipaz Aktivitesinin pH ile Değişimi.....	24

2.3.4.	Ah22 Membranına Bağlı Lipaz Aktivitesinin Sıcaklıkla Değişimi.....	25
2.3.5.	Ah22 Membranına Bağlı Lipaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	25
2.3.6.	Ah22 Lipazının Tekrar Kullanılabilirliği.....	26
2.3.7.	Bazı Metal Katyonlarının, Bazı Anyonların ve Bazı Deterjanların Ah22 Lipazı Aktivitesine Etkileri	26
2.3.7.1.	Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	26
2.3.7.2.	Anyonların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	26
2.3.7.3.	Bazı Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	27
3.	BULGULAR	28
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	38
5.	ÖNERİLER	42
	KAYNAKLAR	43
	ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Lipazların katalitik etkisi.	4
Şekil 2.	Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi	7
Şekil 3.	Açık ve kapalı kısımların da eklendiği <i>Candida rugosa</i> lipazının üç boyutlu yapısı.....	14
Şekil 4.	<i>Candida rugosa</i> lipazının açık ve kapalı formları.	15
Şekil 5.	Bir lipaz reaksiyonunun basitleştirilmiş katalitik mekanizması.	16
Şekil 6.	Spesifik olmayan lipazların katalizlediği hidroliz reaksiyonu.....	17
Şekil 7.	Yağ asidi spesifik lipazların katalizlediği reaksiyon.....	18
Şekil 8.	Farklı yağ içerikli farklı ortamlarda büyütülen Ah22 suşuna ait bakteri büyüme grafiği.	28
Şekil 9.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 suşu hücrelerinin pNFA substratı varlığında pH-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.	29
Şekil 10.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 suşu hücrelerinin pNFB substratı varlığında pH-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.	30
Şekil 11.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 suşu hücrelerinin pNFO substratı varlığında pH-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.	30
Şekil 12.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 suşu hücrelerinin pNFL substratı varlığında pH-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.	31
Şekil 13.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 suşu hücrelerinin pNFA, pNFB, pNFO pNFL substratları varlığında sıcaklık-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.	31
Şekil 14.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın p-nitrofenil asetat substratı varlığında aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi grafiği.	32
Şekil 15.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın p-nitrofenil bütirat substratı varlığında aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi grafiği.	33
Şekil 16.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın p-nitrofenil oktaonat substratı varlığında aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi grafiği.....	33
Şekil 17.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın p-nitrofenil laurat substratı varlığında aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi grafiği.	34
Şekil 18.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın pNFB sustratı varlığında tekrar kullanım grafiği.	35

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.	Lipaz Reaksiyonları.	13
Tablo 2.	Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları.....	20
Tablo 3.	Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları.....	21
Tablo 4.	Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları.	22
Tablo 5.	Sıvı besi ortamı hazırlanışı.....	23
Tablo 6.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 suşu bakterilerin farklı yağ kaynaklarında büyütüldükten sonra yapılan sonikasyon işlemi sonrası membrana bağlı lipaz aktiviteleri.....	29
Tablo 7.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın bazı kinetik verileri.....	34
Tablo 8.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın bazı kationlar varlığındaki aktivitesi.	35
Tablo 9.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın bazı anyonlar varlığındaki aktivitesi.....	36
Tablo 10.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın EDTA ve β -ME varlığındaki aktivitesi.	36
Tablo 11.	<i>G. stearothermophilus</i> Ah22 hücre membranına bağlı lipazın bazı deterjanlar varlığındaki aktivitesi.	37

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
EDTA	Etilen Diaminotetraasetik Asit
EU/mg	Özgül Aktivite
K_m	Michaelis-Menten Sabiti
mM	Milimolar
<i>p</i> NFA	<i>p</i> -Nitrofenil Asetat
<i>p</i> NFB	<i>p</i> -Nitrofenil Bütirat
<i>p</i> NFL	<i>p</i> -Nitrofenil Laurat
<i>p</i> NFO	<i>p</i> -Nitrofenil Oktaonat
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Tris	Tris(Hidroksimetil)Aminometan
V_{maks}	Maksimum Hız
β -ME	β -merkaptoetanol

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde çevre duyarlılığı, doğal yaşam ve doğal ürün kullanımını giderek artan bir ihtiyaç olmaktadır. Bu ihtiyaçların karşılanabilmesi için insanoğlu daha temiz teknolojilere yönelmektedir. Bu teknolojiler hem çevreye ve doğaya verilecek zararı en aza indirmeyi hem de özellikle insan ve canlı sağlığını her şeyin üstünde tutmaya yöneliktir.

Günümüz koşullarında artan tüketim ve buna bağlı olarak artan üretim ihtiyaçlarını karşılamak için çeşitli kimyasal süreçler izlenmektedir. Ancak izlenen bu kimyasal süreçler çeşitli olumsuzluklar da (uzun zaman alma, organik temelli olmama, süreç sırasında istenmeyen yan ürünler oluşumu veya düşük verim gibi) içermektedirler. Endüstride yaklaşık 50 yıldır aktif bir şekilde kullanılan enzim adı verilen biyolojik katalizörler bu süreçler içerisinde önemli bir avantaj sağlamış durumdadırlar. Günümüzde beyaz, kırmızı ve yeşil biyoteknoloji uygulamaları sözkonusudur. Enzim üretimi, beyaz biyoteknoloji olarak isimlendirilen sınıfta yer alır ve çeşitli endüstriyel proseslerde doğal uygulamalar olarak kullanılır. Beyaz biyoteknoloji uygulamaları, kırmızı (medikal) ve yeşil (tarımsal) biyoteknoloji uygulamalarından farklı olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bu teknoloji çevreye ve ekonomiye iyi imkânlar sunma avantajı sağlarlar. Beyaz biyoteknolojide yüksek enerji verimliliği amaçlanmış, ham materyal tüketimi ve CO₂ emisyonları önemli derecede azaltılmış ayrıca üretim maliyeti de genellikle düşürülmüştür (Ratledge ve Kristiansen, 2006).

Üst düzeyde organize olmuş kimyasal tepkimeler hayatın temelini oluşturmaktadırlar. Fakat bu tepkimelerin çoğunluğu hayatı devam ettirecek kadar hızlı meydana gelmemektedirler. Hayatın devamı enzimlerin fizyolojik ortamlarda gerçekleşen kimyasal tepkimelerin hızlarını 10¹⁰-10¹² kat artırması ile sağlanmaktadır. Enzimler; karbon, oksijen, hidrojen, azot ve kükürtten oluşan, protein yapılı moleküllerdir. Enzimler canlı yapılarında oluşan çok sayıdaki reaksiyonun özgülüğünü değiştirmeden hızlarını düzenlerler (Ekinci, 2015).

Biyokimyasal katalizör olan enzimlerin kullanılmasının önemli bazı avantajları şu şekilde özetlenebilir;

1. Enzim katalizli tepkimelerde yan ürün oluşmaz, verim %100'e yakın bir orandadır ve tepkime hızı kimyasal katalizörlerle gerçekleştirilen tepkimelere göre daha yüksektir.

2. Enzimler pH 5-8 arasında, oda sıcaklığında ve atmosferik basınçlarda aktivite gösterirler.

3. Enzimler enantiyoseçimlilik, kemoseçimlilik, diastereoseçimlilik gibi seçimlilik gösterirler.

4. Enzimler spesifiktirler. Sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkilidirler. Molekül yapısı yakın olsa bile bunun dışındaki maddelere karşı etkinlik göstermez.

5. Doğal substratlarla sınırlı değildirler ve organik bileşiklere de uygulanabilirler.

Günümüzde yapılan çalışmalarla enzimlerin yapı ve tepkime mekanizmaları aydınlatılmış bu sayede enzimler; gıda, ilaç, kozmetik, tekstil, kâğıt, temizlik ürünleri gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda, üretim amaçlı çeşitli tepkimelerin katalizlenmesinde ve fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinden tıptaki tanı çalışmalarına kadar varan yeni birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (Bailey ve Ollis, 1986).

Enzim konusundaki gelişmeler 1897'de Büchner'in canlı maya hücrelerinden ilk aktif enzimi ekstrakte etmeyi başarması ile başlamıştır. Büchner'in bu çalışmasıyla enzimlerin katalitik aktivitelerini içinde buldukları hücrelere bağlı kalmaksızın değişik ortamlarda da devam ettirebildikleri gösterilmiştir. 1926 yılında Sumner enzimlerin protein yapısına sahip olduğunu ortaya çıkarmış ve ilk enzim saflaştırma olayını sağlamıştır (Geminos ve Greenfield, 1978).

Endüstriyel amaçlı olarak hemen her alanda yaygın olarak kullanılmakta olan enzimler genellikle mikroorganizma kökenlidirler. Bunun başlıca sebepleri arasında; mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin bitki veya hayvansal kökenli enzimlere

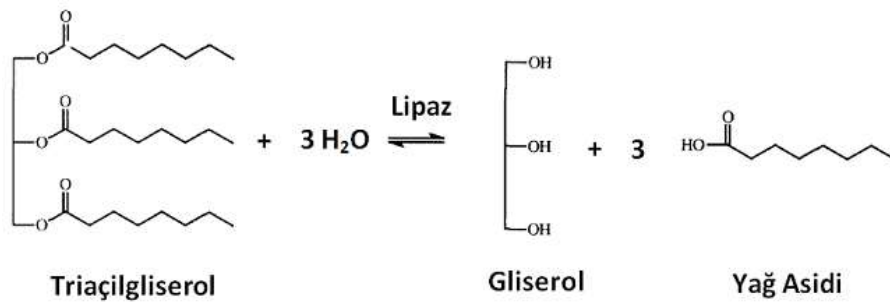
göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, tepkime sırasında istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, sürekli ve fazla miktarda üretilibilmeleri söylenebilir. Enzim üretici mikroorganizmaların seçimi yapılırken sadece enzim üretme yeteneklerine değil, toksik ve patojen olmamalarına da dikkat edilmektedir (Çoban, 2009). Zamanımızda 4000 civarında enzim tanımlanmış ancak bunlardan yaklaşık 200 kadarı endüstriyel amaçlar için kullanılmaktadır (Ekinci, 2015).

Enzimlerin endüstriyel, analitik ve tıbbi alanları için uygulamaları her geçen gün ivme kazanmaktadır. Enzimlerin katalizleme potansiyelleri sadece analitik amaçlar için değil aynı zamanda sentetik amaçlar ve modifikasyonlar için de değerlendirilmektedir. Bu kapsamda başta gıda sektörü olmak üzere, ilaç sanayi, kimya sanayi, deri ve tekstil sanayi gibi birçok sanayi dalında enzimler geniş uygulama alanlarına sahiptirler. Uygun ve yeterli şartların oluşturulması durumunda etkilerini göstermeye devam edebilmeleri enzimlerin doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda kullanılabilmelerine olanak sağlamaktadır. Endüstriyel amaçlı olarak kullanılan enzimlerin yaklaşık % 30-35'i deterjan endüstrisinde, %20-25'i nişasta ile ilgili alanlarda, % 20'si süt ve süt ürünleri endüstrisinde kullanılmaktadır. Enzimlerin; bira, meyve, şarap, unlu mamuller, tekstil, kâğıt, deri ve yem sanayinde kullanılan her alanın yaklaşık % 1-5 arasında bir payı bulunmaktadır (Telefoncu, 1995).

Endüstriyel enzimlerin birçoğu (yaklaşık %75'i) hidrolitik etkiye sahiptir. Hidrolazlar, çok geniş substrat spesifikliğı gösteren bir enzim sınıfıdır. Hidrolazlar peptidleri, amidleri, esterleri ve trigliseritleri hidrolizleyebilirler. Hidrolazların iki büyük sınıfı olan lipazlar (EC 3.1.1.3, triağılglicerol hidrolazlar) ve esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilester hidrolazlar) endüstriyel uygulama potansiyeli yüksek olan önemli biyokatalizörlerdir. Bununla birlikte lipolitik enzimler (lipazlar ve esterazlar), hem hidroliz hem de sentez reaksiyonlarını katalizleyebilmektedirler (Sharma vd., 2001). Endüstriyel enzim pazarında büyük bir paya sahip olan hidrolitik enzimler içinde yer alan lipazlar, endüstriyel uygulamalarda yüksek oranda kullanılmalarıyla karşımıza çıkmaktadırlar (Jaeger vd., 1994; Pandey vd., 1999). Lipazların katalizlediğı reaksiyonlar, metabolik reaksiyonlara benzediğı için kimyasal reaksiyonlara göre daha çevre dostudur denilebilir (Şimşek, 2017).

Lipaz enzimi endüstriyel uygulamalarda; lipid içeren atık suların enzimatik degradasyonunda, organik sentez tepkimelerinde, deterjan sanayinde, tekstil sanayinde, biyosüpfaktanların sentezinde, kağıt üretiminde, farmasötiklerde, agrokimyasal (tarım kimyası) endüstride, pestisitlerde, gıda endüstrisinde, süt endüstrisinde, kozmetiklerde, oleokimyasal endüstride, deri endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Jaeger vd., 1994; Gunstone, 1999; Pandey vd., 1999; Sharma vd., 2001; Gupta vd., 2004).

Lipazlar veya diğer adıyla triaçilgliserol açilhidrolazlar (E.C. 3.1.1.3) fiziksel ve endüstriyel açıdan önemli olan uzun zincirli triaçilgliseritlerin (10 C'lu <) sulu fazla organik faz arayüzünde; diaçilgliseritlere, monoaçilgliseritlere, gliserol ve yağ asitlere parçalanmasını katalizleyen ve birçok ortamda bulunan enzimlerdir (Brockman vd., 1988 ; Verger, 1997; Thomson vd., 1999). Lipazların düşük su konsantrasyonlarında hem ester sentezi hem de transesterifikasyon reaksiyonu katalizleyebilirler. Yani günümüzde lipazların tersinir bir özelliği de olduğu çok iyi bilinmektedir (Saxena vd., 1999; Gupta vd., 2004) (Şekil 1).



Şekil 1. Lipazların katalitik etkisi. Bir trigliseridin, gliserole ve yağ asitlerine hidroliz edilmesi veya tersinir reaksiyon ile gliserol ve yağ asitlerinden trigliseritler sentezlenmesi (Jaeger ve Reetz, 1998).

Lipazların misel, küçük kümeler veya emülsiyon halindeki çözünmeyen uzun zincirli yağ asidi esterlerinin hidrolizini katalizleme kabiliyetleri onları diğer çözünmeyen esterlere tercihen çözünür esterlerin hidrolizini katalizleyen esterazlardan ayırır (Macrae, 1983). Lipazlar doğal substratlarının yanısıra enantiyo ve bölgesel seçici olarak büyük oranda doğal olan ve olmayan esterlerin sentezini de katalizleyebilirler (Schmidt-Dannert, 1999). Lipazlar triaçil gliserol molekülüne gelişigüzel veya pozisyona bağlı olarak etki edebilmektedirler (Marangoni ve Rousseau, 1995). Spesifik olmayan lipazlar triaçilgliserollerini bütün pozisyonlarda sınırlı sayıda katalizlerler.

Bunun yanısıra, bölgesel seçici lipazlar (örneğin 1,3-spesifik lipazlar) endüstri uygulamalarında örneğin yapısal yağların üretiminde tek fonksiyonel özelliği sayesinde büyük bir öneme sahip olmaktadır (Sonnet ve Gazzillo, 1991). Bölgesel seçici lipazlar kimya, ilaç, kozmetik ve deri endüstrisinde büyük öneme sahiptirler (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 (Shen vd., 2000; Kim vd., 2002; Qian ve Xu, 2004). Örneğin lipazlar; antikanser ve diğer kemoterapik ajanlar için kullanılan kiral ara maddelerin sentezinde kullanılmışlardır (Patel vd., 1996).

Lipazlar sadece sulu ortamlarda değil susuz organik çözücülerde de aktivite göstermektedirler. Bu özellikleri lipazların daha çok organik sentez tepkimelerinde biyokatalizör olarak kullanılmasına imkân sağlamaktadır. Lipazları göstermiş olduğu normal hidrolitik etki, organik ortama az miktarda su eklenerek kontrol altına alınıp, esterleşme ve interesterleşme tepkimelerinde etkili bir biyokatalizör olarak kullanılmaktadır (Klibanov, 1990; Margolin, 1993; Vulfson, 1994).

Lipazlar, geniş bir substrat spektrumuna sahip olup, ekstrem sıcaklık ve pH şartlarında etkinlik gösterebilme, organik çözücülere karşı yüksek kararlılık sergileyebilmesinden dolayı önemli biyokatalizörler arasında yer alırlar. Termofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar mezofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazlara göre daha yüksek termal kararlılığa sahiptirler (Nawani ve Kaur 2000). Bu nedenle termofilik bakterilerden enzim izolasyonuna, karakterizasyonuna ilgi gün geçtikçe giderek artmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan çalışma materyali yeni bir termofilik bakteri olan *Geobacillus Stearothermophilus* Ah22 Suşu Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından Erzurum Ilıca İlçe'sindeki kaplıçalardan izole edilmiştir. Ayrıca bu bakteriden elde edilen hücre içi lipaz kısmen saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Adıgüzel vd., 2009). Ancak bu hücrenin membrana bağlı hücre dışı lipaz da ürettiği belirlenmiş ve çalışmada bu lipazın üretilmesinin artırılması ve karakterize edilmesi hedeflenmiştir. Bununla birlikte

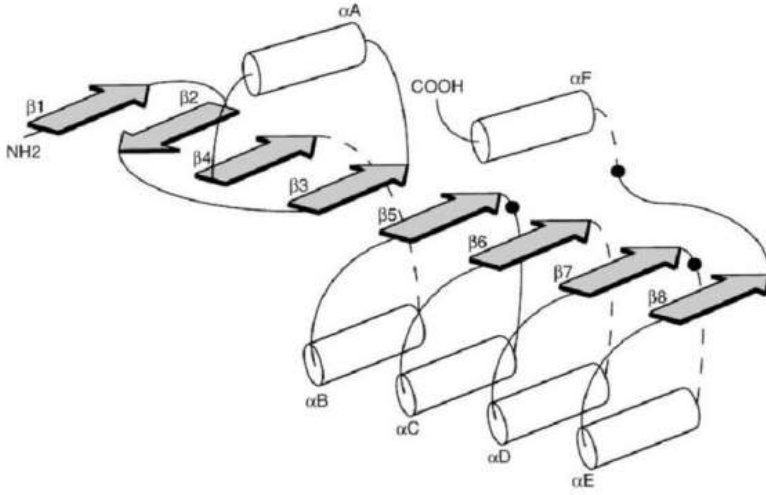
lipazın kullanıldığı endüstri alanlarına, saflaştırma ve immobilizasyon işlemlerine gerek kalmadan alternatif, ucuz ve pratik kullanıma sahip, termofilik enzim kaynağı oluşturulması amaçlanmıştır.

1.2. Lipazlar ve Özellikleri

Lipazlar, ilk olarak 1834'de Eberle ve 1856'da Bernard tarafından pankreastan elde edilmiş olup amilaz ve proteaz enzimleri ile birlikte, bilinen ilk üç ana sindirim enziminden biri olmuştur (Hou, 2002). Lipazlar, enzim sınıflandırma sisteminde sırasıyla hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) ve triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar.

Lipazlar (E.C. 3.1.1.3), çeşitli ökaryotik hücreler de dahil olmak üzere pek çok farklı mikroorganizma tarafından üretilen ve α/β hidrolaz süper ailesinin, uzun zincirli açilgliserol sentez ve hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen, karboksil ester hidrolazlardır. Lipazların molekül boyutları tiplerine göre değişiklik göstermekle birlikte, 19,4 kDa kadar küçük boyutlu lipazların bulunduğu ve ayrıca her bir alt birimi yaklaşık 50 kDa olan 300 kDa'dan daha büyük oligomerik yapıya sahip lipazların bulunabileceği çeşitli araştırmalar sonucunda raporlanmıştır (Kawasaki vd., 2002). Günümüzde 8 lipaz enzim sınıfı tanımlanmış olup (Arpigny ve Jaeger, 1999). 60'tan fazla bakteriyel lipaz geni klonlanmış ve sekanslanmıştır (Jaeger vd., 1999).

Lipazların primer dizilerdeki amino asit sayılarında farklılık olsa da bütün lipazların ortak özelliği aktif bölgede serin, aspartat, glutamat ve histidin amino asitleri bulundurmasıdır. Tüm lipaz enzimlerinin üç boyutlu yapıları incelendiğinde benzer bir yapı ile karşılaşılmaktadır. Karşılaşılan bu yapı lipazlarda birbirine paralel sekiz β - sheet ve bunları çevreleyen α -heliksler bulunmasıdır (Schmid ve Verger, 1998) (Şekil 2).



Şekil 2. Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi (Silindirler α -sarmalları, oklar β -yaprakları simgelemektedir. Aktif bölge kalıntıları ise (Ser, Asp/Glu, His) siyah yuvarlaklar halinde gösterilmiştir.

Lipazlar lipit-su ara yüzeyinde aktif olup (Jensen vd., 1983; Zheng vd., 2011), suda çözünmeyen uzun zincirli trigliseritlere karşı maksimum aktive göstermektedirler (Dröge, 2004) ve bunlar esterazlardan, sulu solüsyonlardaki suda çözünmeyen lipidik substratlar tarafından oluşturulan ara yüzeydeki keskin aktivasyonları ile ayırt edilmektedirler (Jaeger ve Eggert, 2002).

Lipazlar, doğal olarak triaçilgliserollerin ester bağlarını parçalayan hidrolitik aktiviteye sahip olsalar da, suyun az bulunduğu ortamlarda ester sentezini de katalizleyebilmektedirler (Balcão vd., 1996). Karışımındaki su miktarı ayarlanarak, lipazın katalizleme reaksiyonunun yönünde belirlenebilmektedir (Sharma vd., 2001). Suyun çok az olması veya hiç bulunmaması halinde esterifikasyon ve transesterifikasyon tepkimeleri tercih edilmektedir (Jennings ve Akoh, 2000; Adlercreutz vd., 2002). Su miktarının fazla olduğu durumlarda ise sadece hidroliz reaksiyonu meydana gelmektedir (Klibanov, 1997). Lipazlar, hem sulu hem de susuz solvent sistemlerinde aktivite gösterdikleri için (Wang vd., 2001; Nie vd., 2006) endüstride ve tıptaki uygulamalarda önemli bir yer edinmişlerdir (Bjorkling vd., 1991).

Lipazları diğer hidrolaz ve özellikle de esterazlardan ayırtedebilen değişik bir özellikleri vardır. Genellikle esterazlar Michaelis–Menten kinetiği gösterir ve çözünür substratlarla tepkimeye girerler (kısa zincirli yağasitlerine sahip triaçilgliseroller; triasetin gibi). Çözünmeyen gliseritlerde (uzun zincirli yağ asitlerine sahip

triaçilgliseroller; trilaurin gibi) ise daha düşük aktivite gösterirler. Çözünmüş monomerin maksimum konsantrasyonu olarak ifade edilen doygunluk noktasından önce lipaz enzimi maksimum reaksiyon oranına ulaşılır (Salameh ve Wiegel, 2007).

Bunun aksine gerçek lipazlar su-yağ arayüzeyinde aktive edilir. Substrat monomerik formda iken az aktivite gösterirler, aktiviteleri lipitlerin emülsiyonlar oluşturmaya başladığı doygunluk limitinin üzerinde aktiviteleri belirgin şekilde artar. Bu etki arayüzey aktivasyonu olarak bilinen kavramdır ve lipolitik reaksiyonun meydana gelmesi için emülsiyonların gerekliliğini açıklar. Bu durum, lipazların uzun zincirli açilgliseroller ile lineer olmayan enzim kinetiğini yani non-Michaelis–Menten kinetiği karakterini gösterdiği şeklinde açıklanabilir (Salameh ve Wiegel, 2007).

Lipazları günümüzde kullanılabilir ve çekici kılan bazı özellikleri göze çarpmaktadır. Bu özelliklerden birisi; öncelikle mükemmel bir kimyasal, bölgesel ve çift yönlü seçicilik göstermeleridir. İkinci olarak fungi ve bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından yüksek verimlerle üretilebildiğinden büyük miktarlarda kullanılabilir olmalarıdır. Üçüncü olarak ise, çoğu lipazın kristal yapıları bilimsel araştırmalarla anlaşılmiş olup mühendislik stratejilerinin tasarımını oldukça kolaylaştırmaları olarak söylenebilir. Tüm söylenen bu özellikler, organik kimya sektöründe en çok kullanılan biyokatalizör olarak lipazların seçilmesinin nedenidir (Kamini vd., 2000).

1.3. Bakteriyel Lipazların Literatürde Yer Alan Özellikleri

1.3.1. pH ve Sıcaklık Özellikleri

Genellikle bakteriyel kökenli lipazlar en iyi aktivitelerini nötral pH'da, (Dharmstithi ve Luchai, 1999; Lee vd., 1999) veya alkali pH'da (Kanwar ve Goswami, 2002a; Yoo vd., 2011) göstermekle birlikte asidik pH'larda da maksimum aktivite gösterebilen çeşitli lipaz enzimleride bulunmaktadır (Andersson vd., 1979; Kandasamy vd., 2010; Ramani vd., 2010). Bakteriyel lipazlar pH 4.0-11.0'in üzerindeki geniş pH değerlerinde karalılığa sahiptirler (Kojima vd., 1994; Wang vd., 1995; Khyami- Horani, 1996; Dong vd., 1999; Sharma vd., 2011).

Bakteriyel kökenli lipazların optimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklar genellikle 30-60°C aralığındadır (Kanwar vd., 2002b; Kandasamy vd., 2010; Sharma vd., 2011). Ancak bu değerlerin altında (Cai vd., 2009; Sharma vd., 2011) veya üstünde de (Castro-Ochoa vd., 2005; Horchani vd., 2009; Wang vd., 2009; Sharma vd., 2011) optimum sıcaklığı olan bakteriyel lipazlar bulunmaktadır. Yüksek termotolerant lipaz 100°C'de 15-25 dakika yarılanma ömrü ile *Bacillus stearotherophilus*'da kaydedilmiştir (Bradoo vd., 1999; Guncheva ve Zhiryakova, 2011). *Bacillus* sp. A30-1 75°C'de aktivitesinin %50'sini 8 saat boyunca muhafaza etmiştir (Wang vd., 1995, Guncheva ve Zhiryakova, 2011). *Geobacillus stearotherophilus* MC7 ve *Geobacillus thermoleovorans* ID1 için 75 °C'de aktiftir ve 70 °C'de 30 dk. sonunda aktivitesinin yarısını koruyabilmektedir (Lee vd. 1999; Kamburova vd., 2003; Guncheva ve Zhiryakova, 2011). Termofilik *Bacillus* sp. enzimi ise optimal aktiviteyi 60 °C'de (Nawani vd., 2006a), *Pseudomonas* sp. 90°C (Rathi vd., 2000) ve *P. Aeruginosa* 70 °C'de göstermiştir (Karadzic vd., 2006). Bunlara ek olarak bir çok *Pseudomonas* ve *Bacillus* türünden termostabil lipaz enzimi izole edilmiş ve çalışmalarda kullanılmıştır (Nawani ve Kaur, 2000; Kumar vd., 2005; Ahmed vd., 2009; Dutta ve Ray, 2009). Termal stabilite lipazlar için istenen bir karakteristiktir özelliğidir (Janssen vd., 1994). Sıcaklığın her 10°C artması durumunda tepkime hızı yaklaşık iki katına çıkmaktadır ve yüksek sıcaklıklarda stabil olduğu bilinen bir enzim ile çalışmanın yüksek sıcaklıklarda üretilebilmesi tepkimenin verimliliğini arttıracaktır. Bu nedenle termal stabilite lipazlar için aranan bir özelliğidir (Sharma vd., 2001).

1.3.2. Organik Çözücülerde Kararlılığı

Sentez tepkimelerinde organik çözügen kararlılığı istenen ve aranan bir özelliğidir. Az sayıdaki stimülasyon veya inhibisyon haricinde lipazlar genellikle organik çözügenlerde kararlılık göstermektedirler. *P. Aeruginosa* YS-7 lipazı için aseton ve *Bacillus* sp. Lipazı için hekzan inhibitor iken, aseton, etanol ve metanol *B. Thermocatenulatus* lipazının aktivitesini arttırmaktadır. *A. Calcoaceticus* LP009 lipazı çeşitli organik çözügen sistemlerinde yüksek oranda kararlıdır (Gupta vd., 2004).

Endüstriyel amaçlı olarak kullanılan birçok tepkime organik solvent varlığında gerçekleşmektedir. Bu durumda enzimatik katalizli tepkimelerde organik solvent kararlılığı oldukça önemli bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Bundan dolayı son

zamanlarda yapılan enzim karakterizasyon çalışmalarda organik solvent kararlılığında yaygın olarak çalışılmaya başlanmıştır (Castro-Ochoa vd., 2005; Rahman vd., 2005; Cadirci ve Yasa, 2009; Dandavate vd., 2009; Wang vd., 2009). Genellikle enzimler, organik solventlerde kararlı değildirler ve denatüre olma eğilimindedirler (Schmid ve Verger, 1998; Sharma vd., 2001). Ancak lipazlar organik solventlerde bir stabilizer olmadan aktiftir ve stabil kalırlar (Schmid ve Verger, 1998; Gupta vd., 2004). Lipazlar organik solventlerin varlığında çalışırken tepkimenin yönünü değiştirebilir ya da farklı açilgliseroller, alkoller, esterler, glikozidler, aminler ve hatta bazı bileşenlerin farklı kimyasal grupları arasındaki açil gruplarıyla da yer değiştirebilmektedirler (Pandey vd., 1999; Schmidt-Dannert, 1999; Gupta vd., 2004).

Lipazların organik solventlere karşı davranışları enzimin ve solventin polaritesine bağlı olarak değişir. Yapılan çalışmalarda polar solventlerin apolar solventlere göre enzim kararlılığına etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür (Ahmed vd., 2010; Sangeetha vd., 2011). Organik solventlerin enzim aktivitesine etkisinin ise tamamen inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiği söylenebilir (Schmidt ve Dannert, 1996; Quyen vd., 2003; Castro-Ochoa vd., 2005; Guncheva ve Zhiryakova, 2011). Organik solvent kararlılığı sentez tepkimelerinde istenen bir durumdur (Gupta vd., 2004). Organik solvent etolerant lipazlar biyopolimerlerin oluşturulması, transesterifikasyon reaksiyonlarında ve biyodizel üretiminde etkileyici bir katalist olarak rol oynamaktadır (Singh ve Banerjee, 2007; Dizge vd., 2009; Sangeetha vd., 2011).

1.3.3. Metal İyonlarının Etki Özelliği

Genellikle lipazlar aktivite göstermek için bir kofaktörlere ihtiyaç duyulmaktadır, fakat kalsiyum gibi divalent katyonlar enzim aktivitesini teşvik edebilirler.

Mikrobiyal organizmalardan üretilmiş lipazlar üzerine metal iyonlarının hem aktivatör hem de inhibitör olarak etki gösterdikleri gözlenmiştir. Özellikle Ca^{2+} iyonu lipazın yapı ve fonksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır ve bazıları tamamen kalsiyuma bağımlıdır. Ca^{2+} iyonları enzimi aktive ederken Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} iyonları ise inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmektedir. Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} ve Na^{+}

tuzlarının ise az bir inhibisyon etkisi gösterirler (El Khattabi vd., 2003; Kumar ve Kanwar, 2011).

1.3.4. Lipaz İnhibitörleri

Lipaz inhibitörleri lipazların yapısal ve mekaniksel özelliklerinin çalışılmasında kullanılmışlardır. Lipaz inhibitörleri obezitive, akne problemlerinin tedavisinde etkili olacak ilaçların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bu yönde lipaz inhibitörler çalışmaları farmolojik açıdan ilgi çekici bir durumdadır.

Enzim inhibitörleri genel olarak tersinir veya tersinir olmayan olarak sınıflandırılmıştır. Tersinir inhibitörler ise spesifik ve spesifik-olmayan inhibitörler olarak ayrılmaktadır (Gupta vd., 2004). Aktif bölge üzerine doğrudan etki etmeyen ancak lipazın konformasyonel yapısı ya da yüzeyler arası özelliklerini değiştirerek lipaz aktivitesini inhibe eden maddelere spesifik olmayan inhibitörler adı verilir. Ancak bu grupta bulunan sürfaktanlar ve safra tuzları bazı durumlarda enzimi aktive de etmektedirler (Gupta vd., 2004). Enzimin aktif bölgesi ile doğrudan etkileşime giren maddelere ise spesifik inhibitörler adı verilir. Bu inhibitörler hem geri dönüşümlü hem de geri dönüşümsüz olarak çalışabilmektedirler. Geri dönüşümsüz olarak çalışan inhibitörler aktif merkez çevresindeki aminoasitlerle etkileşime girerek katalitik aktiviteyi inhibe etmektedirler (Gupta vd., 2004). Lipazlar Serin- Histidin- Aspartik asit/Glutamik asit katalitik üçlüsü ile serin hidrolazlar grubuna dâhildirler. Bu nedenle, fenilmetilsulfonil florit (PMSF), fenilboronik asit, dietil p-nitrofenil fosfat gibi serin inhibitörleri potansiyel olarak geri dönüşümsüz olarak etki eden aktif merkez lipaz inhibitörleridir (Gupta vd., 2004). EDTA (Etilen diamin tetra-asetik asit)'nın bazı lipaz aktivitesini etkilemediği (Gilbert vd., 1991; Sugihara vd., 1992; Kojima vd., 1994; Abramic vd., 1999; Nthangeni vd., 2001; Sharma vd., 2002; Ruiz vd., 2003, Ruiz vd., 2004; Rahman vd., 2005; Singh ve Banerjee, 2007; Guncheva ve Zhiryakova, 2011), bazı lipazların aktivitesini de inhibe ettiği rapor edilmiştir (Van Oort vd., 1989; Lee ve Rhee, 1993; Baral ve Fox, 1997; Nawani vd., 2006a; Sharon vd., 1998; Dharmstithi ve Luchai, 1999; Nawani vd., 2000; Snellman vd., 2002; Jinwal vd., 2003; Kojima ve Shimizu, 2003; Castro-Ochoa vd., 2005; Kanwar vd., 2006; Takac vd., 2008; Zhang vd., 2008; Zhao vd., 2008; Sabri vd., 2009; Guncheva ve Zhiryakova, 2011). Sulu

solüsyonlardaki enzim- sürfaktan etkileşimi ilaç, kozmetik ve deterjan, membran proteinleri ve lipitleri arasındaki etkileşim ile ilgili çalışmalar gibi teknik uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Savelli vd., 2000) ve bu iki komponentin birbiri ile uyumlu olma mecburiyeti vardır (Polizelli vd., 2008). Potansiyel enzimin (lipaz, proteaz, amilaz ve selülaz gibi) çamaşır deterjan katkısı olarak kullanılması düşünüldüğünde, enzimin sıcaklıkta ve/veya sürfaktan varlığındaki kararlılığı önemli bir hale gelmektedir (Malmos, 1990). Sürfaktanların lipid-su ara yüzeyini arttırarak, substrat çözünürlüğünü arttırıcı etkileri vardır ve enzimin açık konformasyonunu kararlı tutarak agregat oluşumunu engellemektedirler (Guncheva ve Zhiryakova, 2011). Bu nedenle sürfaktanın yoğunluğuna bağlı olarak lipolitik aktivitede değişiklik gösterebilmektedir. Tween 80'in %1'lik konsantrasyonu *Bacillus pumilus*'un aktivitesinde inhibisyona neden olurken %0.5'lik konsantrasyonu aktiviteyi arttırmaktadır (Sangeetha vd., 2011). Triton X-100 ve Tweenenzim aktivitesini arttırırken SDS'in reaksiyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Lianghua ve Liming, 2005; Sangeetha vd., 2011).

1.4. Lipaz Katalizli Reaksiyonlar ve Tepkime Mekanizmaları

Lipazlar hidroliz, interesterifikasyon, esterifikasyon, asidoliz ve aminoliz gibi çeşitli biyodönüşüm reaksiyonlarını gerçekleştiren çok amaçlı biyolojik katalizörlerdir. İlaç, pestisit, kozmetik, gıda, biyosensörler ve deterjan sanayi gibi birçok alanda lipaz enzimi kullanılmaktadır (Bassegoda vd., 2012). Lipazlar, hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizlerler (Tablo 1). Transesterleşme tepkimeleri, esterdeki açıl grubu değişimi, bir asit ile yapılıyorsa asidoliz, alkol kullanılıyorsa alkoliz, bir başka ester kullanılıyorsa interesterleşme ve bir amin kullanılıyorsa aminoliz adını alır (Kösali, 2005).

Tablo 1. Lipaz Reaksiyonları.

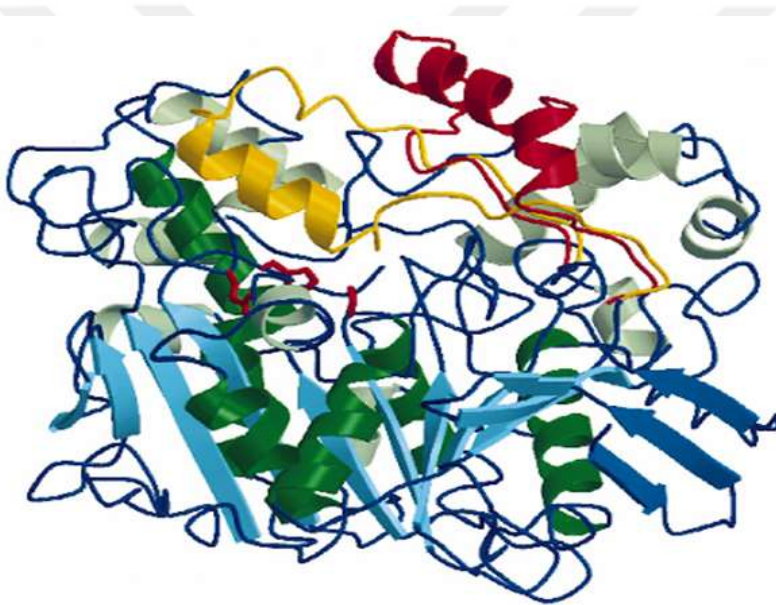
Reaksiyon Türü	Reaktanlar	Ürün
Hidroliz	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_2 + H_2O$	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OH + R_2-OH$
Ester sentezi	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OH + R_2-OH$	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_2 + H_2O$
Asidoliz	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_2 + R_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OH$	$R_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_2 + R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OH$
İnteresterifikasyon	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_2 + R_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_4$	$R_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_2 + R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_4$
Alkoliz	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_2 + R_3-OH$	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_3 + R_2-OH$
Aminoliz	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-OR_2 + R_3-NH_2$	$R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-NHR_3 + R_2-OH$

Lipazlar için hidroliz kavramı, bir yağ veya esterin suyun varlığında kendini oluşturan asit ve gliserol veya alkole ayrılmasını ifade eder. Yağların geleneksel kimyasal yöntemlerle parçalanması yüksek sıcaklık ve basınçta gerçekleşmektedir. Enzim kökenli yöntemlerin kimyasal tepkimelerle karşılaştırılmasında, maliyetin daha az olduğu, oluşan ürünlerin daha iyi koku ve renge sahip oldukları görülür. Ayrıca enzimatik yöntemlerde reaksiyon şartları daha ılımlı, çalışma riski ve enerji tüketimi daha azdır ve istenmeyen yan ürün oluşumu gerçekleşmez.

Lipazların sahip olduğu geri dönüşümlü sentez tepkimelerini katalizleme yetenekleri istenilen bazı ürünlerin üretimini sağlamaktadır. Esterifikasyon, su ve ester oluşumuna yol açarken, alkolizis, asidolizis ve interesterifikasyon gibi transesterifikasyon işlemleri sırasında su yerine alkol, asit veya ester oluşumu gerçekleşir. Bu nedenle, bu oluşan ürünlerden herhangi biri istenilen bir ürün ise, transesterifikasyon reaksiyonları esterifikasyona göre daha karlı bir işlem haline gelmiş olur. Esterifikasyon temel olarak bir asitin alkolle tepkimesini içerirken, lipazlar çok daha geniş bir substrat spektrumu gösterirler. Bu da lipazlara şeker esterleri, tiyol

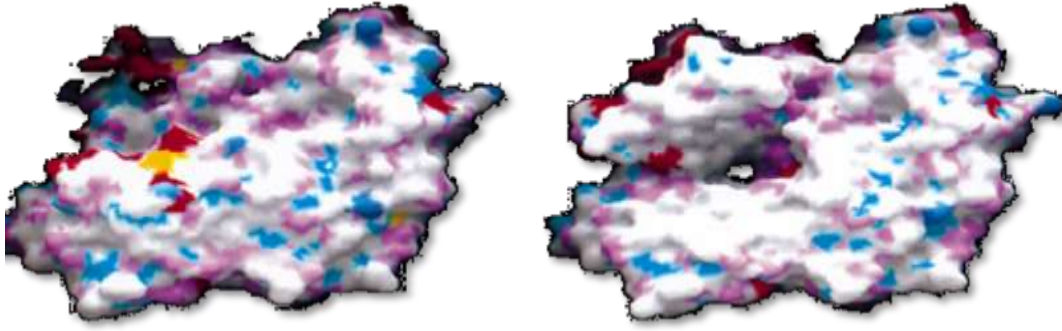
esterleri, peptitler, yağ amidleri gibi ürünlerin sentezlerini katalizleme olanağı sağlar. Bu durumun sonucu olarak, lipazlar potansiyel uygulamalar için bilinen diğer enzimlerden çok daha önemli bir yere sahiptirler (Gandhi, 1997).

Yapılan çalışmalar sonucunda tüm lipazların α/β -hidrolaz katlanması (merkezde her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β -düzlemi), Ser-His-Asp/Glu katalitik üçlüsünden oluşan bir aktif konum, bir oksianyon boşluğu (substratın karbonil grupları üzerindeki oksianyonların gelişiminin dengede tutulmasını sağlar) ve pek çok durumda aktif konumu kapatan α -heliksten oluşan bir kapak içerdikleri belirlenmiştir (Jaeger ve Reetz 1998) (Şekil 3).



Şekil 3. Açık ve kapalı kısımların da eklendiği *Candida rugosa* lipazının üç boyutlu yapısı. Açık mavi; merkezde her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β -düzlemini, koyu yeşil; merkez β -düzlemini kaplayan heliksleri, sarı; kapalı konformasyonu, kırmızı; açık konformasyonu göstermektedir.

Lipazların açık ve kapalı form olmak üzere iki farklı durumu sözkonusudur (Cygler ve Schrag 1999). Bu durumlardan; aktif konumdaki katalitik üçlüyü kaplayan yapısal elementlerin (α -heliks) olduğu yapı aktif olmayan form, diğeri ise ara yüzey aktivasyonu sırasında bu kapağın açılması ile ara yüzey alanını artmasını sağlayarak aktif konumun daha fazla substrat almak için düzenlendiği yapı; aktif formdur (Şekil 4).



Şekil 4. *Candida rugosa* lipazının açık ve kapalı formları a. Kapalı form b. Açık form (Cygler ve Schrag, 1999).

α / β –hidrolazların sekonder yapıları incelendiğinde 5-6 kadar alfa –sarmal ve 8 kadar da beta- tabaka yapısından oluştuğu görülür. Ayrıca aktif bölgede bulunan katalitik üçlünün(Ser-His-Asp/Glu) hidrofobik aminoasitlerce (Phe, Trp ile Leu ve Try gibi) zengin, 1 veya 2 alfa- sarmal yapı da polipeptid zincirinden ibaret, bir kapakla çevrelendiği de bilinmektedir (Jaeger ve Reetz,1998). Bu hidrofobik birimlerin çoğu lipazların lipid-su ara yüzeyine tutunabilmesinde etkili olurlar ve böylece lipid yüzeyinin hidrofobik kısmına enzimin etki etmesini sağlarlar (Jaeger ve Reetz,1998). Bir aktivasyon olduğunda enzimin kapağı kapalı formdan açık forma dönüşür ve böylece aktif bölge substratın etkileşebileceği bir hale gelir. Bu aktivasyon işlemi sırasında katalitik serin birimi üzerinde açıl gruplarının ulaşabilmesi için uzanmış bir cep şeklinde hidrofobik bir yarık oluşur. Birçok lipazda kapağın hareketiyle ayrıca bir oksianyon boşluk oluşmaktadır. Bu boşluk substrata yapılacak nükleofilik saldırı sırasında oluşan negatif yükleri kararlı kılan elektrofilik bir çevre sağlar (Jaeger ve Reetz, 1998). Genel olarak, α / β -hidrolaz enzim ailesi esterazları tipik serin hidrolaz mekanizmasını kullanırlar, bu serin proteazların mekanizmasına benzerdir. Ester hidrolizi ve oluşumu reaksiyonları esterazlar için benzerdir ve dört adımdan oluşur (Jaeger ve Reetz, 1998) (Şekil 5).

1- İlk basamakta aktif bölgedeki serin biriminin substratın karbonil karbonuna nükleofilik saldırısıyla tetrahedral bir ara ürün oluşur. Bu ara ürün histidin ve asparagin aminoasitleri tarafından kararlı kılınır.

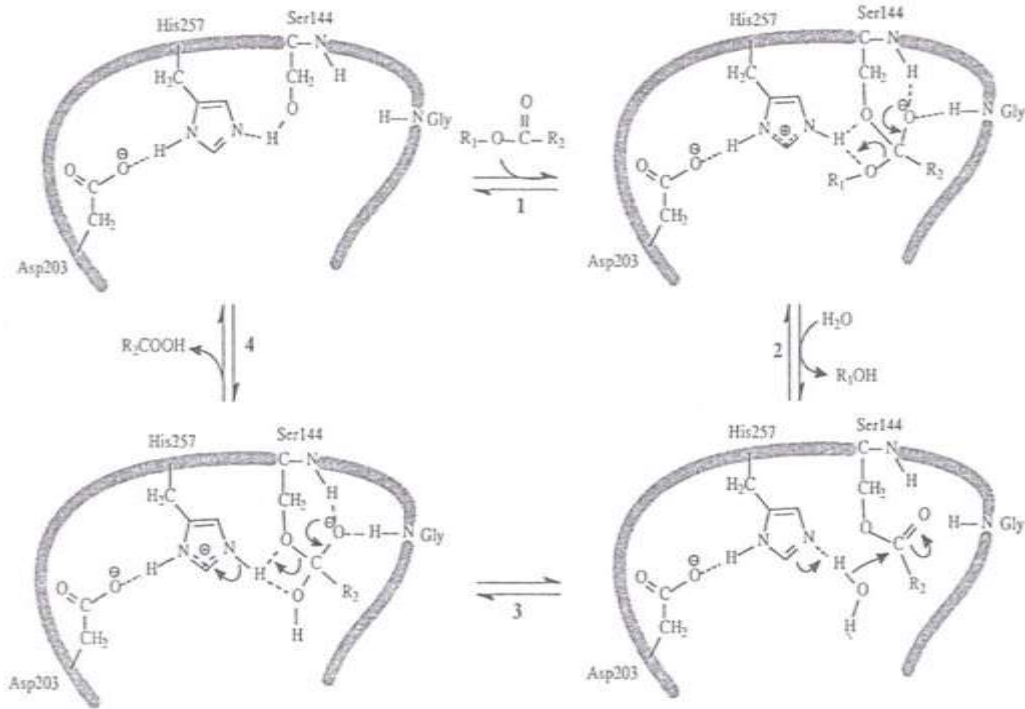
2- İkinci adımda alkol salınır ve açıl-enzim kompleksi oluşur.

3- Yine bir nükleofilin saldırısı ile (hidroliz reaksiyonlarında su molekülü ve

transesterifikasyon/esterifikasyon reaksiyonlarında bir alkol ya da ester) açıl-enzim kompleksi hidrolizlenerek ikinci bir tetrahedral ara ürün oluşur.

4- Son olarak bir asit ya da esterin ayrılması ile enzim yeniden elde edilir.

Her iki tetrahedral ara ürün bir oksiyona sahip olup bu oksiyon, oksiyon boşluğundaki protein atomlarının hidrojen bağı kapasitesi ile kararlı kılınır.



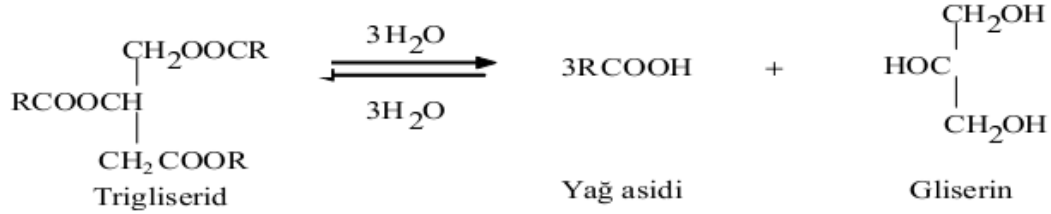
Şekil 5. Bir lipaz reaksiyonunun basitleştirilmiş katalitik mekanizması.

1.5. Lipazların Katalitik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

1.5.1. Spesifik Olmayan Lipazlar

Spesifik olmayan lipazlar trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açıl gruplarını koparabilme yeteneğine sahiptirler. Bu tepkimenin sonucunda trigliserid gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalanır (Şekil 6). Tepkimedeki ara ürün olarak diaçil ve monoaçilgliserinler oluşur. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*,

Staphylococcus aureus, *Choromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girer (Erdoğan, 2003; Telefoncu, 1995).



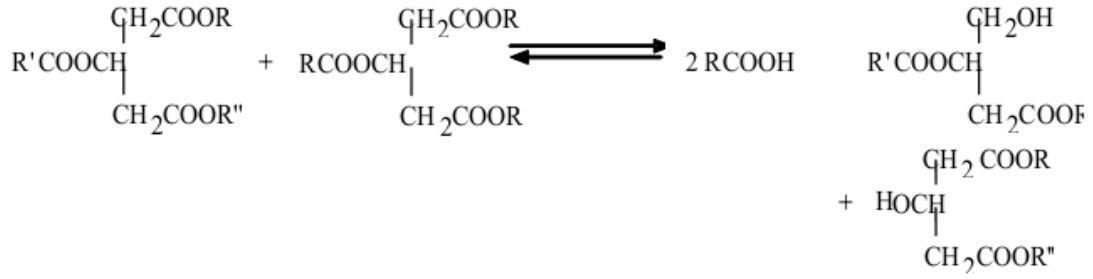
Şekil 6. Spesifik olmayan lipazların katalizlediği hidroliz reaksiyonu.

1.5.2. 1,3-Spesifik Lipazlar

Bu gruptaki lipazlar nötral yağları eşdeđer konumda olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Tepkime sonunda triačilgliserinlerden yağ asitleri, 1,2 (2,3) diačilgliserinler ve 2-monoačilgliserinler oluşur. 1,2 (2,3) diačilgliserinler ve özellikle 2-monoačilgliserinler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diačilgliserinlere ve 1(3)-monoačilgliserinlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılır ve 1,3 spesifik lipazlar da spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseridleri serbest yağ asitleri ve gliserine kadar parçalarlar (Erdođan, 2003; Telefoncu, 1995). Domuz pankreas lipazı, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *R. Japonicus*, *R. arrhizus* ve *Mucor javanicus* lipazları 1,3 spesifik lipazlara örnek olarak verilebilir (Iwai ve Tsujisaka, 1984).

1.5.3. Yağ Asidine Özgün Lipazlar

Bu gruba ait lipaz türleri ačilgliserinlerdeki bazı yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar. Şekil 7’de yağ asidi spesifik lipzların hidroliz reaksiyonu görölmektedir.



Şekil 7. Yağ asidi spesifik lipazların katalizlediği reaksiyon.

1.6. Lipazların Uygulama Alanları

Endüstriyel enzimlerin çoğu mikrobiyal kökenlidir. Bakteriyel ve fungal kökenden elde edilen lipazlar çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda geniş bir çapta bir uygulama alanı bulmaktadırlar. Lipazlar, stereospesifiklik ve substrat seçimliliği gibi özelliklerinden dolayı kaliteli ürün üretmesi, düşük aktivasyon enerjisine ihtiyaç duymalarından, düşük ısı ve pH'larda reaksiyon verdikleri için reaksiyonda ihtiyaç duyulan enerjinin azalması ve reaksiyon ürünlerinin ortamın ısısından dolayı görecekleri zararın azalması (Seren, 2013) gibi daha birçok özelliği sayesinde günümüzde organik kimyacılar, eczacılar, biyofizikçiler, biyokimyacılar, biyomühendisler, biyoteknologlar ve mikrobiyologlar tarafından tercih edilen (Çakar, 2016) ve çeşitli uygulamaları olan önemli biyokatalizörlerdir. Lipazlar endüstriyel enzim pazarında % 5'lik bir pay sahip olsada biyoteknolojide önemli enzimler olarak ilgi çekmektedirler. Gıda, deterjan ve ilaç endüstrilerinde lipazlar yaşamsal roller oynamaktadır (Sangeetha vd., 2011). Endüstriyel uygulamalarda lipazlara gösterilen ilgi; organik solventlerde doğal ve yapay bileşiklerin kullanılmasıyla hidroliz, sentez ve açil değişimi yapabilmeleri ve bunun gibi farklı tepkimeleri katalizleyebilme özellikleri nedeniyle çok yönlü biyokatalizör olmaları (Bornscheuer, 2002; Gupta vd., 2004), kimyasal seçicilik (kemoselektivite), bölgesel seçicilik (regiyoselektivite), izomer seçicilik (stereoselektivite = enantioselektivite) gibi özelliklere sahip olmaları (Gunstone, 1999; Villeneuve vd., 2000; Sharma vd., 2001; Jaeger ve Eggert, 2002; Snellman vd., 2002), organik solventlerde (Schmid ve Verger, 1998; Sharma vd., 2001; Hasan vd., 2006) ve geniş pH ve sıcaklıklarda aktif ve kararlı olabilmeleri (Schmidt ve Dannert, 1999; Gupta vd., 2004), yapı ve fonksiyonlarının iyi bilinmesi ve yeni kullanımlar için modifiye edilebilmeleri (Schmidt ve Dannert, 1999; Jaeger ve Eggert,

2002), ılımlı koşullar altında işgördüklerinden ve düşük enerji ve az ekipman gerektirdiklerinden kullanım maliyetlerinin düşük olması ve daha az kirliliğe yol açmaları (Gunstone, 1999; Pandey vd., 1999; Jaeger ve Eggert, 2002), mikroorganizmalardan yüksek miktarda üretilebilmeleri, pek çok lipazın kristal yapısının aydınlatılmış olması ve son olarak lipazların genellikle kofaktöre ihtiyaç duymamalarından (Patkar ve Björkling, 1994; Jaeger ve Eggert, 2002; Ghanem ve Aboul-Enein, 2004; Gupta vd., 2004; Singh ve Banerjee, 2007) kaynaklanmaktadır. Bu özellikler, lipazları organik kimyada kullanılan en yaygın biyokatalizör grup yapmaktadır (Sugihara vd., 1992). Enzimlere ait endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilmektedir (Telefoncu, 1986). Enzimolojinin gelişimiyle susuz ortamlardaki lipaz uygulama alanları da büyük ölçüde artmıştır. Geçtiğimiz yıllarda lipazlar organik sentez, yağ modifikasyonu ve rasemik kararlılığından dolayı yeni kullanım alanları bulmuştur. Organik ortamda lipazlar tarafından gerçekleştirilen, esterifikasyon (Chowdary vd, 2001; Hamsaveni vd, 2001; Kiyota vd, 2001; Krishna ve Karanth, 2001; Rao ve Divakar, 2001), transesterifikasyon (Metin ve Akpınar, 2000) ve interesterifikasyonu içine alan çeşitli tepkimelerle ürünlerdeki değişiklikler gözlenmiştir ve bunların yüksek oranlarda sentezlenmesi sağlanmıştır (Gao vd., 2000). Lipazlar, lipid içeren atık suların enzimatik degradasyonunda (Pandey vd., 1999; Masse vd., 2001; Suzuki vd., 2001), organik sentezlerde (Gitlesen vd., 1997; Gupta vd., 2004), deterjan formülasyonlarında (Jaeger vd., 1994 Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007), tekstil sanayinde (Jaeger vd., 1994 Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007), biyosüpfaktanların sentezinde (Sharma vd., 2001; Kanwar vd., 2002b; Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007), kağıt yapımında (Jaeger vd., 1994; Houde vd., 2004), farmasötiklerde (Jaeger vd., 1994; Jesus vd., 1995; Dröge, 2004; Houde vd., 2004; Gulati vd., 2005), agrokimyasal (tarım kimyası) endüstride (Kirchner vd., 1985; Dröge, 2004), pestisitlerde (Kirchner vd., 1985; Jaeger ve Eggert, 2002), gıda endüstrisinde (Jaeger vd., 1994; Reetz, 2002; Gulati vd., 2005), süt endüstrisinde (Reetz ve Jaeger, 1998; Sharma vd., 2001; Kanwar vd., 2002b; Gupta vd., 2004; Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007; Gupta vd. 2007), kozmetiklerde (Jaeger vd., 1994; Houde vd., 2004), oleokimya endüstrisinde (Jesus vd., 1995; Faber, 1997; Gupta vd., 2004), deri endüstrisinde (Jaeger vd., 1994; Gulati vd., 2005) yaygın olarak kullanılmaktadır. Tablo 2’de mikrobiyal lipazların bazı uygulamaları verilmiştir.

Tablo 2. Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları.

Endüstri	Görevi	Ürün ya da Uygulama
Deterjan	Yağların Hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması
	Süt yağının hidrolizi	Peynir ve tereyağındaki tatlandırıcı ajanların geliştirilmesi
Süt ürünleri	Hızlı olgunlaştırma	Peynir
	Yağların modifikasyonu	Tereyağ
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, nemlendiriciler
Kağıt	Hidroliz	Geliştirilmiş kalitede kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
İlaç	Transesterifikasyonu	Sindirimi kolaylaştırıcı düzenleyiciler
	Hidroliz	Özel lipidler
Yağ	Transesterifikasyon	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
	Hidroliz	Mono ve diaçil gliseroller
İçecek	Aroma geliştirilmesi	İçecekler
Ekmek	Tat geliştirilmesi	Raf ömrünün uzatılması

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Bu çalışma sırasında 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 olan *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 suşu (Adıgüzel vd., 2009) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Araçlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar, üretici firmalar ve modelleriyle birlikte markaları Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601UV-Visible
Santrifüj	ThermoFisher Scientific	Heraeus Multifuge 3 SR+
Saf Su Cihazı	SartoriusStedim Biotech	Arium 61316 ProUV
pH Metre	Thermo Scientific	ORION 3 Star pH Benchtop
Otoklav	Tomy	SS-325
Vorteks	Velp Scientifica	Vortex Mixer
Terazi	Precisa	XB 220A
Steril Kabin	Tezsan	—

2.2.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasal maddeler ve markaları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışma sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları.

Firma Adı	Kimyasal Adı
Sigma /Aldrich Chem. Co(St. Louis. MO. USA)	CH ₃ COOH, Glisin, NaOH, <i>p</i> - Nitrofenil asetat, <i>p</i> -Nitrofenil bütirat, <i>p</i> -Nitrofenil oktaonat, <i>p</i> -Nitrofenil laurat, Triton X-100, Tris- Base.
Merck A.G(Darmstadt, Germany)	CH ₃ COONa, Na ₂ CO ₃ , NaHSO ₃ , Tris, Mg ₂ SO ₄ , CuSO ₄ .5H ₂ O, EDTA, 2-Merkaptoetanol, MgCl ₂ , BaCl ₂ , CaCl ₂ , MnCl ₂ , NiCl ₂ , HgCl ₂ , ZnCl ₂ , CoCl ₂ , NaCl, FeCl ₂ , CuCl ₂ , NaOH, NaClO ₄ , Na ₃ PO ₄ , NaN ₃ , NaCN, NaCl, Na ₂ HPO ₄ , Na ₂ B ₄ O ₇ , Na ₂ CO ₃ , NaAc, Na ₂ CO ₄ , NaNO ₃ , NaHCO ₃ , Na ₂ SO ₄ , Na ₂ SO ₃ , NaC ₈ H ₄ N ₂ O ₃ , NaHSO ₄ , SDS,
Himedie	Agar

2.2.3. Kullanılan 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. Fosfat Tamponu (50 mM, pH 6,0): 0,039g NaH₂PO₄.2H₂O ve 0,67g Na₂HPO₄.7H₂O ayrı ayrı yaklaşık 20 mL saf suda çözüldükten sonra çözeltiler birleştirilerek pH' sı 1 N asetik asit ile 6,0' e ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

4. Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7,0): 0,039g NaH₂PO₄.2H₂O ve 0,67g Na₂HPO₄.7H₂O ayrı ayrı yaklaşık 20 mL saf suda çözüldükten sonra çözeltiler birleştirilerek pH' sı 1 N asetik asit ile 7,0' e 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.

2.3. Deneysel Çalışmalar

2.3.1. Sıvı Besiyeri Hazırlanması

Bakteri büyüme ortamları aşağıda tabloda verilen karışım oranlarında hazırlanarak hacimleri saf su ile litereye tamamlandı (Tablo 5) (Deak vd., 1998). Hazırlanan karışımlar 1,1 atm basınçta 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavda steril edilerek kullanıldı.

Tablo 5. Sıvı besi ortamı hazırlanışı.

Madde	Miktarı
Glukoz	1,6 g
Tripton	4,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,08 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
Sıvı Yağ	16 mL
Gum arabic	0,8 g
Distile Su	800 mL

2.3.2. Lipaz Üretimi için Uygun Çalışma Ortamının Belirlenmesi

Yukarda hazırlanışı belirtilen sıvı besi ortamlarına karbon kaynağı olarak ayçiçeği, mısır, zeytinyağı, susam ve fındık yağları ayrı ayrı konularak otoklavda steril hale getirildi. Hazırlanan ortamlar 4 eşit parçaya bölünerek üç erlene *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 suşu ekimi gerçekleştirilirken bir erlen kör olarak ayrıldı. Tüm hazırlanan çözeltiler 55 °C'de 150 rpm hızında hava ısıtmalı çalkalayıcıda 5 gün boyunca inkübe edildi. Büyüme sırasında 24 saat ara ile lipaz aktivitesi ve bakteri yoğunluğu tayinleri yapıldı. 24 saatlik periyotlarla alınan numuneler +8 °C'de 10.000 rpm de 10 dak. santrifüjlenerek çökelek ve süpernatant kısımlara ayrıldı. Çöleklerin yarısı sonikasyonla parçalanarak hücre özütü ve hücre membran bileşenleri +8 °C'de 15.000 rpm'de 20 dak. santrifüjlenerek ayrılmaları sağlandı. Oluşan dört farklı fraksiyonda lipaz aktivitesi ölçümü gerçekleştirildi. Çalışmalar üç erlen için tekrarlandı ve kör olarak kullanılan erlen verilerinden çıkarılarak hesaplandı. Çalışma sırasında çökelekler süpernatant kısımlardan gelebilecek enzim aktivitesini bertaraf etmek için 50 mM pH'ı 7,0 olan fosfat tamponu ile üç kez yıkanarak +8 °C'de 5.000 rpm de 10 dak. santrifüjlenerek kullanıldı. Lipaz aktivitesi ölçümleri oda sıcaklığında, pH 7,0 fosfat tamponunda, pNPB substratı varlığında 405 nm'de gerçekleştirildi. Aktivite sonuçları karşılaştırılarak en yüksek membrana bağlı lipaz aktivitesi gösteren ortam belirlendi.

En iyi büyüme koşulları belirlendikten sonra *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 suşu 72 saat büyütüldü. Hazırlanan kültür +8 °C'de 10.000 rpm'de 10 dak. santrifüjlenerek bakteriler çöktürüldü. Çöktürülen bakteriler pH 7,0 fosfat tamponunda süspanse edilerek 1 ml lik ependorflara aktarıldı ve -20 °C'de muhafaza edildi.

2.3.3. Ah 22 Membranına Bağlı Lipaz Aktivitesinin pH ile Değişimi

G. stearothermophilus Ah22 suşu hücre membranına bağlı lipaz aktivitesinin pH ile değişimini belirlemek için 4,0-12,0 arasındaki pH değerlerine sahip tamponlarda aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Çalışmada 50 mM konsantrasyonlarda hazırlanan pH 4,0 - pH 5,0 arasında asetat, pH 6,0 - pH 7,0 aralığında fosfat, pH 8,0 - pH 9,0 aralığında tris -HCl ve pH 10,0 - pH 12,0 aralığında Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Ölçümler belirtilen tampon değerlerinde p-nitrofenil asetat (pNFA), p-nitrofenil bütirat

(pNFB), p-nitrofenil oktoanat (pNFO) ve p-nitrofenil laurat (pNFL) substratlarının 0,1 mM konsantrasyonları varlığında gerçekleştirildi. Çizilen pH - % Bağıl aktivite grafiğinden en yüksek aktivite gösterdiği pH belirlendi.

2.3.4. Ah22 Membranına Bağlı Lipaz Aktivitesinin Sıcaklıkla Değişimi

En uygun pH değerinde *G. stearothermophilus* Ah22 suşu membranına bağlı lipaz aktivitesinin sıcaklıkla değişimi belirlemek için 10'ar °C'lik artışlarla 10 – 90 °C aralığında; p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil oktaonat ve p-nitrofenil laurat substratlarının 0,1 mM konsantrasyonlarında lipaz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçümler sırasında hazırlanan enzim, substrat ve tampon karışımı belirtilen sıcaklık aralığında 5 dakika inkübe edildi ve 405 nm dalgaboyunda ölçümler yapıldı. Çizilen sıcaklık - % Bağıl aktivite grafiğinden en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık belirlendi.

2.3.5. Ah22 Membranına Bağlı Lipaz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

G. stearothermophilus Ah22 suşu hücrelerine bağlı lipaz aktivitesinin farklı karbon zincir uzunluğuna sahip substratlarıyla olan davranışlarını belirlemek için değişen substrat konsantrasyonlarında enzimin aktiviteleri tayin edildi. Lipaz aktivitesi ölçümü, 30 µL hücre süspansiyonu (yaklaşık 1,3 mg yağ hücre) ile p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil oktaonat ve p-nitrofenil laurat substratlarının 0,001-0,2 mM konsantrasyon aralığında gerçekleştirildi. Tris – HCl tamponu (pH 9,0), 10 µL farklı konsantrasyonlardaki substrat ve 30 µL hücre süspansiyonu ile hazırlanan karışımlar 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 10 °C'de, 5000 rpm de 10 dakika santrifüjlenerek 405 nm'de absorbans değişimleri ölçüldü. Absorbans ölçümleri ve molar absorptivite katsayısı kullanılarak aktiviteler hesaplandı. Ölçümler sonucu elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafiği Microsoft Excel 2010 programı kullanılarak çizildi ve her bir substrat için K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı.

Bir ünite, oda sıcaklığında 1 dakikada 1 µM yağ asidini açığa çıkarmak için gerekli enzim miktarı olarak belirlendi.

2.3.6. Ah22 Lipazının Tekrar Kullanılabilirliği

G. stearothermophilus Ah22 suşundan elde edilen hücreler +4 °C’de 10.000 rpm de 10 dak. Santrifüjlendikten sonra sıvı azot ile dondurularak liyoflizatörde 3 gün boyunca kurutuldu. Elde edilen numuneden 20 µg alınarak 1000 µL 50 mM tampon çözeltisi (pH 7,0) ile süspanse edildi. Lipaz aktivitesi ölçümleri, kurutulmuş örnek ve bakteri numuneleri için pH’ 9,0 olan 50 mM Tris–HCl tamponunda ayrı olarak hazırlanmış 0,1 mM pNFB substratının varlığında oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyonu ile gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin ışık yolunu engellememesi için karışım 10 °C’de 5000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi ve 405 nm de absorbans değişimleri kaydedildi. Ölçümler enzim aktivitesinin başlangıç durumuna göre yaklaşık yarıya düşüncüye kadar tekrarlanarak enzimin tekrar kullanılabilirliği test edildi.

2.3.7. Bazı Metal Katyonlarının, Bazı Anyonların ve Bazı Detarjanların Ah22 Lipazı Aktivitesine Etkileri

2.3.7.1. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

G. stearothermophilus Ah22 suşundan elde edilen lipaz aktivitesi üzerine bazı metal katyonlarının etkisini incelemek amacıyla, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Sr²⁺ Cu²⁺ ve Al³⁺ iyonlarının klorür tuzları ile EDTA kullanıldı. Bu tuzların 100mM’ lık stok çözeltileri hazırlanarak karışımdaki konsntrasyonları 0,1 mM, 0,5 mM ve 1,0 mM olacak şekilde eklenerek, uygun şartlardaki aktiviteleri ölçüldü.

2.3.7.2. Anyonların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

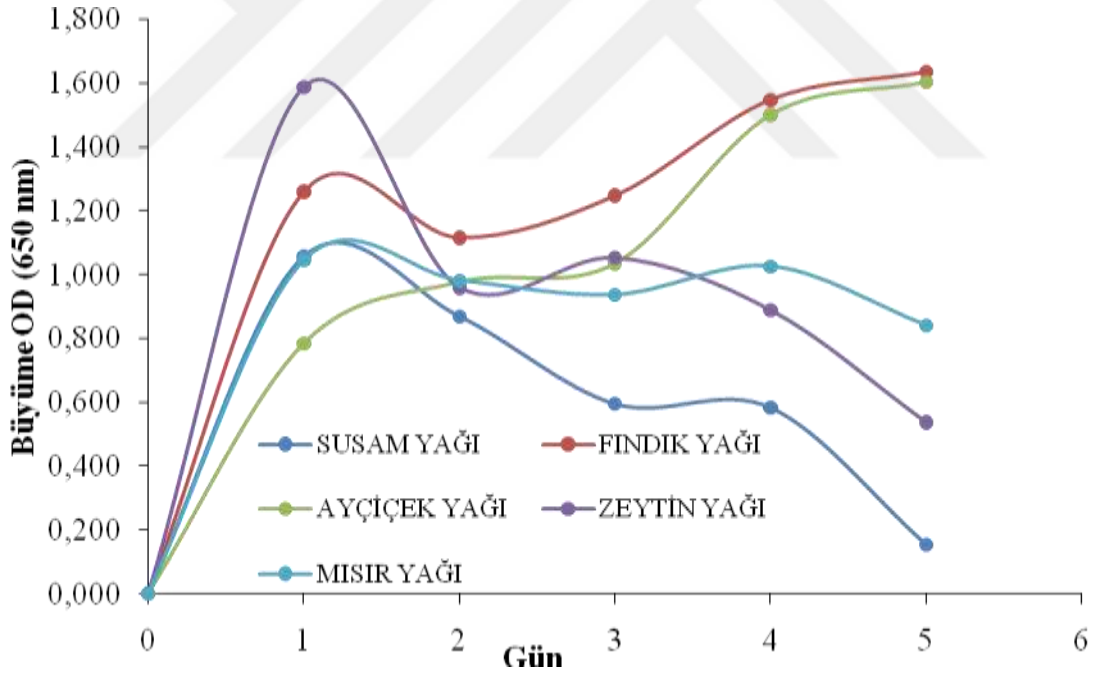
Enzim aktivitesine anyonların etkisini araştırmak için OH⁻, N³⁻, CN⁻, C₂O₄²⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻, HPO₄²⁻, PO₄³⁻ ve CO₃²⁻-anyonlarının sodyum tuzlarının 100 mM’ lık stok çözeltileri hazırlanarak karışımdaki son konsantrasyonları 0,1 mM, 0,5 mM ve 1,0 mM olacak biçimde eklenerek uygun şartlarda aktiviteler ölçüldü.

2.3.7.3. Bazı Deterjanların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bazı deterjanların aktivite üzerine etkisini incelemek için Triton X-114, Triton X-100, SDS, sıvı bulaşık deterjanı, toz bulaşık makinesi deterjanı, tablet bulaşık makinesi deterjanı, çamaşır makinesi deterjanı ve toz el deterjanının %10'luk stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltilerden reaksiyon karışımındaki miktarları 100 µL, 200 µL ve 400 µL olacak şekilde alınarak uygun koşullarda lipaz enziminin aktivitesi ölçüldü. Ayrıca β-merkaptoetanolün (β-ME) karışımındaki konsantrasyonu sırasıyla 0,1, 0,5 ve 1,0 mM olacak şekilde eklenerek aktiviteler ölçüldü. Elde edilen sonuçlar herhangi bir inhibitör madde içermeyen kontrol aktivitesine oranlanarak % bağıl aktiviteler hesaplandı.

3. BULGULAR

G. stearothermophilus Ah22 suşu 5 farklı yağ içerikli ayrı besin ortamlarında 55°C’de 150 rpm’de çalkalayıcı hava ısıtıcısında büyütüldü. Büyütme sonrası 650 nm’de yapılan optik yoğunluk ölçümünde en yüksek değer 1. gün sonunda zeytinyağı ile fındık yağında gözlenirken, 5. günün sonunda fındık yağı ile ayçiçek yağında gözlemlendi (Şekil 8). Fakat bakterilerin sonikasyon sonrası parçalanma ürünü olan membranlarda yapılan lipaz aktivitesi ölçümü sonucunda, en yüksek aktiviteyi fındık yağı içeren besin ortamında büyütülen Ah22 suşu gösterdi. Bu nedenle membrana bağlı lipaz üretimi için fındık yağı içeren besin ortamı tercih edildi (Tablo 6). Enzim kaynağı olan hücreler 72 saat büyütüldükten sonra santrifüj edildi ve 50 mM fosfat tamponunda süspansiyon edilerek -20 °C’de saklandı.



Şekil 8. Farklı yağ içerikli farklı ortamlarda büyütülen Ah22 suşuna ait bakteri büyüme grafiği.

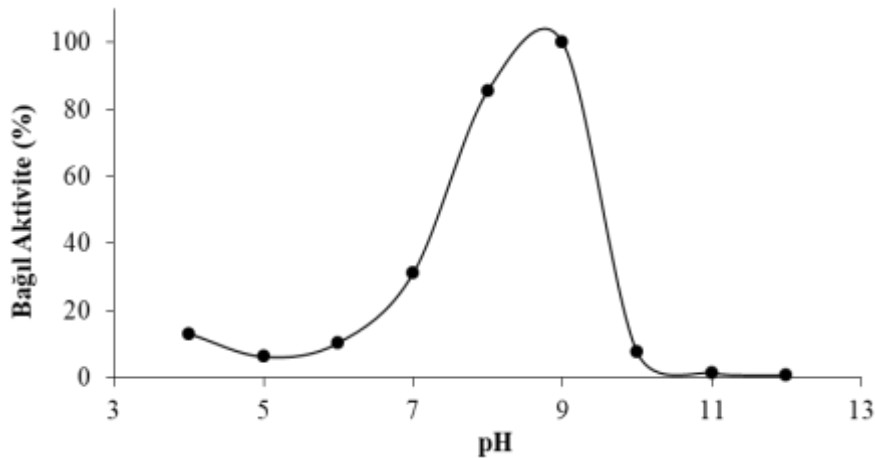
Tablo 6. *G. stearothermophilus* Ah22 suşu bakterilerin farklı yağ kaynaklarında büyütüldükten sonra yapılan sonikasyon işlemi sonrası membrana bağlı lipaz aktiviteleri.

	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün
Ayçiçek Yağı	0,0	682,5	0,0	0,0	0,0
Mısır Yağı	419,5	323,0	309,5	0,0	0,0
Zeytin Yağı	273,0	409,5	473,0	0,0	0,0
Fındık Yağı	2183,9	2910,9	3058,0	0,0	0,0
Susam Yağı	209,5	211,4	222,0	0,0	0,0

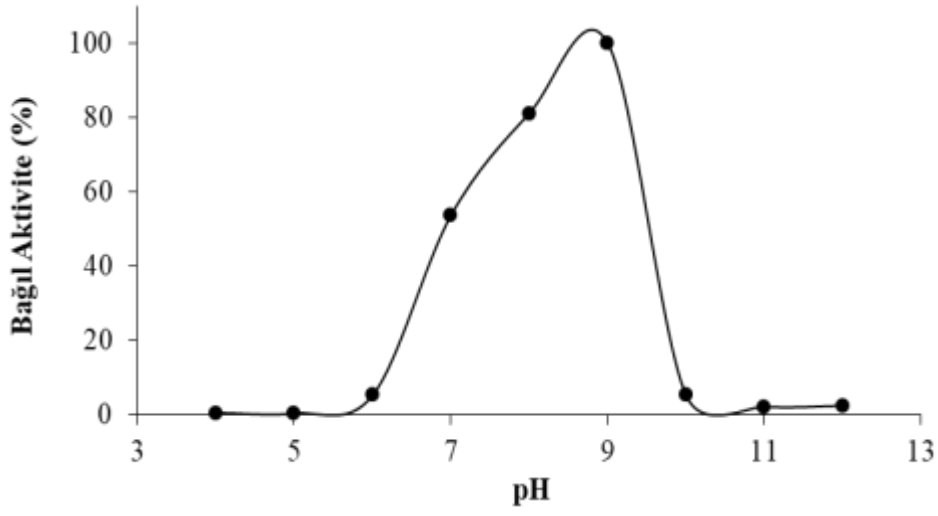
Fındık yağı içeren besi ortmalarında büyütülen *G. stearothermophilus* Ah22 suşu hücrelerinin her çalışmanın başında hücre yoğunluklarının aynı olmasına dikkat edildi. Hücre yoğunluğu yaklaşık olarak $2,40 \pm 0,19$ olarak alındı. Çalışmada reaksiyon ortamına katılan yaş hücrelerin kütlesi yaklaşık olarak 1,13 mg olarak hesaplandı. Liyofilizasyon ile kurutulan hücrelerin reaksiyon ortamına katılan kütlesi ise 0,6 mg olarak tespit edildi.

Her iki hücre formunda yapılan ölçümde lipaz aktivitesi yaş hücre için 901,1 U/g, Liyofilizasyonla kurutulmuş hücre için ise 1018,1 U/g olarak belirlendi.

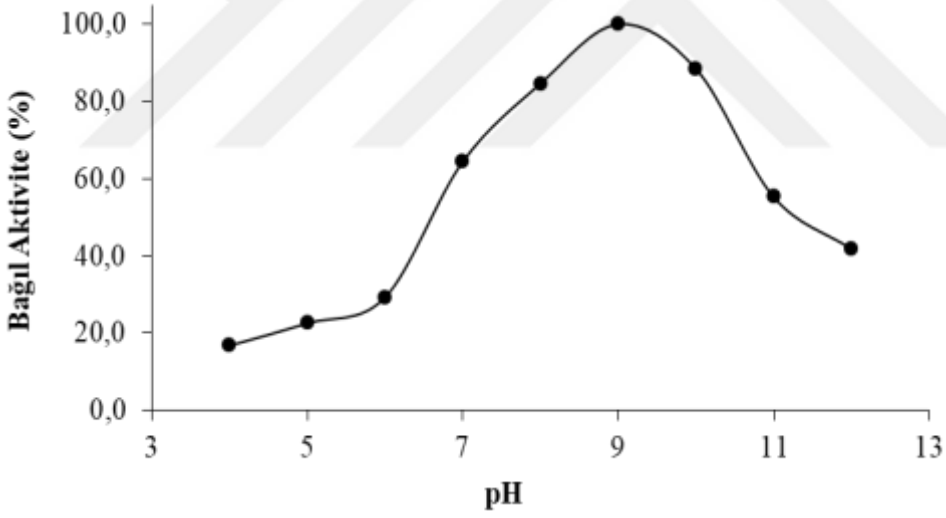
Ah22 suşu hücreleri pNFA, pNFB, pNFO, pNFL substratları varlığında en yüksek lipaz aktivitesini pH 9,0'da gösterdiği belirlendi (Şekil 9-12).



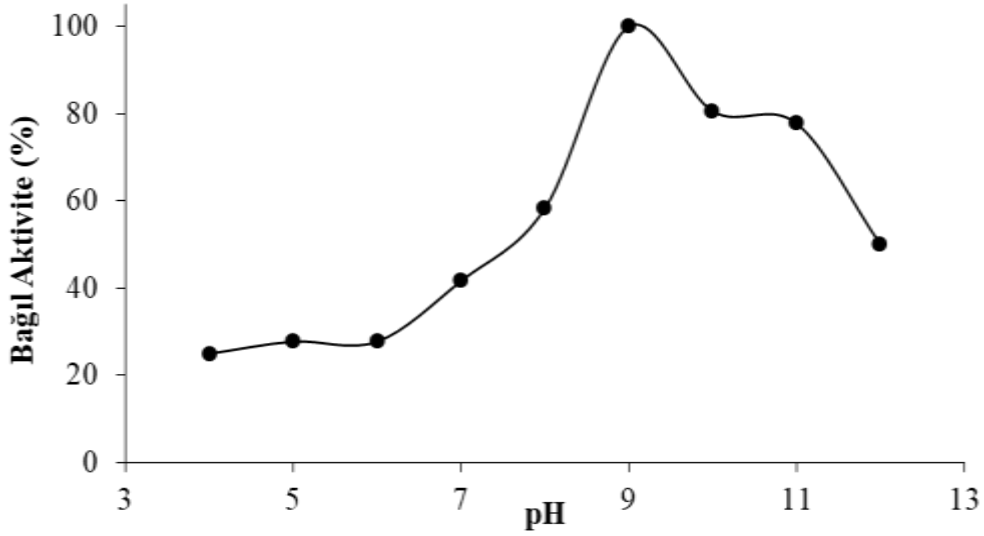
Şekil 9. *G. stearothermophilus* Ah22 suşu hücrelerinin pNFA substratı varlığında pH-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.



Şekil 10. *G. stearothermophilus* Ah22 suşu hücrelerinin pNFB substratı varlığında pH-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.

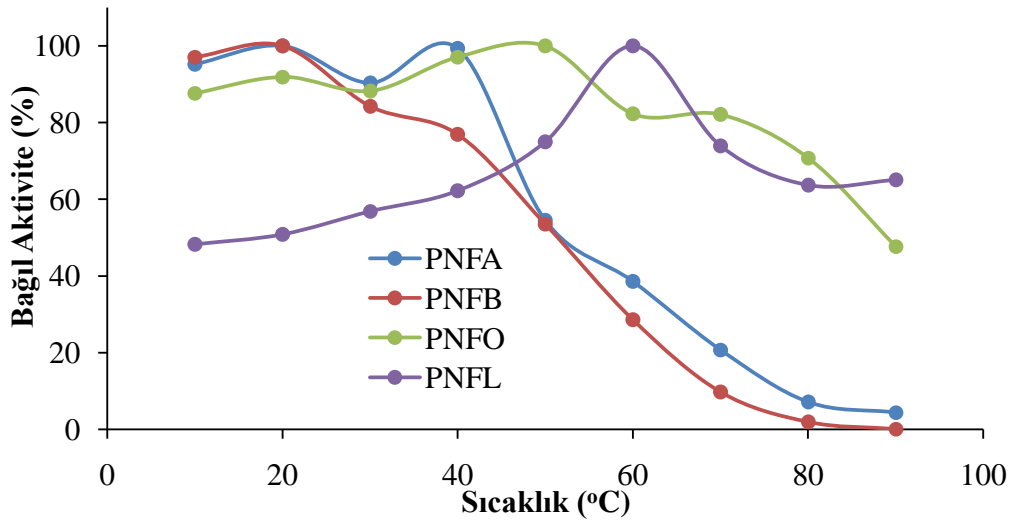


Şekil 11. *G. stearothermophilus* Ah22 suşu hücrelerinin pNFO substratı varlığında pH-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.



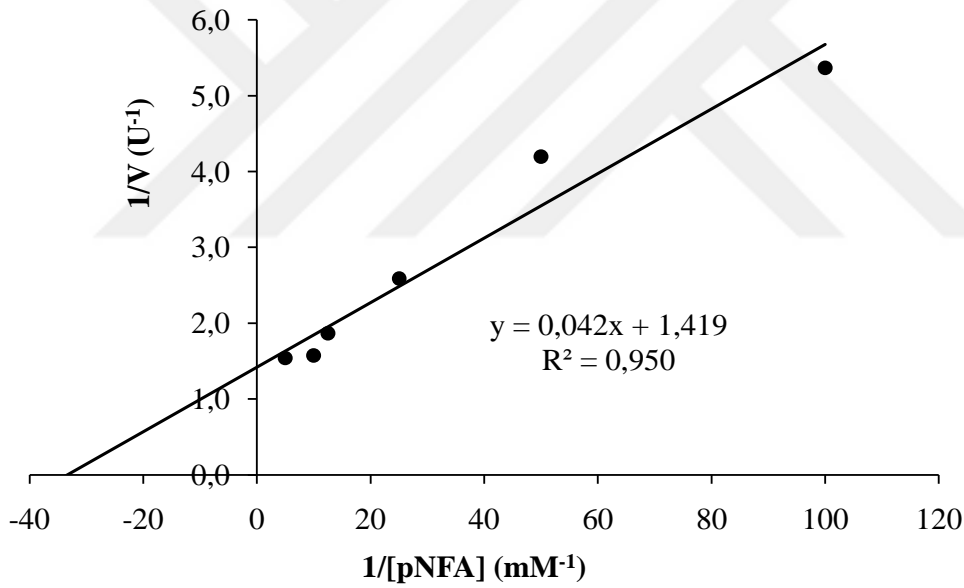
Şekil 12. *G. stearothermophilus* Ah22 suşu hücrelerinin pNFL substratı varlığında pH-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.

Ah22 suşu hücreleri pNFA varlığında 20-40 °C arasında, pNFB varlığında 20 °C'de, pNFO varlığında 50 °C'de, pNFL substratı varlığında ise 60 °C'de en yüksek lipaz aktivitesini gösterdiği tespit edildi (Şekil 13). Ah22 hücrelerinin kısa zincirli yapıya sahip olan yağ asitlerini daha düşük sıcaklıklarda, uzun zincirli yağ asitli yapılarla ise daha yüksek sıcaklıklarda hidroliz edebildiği görüldü.

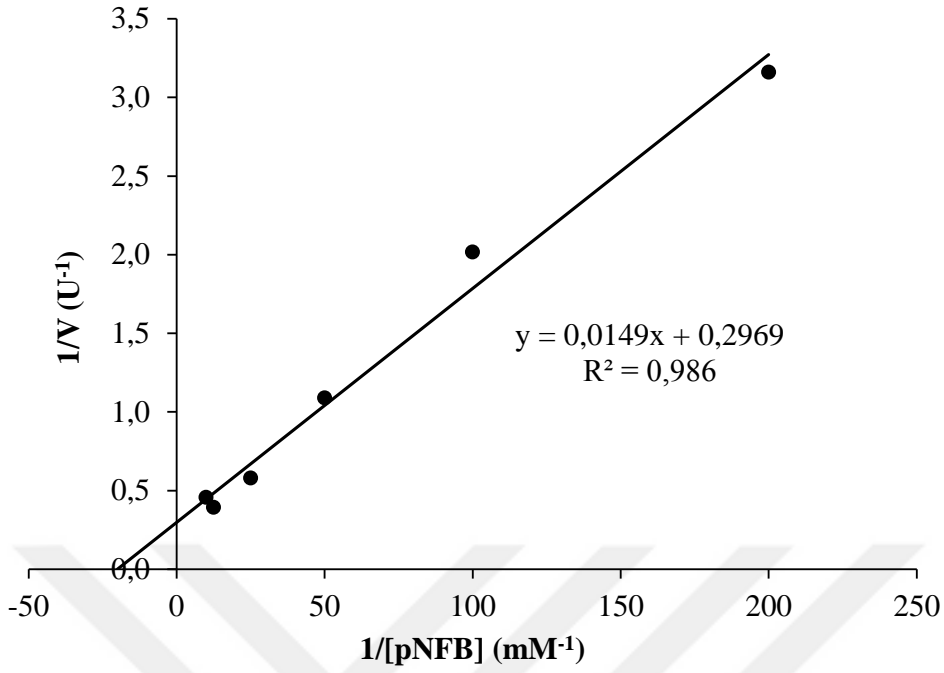


Şekil 13. *G. stearothermophilus* Ah22 suşu hücrelerinin pNFA, pNFB, pNFO pNFL substratları varlığında sıcaklık-lipaz aktivitesi değişimi grafiği.

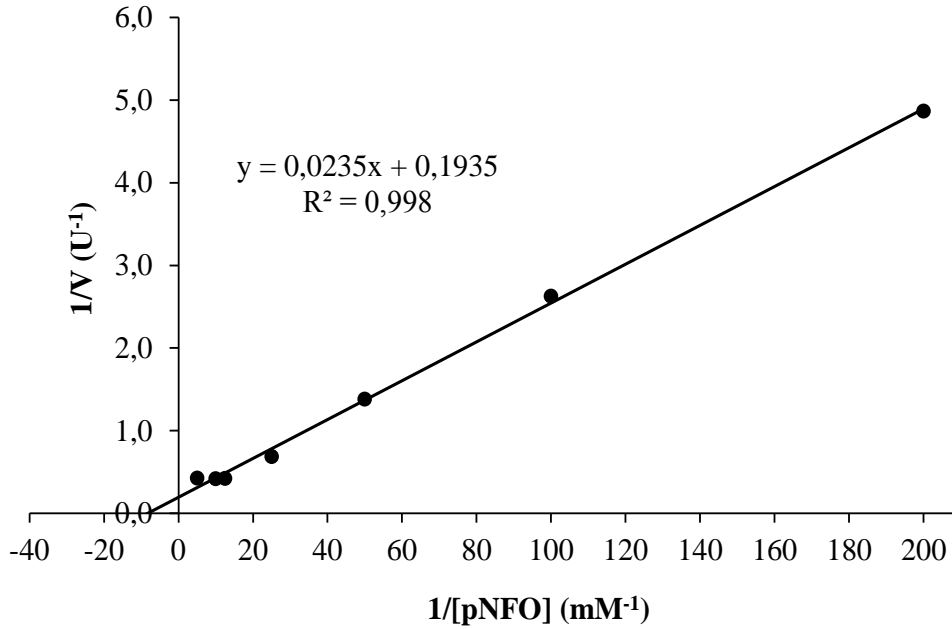
Membrana bağlı lipaz Enzimin aktivite gsterdiği en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, daha önceden ifade edilen optimum şartlarda enzim aktivitesi farklı substratların değişen miktarlarına (0,001-0,2 mM) karşı belirlendi. Substrat olarak p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil bütirat, p-nitrofenil oktaonat ve p-nitrofenil laurat kullanıldı. Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla her bir substratın K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı. K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla, pNFA için 0,03 mM ve 0,70 U (Şekil 14 , Tablo 7), pNFB için 0,05 mM ve 3,4 U (Şekil 15, Tablo 7), pNFO için 0,12 mM ve 5,2 U (Şekil 16, Tablo 7), pNFL için 0,012 mM ve 0,8 U (Şekil 17, Tablo 7) olarak belirlendi. Enzim katalitik etkinliği olan V_{maks}/K_m oranına bakıldığında enzimin en iyi pNFB ve pNFL substratlarıyla etkinleştiniğini sırasıyla bunu pNFO ve pNFA takip ettiği belirlendi (Tablo7).



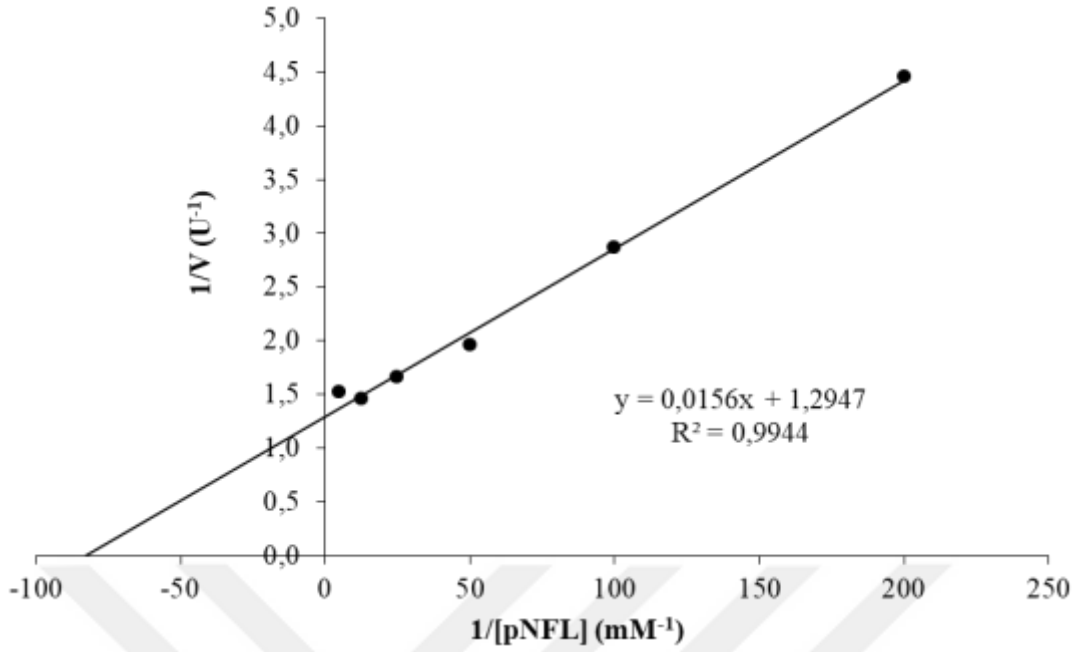
Şekil 14. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın p-nitrofenil asetat substratı varlığında aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi grafiği.



Şekil 15. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın p-nitrofenil bütirat substratı varlığında aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi grafiği.



Şekil 16. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın p-nitrofenil oktaonat substratı varlığında aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi grafiği.

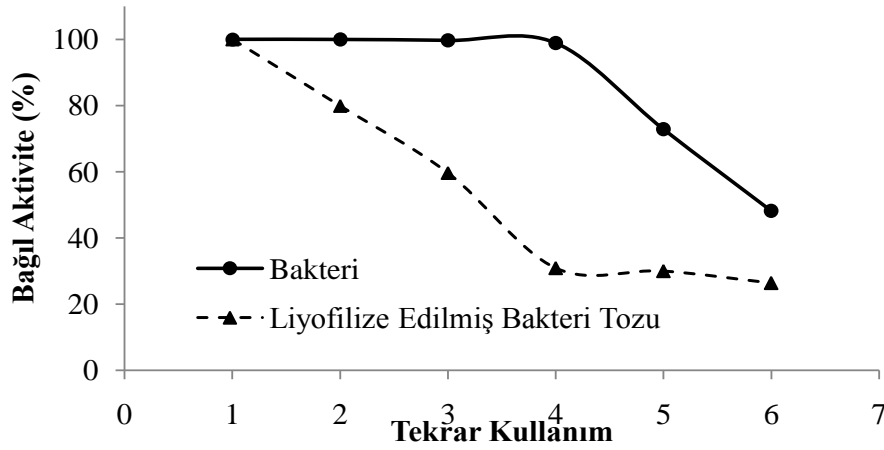


Şekil 17. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın p-nitrofenil laurat substratı varlığında aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi grafiği.

Tablo 7. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın bazı kinetik verileri.

Substrat	K_m (mM)	V_{maks} (U)	V_{maks}/K_m (dk ⁻¹)
p-nitrofenil asetat	0,03	0,7	0,023
p-nitrofenil bütirat	0,05	3,4	0,068
p-nitrofenil oktaonat	0,12	5,2	0,043
p-nitrofenil laurat	0,012	0,8	0,067

G. stearothermophilus Ah22 hücre membranına bağlı lipazın tekrar kullanımı belirlemek için hücreler ve hücrelerin liyofilizatörde kurutulmuş ve öğütülmüş hücre bileşenleri kullanıldı. Lipaz aktivitesi pNFB substratı varlığında bakıldıktan sonra santrifüj edilerek bir kez 0,05 M pH'ı 7,0 fosfat tamponunda yıkanıp santrifüjlendikten sonra tekrar aktivite aynı enzim kaynağı kullanılarak ölçüm yapıldı. Yapılan ölçümler sonucunda direk hücrenin lipaz aktivitesini 4 kullanıma kadar muhafaza ettiği 5. Kullanımdan sonra ilk lipaz aktivitesini %30 oranında, 6. Kullanımdan sonra ise %50 oranında kaybettiği tespit edildi (Şekil 18). Hücrelerin liyofilizatörde kurutulmuş ve öğütülmüş tozları ise ilk kullanımdaki aktivitesini 2. Kullanımda %20, 3. Kullanımda %40 ve 4. kullanımdan sonra ise yaklaşık %70 oranında kaybettiği belirlendi (Şekil 18).



Şekil 18. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın pNFB substratı varlığında tekrar kullanım grafiği.

G. stearothermophilus Ah22 hücre membranına bağlı lipazın farklı katyon, anyon, bileşik ve deterjan ortamlarındaki aktivitesi incelendi. Katyon varlığında Ca^{+2} ve Ni^{+2} hariç lipazın ilk aktivitesini koruduğu hatta bazı metallerin varlığında arttığı tespit edildi (Tablo 8).

Tablo 8. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın bazı katyonlar varlığındaki aktivitesi.

Katyon Adı	0,1 mM	0,5 mM	1,0 mM
	Kalan aktivite (%)	Kalan aktivite (%)	Kalan aktivite (%)
Cu^{+2}	106	111	108
Al^{+3}	105	107	104
Mg^{+2}	107	101	98
Ca^{+2}	100	81	70
Ni^{+2}	109	68	63
K^{+}	99	101	99
Na^{+}	103	104	104
Mn^{+2}	103	107	123
Sr^{+2}	100	97	97

Bazı anyonların sodyum tuzu varlığında membrana bağlı lipazın davranışı incelendi. N_3^- , CN^- , HCO_3^- gibi anyonlar varlığında lipazın ilk aktivitesini çok az miktarda arttığı, diğer kullanılan anyonlar avrlığında ise ilk aktivitesini %20-30 oranında kaybettiği tespit edildi (Tablo 9).

Tablo 9. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın bazı anyonlar varlığındaki aktivitesi.

Anyon Adı	0,1 mM	0,5 mM	1,0 mM
	Kalan aktivite (%)	Kalan aktivite (%)	Kalan aktivite (%)
NaN ₃	109	107	102
NaCN	105	100	102
Na ₂ SO ₄	89	91	89
Na ₂ PO ₄	79	82	81
Na ₂ CO ₃	65	78	70
NaHCO ₃	105	112	106
Na ₂ HPO ₄	97	91	91
NaHSO ₃	89	91	92
NaOH	83	79	77
NaC ₂ O ₄	72	71	82

G. stearothermophilus Ah22 hücre membranına bağlı lipazın EDTA varlığında düşük konsantrasyonlarda aktivitesinin değişmediği 1,0 mM EDTA konsantrasyonunda ilk aktivitesini %21 oranında kaybettiği belirlendi. β -ME varlığında lipazın ilk aktivitesini %50 oranından fazlasını kaybettiği belirlendi (Tablo 10).

Tablo 10. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın EDTA ve β -ME varlığındaki aktivitesi.

Konsantrasyon	0,1 mM	0,5 mM	1,0 mM
	Kalan aktivite (%)	Kalan aktivite (%)	Kalan aktivite (%)
EDTA	100	91	79
β -ME	57	16	10

Ah22 hücre membranına bağlı lipazın farklı deterjan ve deterjan hammaddeleri varlığında büyük oranda inhibe olduğu tespit edildi. Yalnızca sıvı bulaşık deterjanında lipaz aktivitesini %80-90 oranında koruyabildiği tespit edildi (Tablo 11).

Tablo 11. *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın bazı deterjanlar varlığındaki aktivitesi.

Deterjan Adı	%1,0	%2,0	%4,0
	Kalan aktivite	Kalan aktivite	Kalan aktivite
Triton-X100	89	67	49
Triton-X114	48	41	24
SDS	52	43	32
Çamaşır Makinası Det.	22	17	11
Sıvı Bulaşık Det.	91	83	53
Tablet Bulaşık Mak. Det.	19	16	13
Toz Bulaşık Mak. Det.	22	17	12
Çamaşır Toz El Det.	20	16	14

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Günümüzde bazı endüstri alanlarında kimyasal işlevlerin yerini enzimatik reaksiyon işlevleri almaktadır. Enzimlerin endüstri alanında yaygın olarak kullanılmamasının sebeplerinden biri enzimlerin saflaştırılmalarının zahmetli ve pahalı işlemler olması ve diğer sebepler arasında enzimlerin tek kullanımdan sonra tekrar geri kazanılmasının ayrı bir maliyet gerektirmesidir. Günümüzde saf enzim kullanımını yaygınlaştırmak, geri kazanımını kolaylaştırmak ve maliyeti düşürmek için immobilizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Fakat bu işlemlerde ilave maliyete sebep olmaktadır. Bir başka yöntem tam hücre immobilizasyondur. Genellikle bu yöntem ekstrasellüler enzim üretebilen hücreler için kullanılmaktadır. Bu çalışmada ekstra bir enzim saflaştırma ve immobilizasyon uygulamasına ihtiyaç duyulmadan direk hücrenin kendisi enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Hücreler sıvı halde kararlılıklarını kısmende olsa yitirebilmektedirler. Bu çalışmada hücreler liyofilizatörde kurutulmuş toz halinde de lipaz kaynağı olarak kullanıldı. Çalışma sonucunda *G. stearothermophilus* Ah22 suşu hücrelerinin her iki halde de lipaz aktivitesi gösterdiği ispatlandı.

G. stearothermophilus Ah22 suşu hücreleri membrana bağlı lipazı en çok fındık yağı içeren ortamda ürettiği belirlendi.

pH enzim aktivitesinin ifade edilmesinde önemli faktörlerden biridir. Enzimin kullanılabilmesi için endüstriyel koşullardaki verimli şekilde kullanılması için önemli bir parametredir. Bakteriyal lipazlar, birkaç asidik lipaz hariç genelde alkali veya nötral pH'larda aktivite gösterirler (Pascoal vd., 2018). Ah22 hücresi membrana bağlı lipaz en yüksek aktivitesini tüm substratları için pH 9,0'da gösterdi. *G. stearothermophilus* Ah22 suşundan kısmi olarak saflaştırılan intraselüller lipazın en yüksek 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 belirtilmiştir (Ekinci, 2015). Bununla birlikte literatürde yapılan incelemelere göre *Bacillus cereus* C71'dan saflaştırılan lipaz için optimum pH değeri 9,0 olarak (Chen vd., 2007), *Pseudomonas stutzeri* PS59 suşundan saflaştırılan lipaz için optimum pH 8,5 olarak (Li vd., 2014), *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 ve *Bacillus sphaericus* MTCC 7542 lipazları için optimum pH değeri 8,0 olarak (Cao vd., 2012; Tamilarasan ve Kumar, 2012) kaydedilmiştir. *G. stearothermophilus* Ah22 memembranına bağlı lipazın optimum

pH bakımından literatürle uyumlu olduğu gözlemlendi.

G. stearothermophilus Ah22 hücrelerinin kısa zincirli yapıya sahip olan yağ asitlerini daha düşük (20-40 °C) sıcaklıklarda, uzun zincirli yağ asitli yapılarla ise daha yüksek (50-60 °C) sıcaklıklarda hidroliz edebildiği görüldü. Bakteriyal lipazlar genellikle en yüksek aktiviteyi 30-60 °C sıcaklık aralığında göstermektedirler. *G. stearothermophilus* Ah22 suşundan kısmi olarak saflaştırılan intraselüller lipazın, *p*-nitrofenil oktaonat substratı için 50 °C, *p*-nitrofenil laurat substratı için ise 60 °C’de en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Ekinci, 2015). Literatürde mevcut farklı organizmalardan izole edilmiş lipazların optimum sıcaklıkları *G. stearothermophilus* Ah22 membranına bağlı lipaz ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları, *Mortierella alliacea* lipazının 50 °C (Jermisuntiea vd., 2011), *Bacillus coagulans* BTS-3, *Bacillus stearothermophilus* P1 ve *Staphylococcus aureus* lipazlarının 55 °C (Sinhaikul vd., 2001; Kumar vd., 2005; Sarkar vd., 2012), *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Geococcus* sp. SBS-4S ve *Thermomyces lanuginosus* lipazlarının 60 °C’de (Lee vd., 2001; Tayyab vd., 2011; Zheng vd., 2011) en yüksek aktivite gösterdikleri belirtilmektedir. Bununla birlikte farklı mikroorganizmalardan saflaştırılan lipazların optimum sıcaklıkları 20 °C (Li vd., 2014; Florczak vd., 2013) ile 80 °C (Chen vd., 2007) arasında değişmektedir. Ah22 suşu hücre membranına bağlı lipazın orta derecede termofilik davrandığı tespit edildi.

G. stearothermophilus Ah22 hücre membranına bağlı lipazın pNFA substratı varlığında 0,03 mM K_m ve 0,7 U V_{maks} değerine, pNFB substratı varlığında 0,05 mM K_m ve 3,4 U V_{maks} değerine, pNFO substratı varlığında 0,12 mM K_m ve 5,2 U V_{maks} değerine, pNFL substratı varlığında 0,01 mM K_m ve 0,8 U V_{maks} değerine değerlerine sahip olduğu Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek hesaplandı. Ah22 hücre membranına bağlı lipazın en iyi bütirat ve laurat yağ asitlerine sahip substratlarıyla etkileştiği belirlendi. *G. stearothermophilus* Ah22 suşundan izole edilen lipazın 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, 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 belirtilmiştir (Ekinci, 2015). Ayrıca bu enzimin ilgisinin en fazla pNFB substratına olduğu belirtilmiştir (Ekinci, 2015).

Literatürlerde yer alan bazı çalışmalarda pNPL’in substrat olarak kullanıldığında,

Bacillus sp.'den saflaştırılan lipazın K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 0,5 mM ve 0,139 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$ (Nawani, vd., 2006b), *Aureobasidium pullulans* HN2.3 lipazının 0.608 mM ve 0.039 mM/dak (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) kullanıldığında bu değerler sırasıyla, *Spirulina platensis* lipazı için 0,02 mM ve 38,9 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Saygıdeğer Demir ve Tükel, 2010), *Bacillus stearothermophilus* MC 7 lipazı için 0,33 mM ve 188 $\mu\text{M} /\text{dak.mg}$ (Kambourova vd., 2003) ve *Burkholderia multivorans* V2 lipazı için 1,56 mM ve 5,62 $\mu\text{mol} /\text{dak.mg}$ (Dandavate vd., 2009) olarak bildirilmiştir. Tayyab vd., (2011) *Geoacillus* sp. SBS-4S lipazının, *p*NPA substratı varlığında K_m ve V_{maks} değerlerini sırasıyla 3.8 mM ve 2273 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir.

G. stearothermophilus Ah22 hücre membranına bağlı lipazın tekrar kullanımı belirlemek için hücreler ve hücrelerin liyofilizatörde kurutulmuş ve öğütülmüş hücre bileşenleri kullanıldı. Yapılan ölçümler sonucunda hücrelerin lipaz aktivitesini 4. kullanıma kadar ilk aktivitesini koruduğu, liyofilizatörde kurutulmuş kurutulmuş hücrelerin ise ilk kullanımdan sonra aktivitesinin düştüğü gözlemlendi. Her ne kadar hücre başına düşen membrana bağlı lipaz aktivitesi birbirine yakın olsa da Ah22 suşu hücrelerin direk enzim kaynağı olarak kullanılmasının tekrar kullanım açısından daha verimli olacağı tespit edildi.

G. stearothermophilus Ah22 hücre membranına bağlı lipazın aktivitesini, Ni^{+2} ve Ca^{+2} kasyonları hariç çalışmada kullanılan diğer kasyonların fazla değiştirmedeği belirlendi. Sodyum tuzu N_3^- , CN^- , HCO_3^- anyonlarının Ah22 membran lipazının aktivitesini çok düşük oranda arttırdığı, PO_4^{-3} , CO_3^{-2} , OH^- , $\text{C}_2\text{O}_4^{-2}$ anyonlarının %20-30 oranında, SO_4^{-2} , HSO_3^- , HPO_4^{-2} anyonlarının ise yaklaşık %10 oranında düşürdüğü gözlemlendi. EDTA lipaz aktivitesini %10-20 oranında azaltırken, β -ME ise %90 oranında azalttığı belirlendi. Çalışmada kullanılan deterjanların, Ah22 membranına bağlı lipaz aktivitesi üzerinde oldukça etkili olduğu ve aktiviteyi düşürdüğü tespit edildi. Deterjanların lipaz aktivitesi üzerine bu denli etkili olması çalışmada kullanılan lipazın membrana bağlı olduğunu ispatlamaktadır. Deterjen etkisi ile bozulan membran bütünlüğüyle lipaz aktivitesi de düşmektedir.

Sonuç olarak; *G. stearothermophilus* Ah22 hücre membranına bağlı lipazın

oldukça yüksek aktivite gösterdiği ve bu aktivitenin hücre içi mevcut olan lipaz aktivitesinden bağımsız olduğu gözlemlendi. Uzun karbon zincirine sahip yağ asitlerinde 50-60 °C sıcaklıklarda rahatlıkla kullanılabilmesi belirlendi. Bununla birlikte anyon ve katyonlar varlığında aktivitesinin fazla değişmediği, ancak deterjanlar ve β -ME varlığında aktivitesinin kayda değer oranda azaldığı tespit edildi. Kurutularak toz haline getirilen hücreler de lipaz kaynağı olarak kullanılabilmesi, fakat tekrar kullanım açısından yaş hücrelerin kullanımının daha verimli olacağı belirlendi.



5. ÖNERİLER

Bu çalışmada kullanılan yeni bir termofilik bakteri olan *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 suşundan lipaz enzimi kısmi olarak daha önce yapılan bir çalışmada kısmen saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu tezde bu bakterinin hücre dışı membrana bağlı lipaz da üretebildiği belirlendi ve bu lipaz karakterize edildi. Üretilen lipazın saflaştırmaya ve immobilizasyona gerek duyulmadan kullanılacağı gözlemlendi. Ayrıca yaş hücrelerin, kurutulmuş haline getirilmiş hücrelere oranla daha fazla tekrar kullanılabilirliği belirlendi. Bununla birlikte kurutulmuş hücrelerin reaksiyon ortamında hemoliz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bundan dolayı liyofilizasyon ile kurutma aşamalı olarak yapılarak hücre dayanıklılığı artırılabilir. Bununla birlikte yaş hücrelerin uygun tam hücre immobilizasyonu gerçekleştirilerek tekrar kullanımı artırılabilir. Böylece endüstriyel kullanımda enzim tekrar kullanımının artırılmasıyla maliyet daha da düşürülebilecektir.

KAYNAKLAR

- Abramic, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W. and Pigac, J., 1999.** Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 522-529.
- 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.
- Adlercreutz, D., Budde, H. and Wehtje, E., 2002.** Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 4, 403-411.
- Ahmed, E.H., Raghavendra, T. and Madamwar, D., 2009.** Thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* eh 37: characterization, partial purification and application in organic synthesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 160, 2102- 113.
- Ahmed, E.H., Raghavendra, T. and Madamwar, D., 2010.** An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. *Bioresource Technology*, 101, 3628–3634.
- Akbin, H.M., 2012.** Kanola Yağından Hidrotalsite Tutuklanmış Lipaz İle Biyodizel Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye, 111 s., 35.
- Andersson, R.E., Hedlund, G.B. and Jensson, V., 1979.** Thermal inactivation of a heatresistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 62, 361–367.
- Arık, G., 2012.** Aktino Miset Kaynaklı Lipaz Geninin Kolonlanması, Dizilenmesi ve Ekspresyonu. Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, 53 s.
- Arpigny, J.L. and Jaeger, K.E., 1999.** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 343,1, 177–183.
- Ateslier, Z.B.B., 2009.** Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* Hbb 134'ün Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye, 156 s.
- Ateslier, Z.B.B., and Metin, K., 2006.** Production, and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp.. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 628–635.
- Ayaz, B., 2011.** Streptomisetlerde Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, Türkiye, 146 s., 42.

- Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1986.** Biochemical Engineering Fundamentals, Mc Graw Hill, ISBN: 9780070032125, 984 s.
- Balcão, V.M., Paiva, A.L. and Malcata, F.X., 1996.** Bioreactors with Immobilized Lipases: State of the Art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 392-416.
- Baral, A. and Fox, P.F., 1997.** Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas tolaasii*. *Food Chemistry*, 58, 33–38.
- Bassegoda, A., Cesarini, S. and Diaz, P., 2012.** Lipase improvement: goals and strategies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, 3, 1-8.
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E. and Kirk, O., 1991.** The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnology*, 9, 360–363.
- Bora, L. and Kalita, M.C., 2007.** Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.LBN4. *International Journal of Microbiology*, 4, 1, 1–12.
- Boran, R., 2008.** *Pseudomonas* spp.'de Lipaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, Türkiye, 147 s., 20.
- Bornscheuer, U.T., 2002.** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 73–81.
- Bradoo, S., Saxena, R. K. and Gupta, R., 1999.** Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 87– 1.
- Brockman, H.W., Mornsen, W.E. and Tsujita, T., 1988.** The biology, biochemistry and technology of lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 891-896.
- Cadirci, B.H. and Yasa, I., 2009.** An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64, 155-167.
- Cai, Y.J., Wang, L., Liao, X.R., Ding, Y.R. 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.
- 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-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G. and Ros, R.O., 2005.** Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial*

Technology, 37, 648–654.

- 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.
- Coşkun, G., 2018.** Nano Yapılı Destek Materyalleri Üzerine Lipaz Enziminin Tutuklanması Ve Tutuklanmış Enzimin Aktivite İle Enantiyoseçimliliğe Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 116 s., 6.
- Cygler, M. and Schrag, J.D., 1999.** Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441, 205-214.
- Çakar, N.E., 2016.** *Aspergillus niger* HBF39'dan Lipaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
- Çoban, H.B., 2009.** Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipaz Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 76 s.
- 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.
- Deak, T., Beuchat, L.R., Guerzoni, M.E., Lillie, A., Peter, G., Rohm M., Schnürer F., Tabajdi P.V. and Westphal, S., 1998.** A collaborative study on media for the enumeration of yeast in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 91-95.
- Dharmstithi, S. and Luchai, S., 1999.** Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiology Letters*, 179, 241-246.
- Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D.Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A. and Keskinler, B., 2009.** Biodiesel production from sunflower, soybean and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*, 100, 1983-1991.
- Dong, H., Gao, S., Han, S. and Cao, S., 1999.** Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and properties in non-aqueous media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30, 251-256.
- Döngez, D., 2015.** Lipaz Enziminin Uv Işınlarıyla Sertleşebilen Sol-Jel Hibrit Kaplama Filmlerine Kovalent İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Marmara

Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 47 s.

Dröge, M.J., 2004. Selection of novel lipases and esterases for enantioselective biocatalysis. Ridderprint BV, ISBN: 90-901-7661-6, 1-173.

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.

Dutta, S. and Ray, L., 2009. Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 159, 142-154.

Ekinci, A.P., 2015. *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 Suşundan Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 140 s., 32.

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, 329-338.

Erdoğan G., 2003. Lipaz Enzimi Katalizörlüğünde Bitkisel Yağlardan Biyodizel Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, Türkiye, 72 s.

Faber, K., 1997. *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag, third editions, 434 s.

Florczak, T., Daroch, M., Wilkinson, M.C., Białkowska, 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.

Gandhi, N.N., 1997. Applications of lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 6, 621-634.

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.

Geminos, G. and Greenfield, P.F., 1978. An enzymatic technique for the detection of dextran in cane juice and prediction of viscosity increases. *International Sugar Journal*, 80, 227-231.

Ghanem, A. and Aboul-Enein, H.Y., 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, 21, 3331–3351.

Gilbert, E.J., Drozd, J.W. and Jones, C.W., 1991. Physiological regulation and

- optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. Journal of General Microbiology, 137, 2215-2221.
- Gitlesen, T., Bauer, M. and Adlercreutz, P., 1997.** Adsorption of lipase on polypropylene powder. Biochimica et Biophysica Acta, 1345, 188–196.
- Gulati, R., Isar, J., Kumar, V., Parsad, A.K., Parmar, V.S. and Saxena, R.K., 2005.** Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. Pure and Applied Chemistry, 77, 251–262.
- Guncheva, M. and Zhiryakova, D., 2011.** Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. Journal of Molecular Catalysis, B: Enzymatic, 68, 1, 1-21.
- Gunstone, F.D., 1999.** Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 1535–1549.
- Gupta, N., Rathi, P., Singh, R., Goswami, V.K. and Gupta, R., 2007.** Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. Applied Microbiology and Biotechnology, 67, 648–653.
- Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P., 2004.** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 763-781.
- Hammamchi, H., 2014.** *Rhodotorula Mucilaginosa*'dan Lipaz Enzimi Üretimi ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 109 s.
- Hamsaveni, D.R., Prapulla, S.G. and Divakar, S., 2001.** Response surface ethodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. Process Biochemistry, 36, 1103–1109.
- Hasan, F., Shah, A.A. and Hameed, A., 2006.** Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, 39, 235-251.
- Horchani, H., Mosbah, H., Ben Salem, N., Gargouri, Y. and Sayari, A., 2009.** Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated Staphylococcus aureus strain. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 56, 4, 237-245.
- 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.
- Hou, C.T., 2002.** Industrial Uses of Lipase. Lipid Biotechnology, 387–394.
- Houde, A., Kademi, A. and Leblanc, D., 2004.** Lipases and their industrial applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, 118, 155-170.
- Iwai, M. and Tsujisaka, Y., 1984.** Fungal lipase. In: Lipases. Elsevier Science

Publisher, Borgstrom, B. and Brockman, H.L., (eds.), 443-469.

- İşbakan, N., 2006.** Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Safılıkta 1-Fenil-1-Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 107 s.
- Jaeger, K.E. and Eggert, T., 2002.** Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnol*, 13, 390-397.
- 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.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M. and Misset, O., 1994.** Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 1, 29–63.
- Janssen, P.H., Monk, C.R. and Morgan, H.W., 1994.** A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 120, 195-200.
- Jennings, B.H. and Akoh, C.C., 2000.** Lipase-catalyzed modification of rice bran oil to incorporate capric acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 9, 4439-4443.
- Jensen, R.G., de Jong, F.A. and Clark, R.M., 1983.** Determination of lipase specificity. *Lipids*, 18, 3, 239-252.
- 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.
- Jesus, P.C., Rezende, M.C. and Nascimento, M.G., 1995.** Enzymatic resolution of alcohols via lipases immobilized in microemulsion-based gels. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6, 63–66.
- 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 isolate *pseudomonas mendocina* pk-12cs and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1, 1041-1046.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R. and Derekova, A., 2003.** Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearotherophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 307–313.
- 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.

Kandasamy, R., Kennedy, L.J., Vidya, C., Boopathy, R. and Sekaran, G., 2010. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 59-66.

Kandasamy, R., Kennedy, L.J., Vidya, C., Boopathy, R. and Sekaran, G., 2010. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 59-66.

Kanwar, L. and Goswami, P., 2002a. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 727-735.

Kanwar, L., Gogoi, B. K. and Goswami, P., 2002b. Production of a *Pseudomonas* lipase in *n*-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, 84, 207-211.

Kanwar, S.S., Ghazi, I.A., Chimni, S.S., Joshi, G.K., Rao, G.V., Kaushal, R.K., Gupta, R. and Punj, V., 2006. Purification and properties of a noble extracellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein Expression and Purification*, 46, 421-428.

Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L.I. and Fujiwara, N., 2006. Purification and characterization of an alkaline lipase from *pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, 2, 82-89.

Kawasaki, K., Kondo, H., Suzuki, M., Ohgiya, S. and Tsuda, S., 2002. Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58, 1168-1174.

Khyami-Horani, H., 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 399-401.

Kim, H.K., Choi, H.J., Kim, M.H. and Oh, T.K., 2002. Expression and characterization of Ca²⁺ independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1583, 205-212.

Kirchner, G., Scollar, M.P. and Klibanov, A.M., 1985. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 107, 7072-251.

Kiyota, H., Higashi, E., Koike, T. and Oritani, T., 2001. Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, 1035-

1038.

- Klibanov, A.M., 1990.** Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Accounts of Chemical Research*, 23, 114-120.
- Klibanov, A.M., 1997.** Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnology*, 15, 97–101.
- Koçyiğit, A., 2009.** Termofilik Bakterilerden Lipaz Üretimi ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 214 s., 47.
- Kojima, Y. and Shimizu, S., 2003.** Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 3, 219- 226.
- 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.
- Kösali, Y.K., 2005.** α -Hidroksi Ketonların Enantiyoseçimli Olarak Biyotransformasyonla Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 72 s.
- Krishna, S.H. and Karanth, N.G., 2001.** Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: a kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547, 262–267.
- Kumar, A. and Kanwar, S.S., 2011.** Synthesis of isopropyl ferulate using silicaimmobilized lipase in an organic medium. *Enzyme Research*, 1-8.
- 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.
- 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 characterisation of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 179, 393-400.
- Lee, S.Y. and Rhee, J.S., 1993.** Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 617-623.
- Lianghua, T. and Liming, X., 2005.** Purification and partial characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* ZJU318. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 125,

139-146.

- 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.
- 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: 0.1016/j.bej.2008.01.014.
- Macrae, A.R., 1983.** Extracellular microbial lipases, In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publishers Ltd., Fogarty, W.M. (ed.), 225-250.
- Malmos, H., 1990.** Enzymes for detergents. *Chemistry and Industry*, 6, 183-186.
- Marangoni, A.G. and Rousseau, D., 1995.** Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends in Food Science & Technology* 6, 10, 329-335.
- 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
- Masse, L., Kennedy, K.J. and Chou, S.P., 2001.** The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76, 629-635.
- Metin, K. ve Akpınar, M.A., 2000.** *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 Karaciğer lipaz enziminin bazı kinetik özellikleri. *Turkish Journal of Biology*, 24, 489–502.
- 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., Khurana, J. and Kaur, J., 2006b.** 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.
- Nawani, N., Singh, R. and Kaur, J., 2006a.** Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 5, 559-565.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F. and Tan, T., 2006.** Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 1-4, 142-147.
- Nthangeni, M.B., Patterton, H.G., van Tonder, A., Vergeer, W.P. and Litthauer, D., 2001.** *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 705–712.
- 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.
- Pascoal, A., Estevinho, L.M., Martins, I.M. and Choupina, A.B., 2018.** Review: Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 104, 119-126.
- 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.
- Patkar, S. and Björkling, F., 1994.** Lipase inhibitors. In *Lipases: their structure, biochemistry and application*. Cambridge University Press, Woolley, P. and Petersen, S.B. (Ed.), 207–224.
- Polizelli, P.P., Tiera, M.J. and Bonilla-Rodriguez, G.O., 2008.** Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *pachira aquatica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 749-753.
- 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.
- Quyen, D.T., Schmidt-Dannert, C. and Schmid, R.D., 2003.** High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. *Protein Expression and Purification*, 28, 102-110.
- Rahman, R.N.Z.R.A., Baharum, S.N., Basri, M. and Salleh, A.B., 2005.** High- yield purification of an organic solvent- tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochemistry*, 341, 267-274.
- Ramani, K., Chockalingam E. and Sekaran, G., 2010.** Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 531-535.
- Rao, P. and Divakar, S., 2001.** Lipase catalyzed esterification of α -terpineol with various organic acids. application of the Plackett-Burman design. *Process Biochemistry*, 36, 1125–1128.
- Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R. K. and Gupta, R., 2000.** A hyper-thermostable, alkaline from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, 22, 495–498.
- Ratledge, C. and Kristiansen, B., 2006.** *Basic Biothechnology*. Cambridge University Press, Third edition, 683 s.
- Reetz, M., 2002.** Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 145–150.

- Reetz, M.T. and Jaeger, K.E., 1998.** Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chemistry Physics of Lipids*, 93, 3–14.
- Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Pastor, F.I.J., Díaz, P. and Saso, L., 2004.** Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*-related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1672, 184– 91.
- Ruiz, C., Pastor, F.I.J. and Díaz, P., 2003.** Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 354–359.
- Sabri, S., Rahman, R.N.Z.R.A., Leow, T.C., Basri, M. and Salleh, A.B., 2009.** Secretory expression and characterization of a highly Ca²⁺ activated thermostable L2 lipase. *Protein Expression and Purification*, 68, 161-166.
- Salameh, M. and Wiegel, J., 2007.** Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*, 61, 253-283.
- Sangeetha, R., Arulpani, I. and Geetha, A., 2011.** Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview. *Research Journal of Microbiology*, 6, 1-24.
- 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., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. and Gulati, R., 1999.** Microbial lipases: potential biocatalyst for the future industry, *Current Science*, 77, 101–115.
- Savelli, G., Spreti, N. and Di Profio, P., 2000.** Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5, 111-117.
- Saygideğer Demir, B. and Tükel, 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., 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.

- Seren, Ş., 2013.** *Acinetobacter psychrotolerans* Suslarından İzole Edilen Lipazın Karakterizasyonları. Yüksek Lisans Tezi. Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun, Türkiye, 98 s.
- Sharma, D., Sharma, B. and Shukla, A.K., 2011.** Biotechnological approach of microbial lipase: A review. *Biotechnology*, 10, 1, 23-40.
- Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C., 2001.** Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627–662.
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L. and Gupta, J., 2002.** Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*, 37, 1075-1084.
- Sharma, S. and Gupta, M.N., 2001.** Alginate as a macroaffinity ligand and an additive for enhanced activity and thermostability of lipases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33, 161-165.
- Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H. and Kato, Y., 1998.** Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 304-307.
- 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.
- 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.
- Singh, S. and Banerjee, U.C., 2007.** Purification and characterization of trans-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 42, 1063–1068.
- 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.
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y. and Tsunasawa, S., 1992.** Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Biochemistry*, 112, 598–603.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T. and Esaki, N., 2001.** Cold-active lipolytic activity of Psychrotrophic *Acinetobacter* sp. Strain No.6. *Journal*

Bioscience and Bioengineering, 92, 2, 144–148.

- Şahan, M., 2018.** Haşhaş (*Papaver Somniferum L.*) Tohumundan Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, Türkiye, 50 s., 12.
- Şimşek, B.S., 2017.** Ilımlı Halofil *Bacillus* Türlerinden Lipaz Enziminin İzolasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 49 s.
- Takac, S. and Marul, B., 2008.** Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35, 1019–1025.
- 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.
- 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.
- Tekiner, R., 2011.** *Bacillus megaterium* m22'den Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 119 s., 18.
- Telefoncu, A., 1986.** Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, İzmir, 22 Eylül-3 Ekim, 326 s.
- Telefoncu, A., 1995.** Biyoteknoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi yayınları, 357 s.
- 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.
- Tutar, H., 2009.** *Candida Rugosa* Lipaz Enziminin Sporopollenin Üzerine Adsorbsiyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye, 94 s., 17.
- Van Oort, M.G., Deever, A.M.T.J., Dijkman, R., Tjeenk, M.L., Verheij, H.M., Haas, G.H. de, Wenzig, E. and Gotz, F., 1989.** Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. Biochemistry, 28, 9278-9285.
- Verger, R., 1997.** Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. Trends in Biotechnology, 15, 32-38.
- Villeneuve. P., Muderhwa, J.M., Graille, J. and Haas, M.J., 2000.** Customizing lipases for Biocatalysis: a survey of chemical, physical 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, S.P., Laurin, N., Himms-Hagen, J., Rudnicki, M.A., Levy, E., Robert, M.F., Pan, L., Oligny, L. and Mitchell, G.A., 2001.** The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obesity*, 9, 2, 119-128.
- Wang, X., Yu, X. and Xu, Y., 2009.** Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 94-102.
- 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, 433-438.
- Yadav, G.D. and Trivedi, A.H., 2003.** Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in nonaqueous media. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 783–789.
- Yoo, H.Y., Simkhada, J.R., Cho, S.S., Park, D.H., Kim, S.W., Seong, C.N. and Yoo, J.C., 2011.** A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 6104-6111.
- Zhang, Y., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Shi, P., Wu, N., Fan, Y., Li, J. and Yao, B., 2008.** A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 346–352.
- Zhao, L., Xu, J., Zhao, J., Pan, J., Wang, Z. 2008.** Biochemical properties and potential applications of an organic solvent tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochemistry*, 1-30
- 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, 3-4, 127-132. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.01.006.

ÖZGEÇMİŞ

07.02.1978 tarihinde Trabzon İli'nde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon İli'nin Yomra ilçesi'nde tamamladı. 2000 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği programından mezun oldu. 2001 yılında Sivas Zara İmam Hatip Lisesi'nde öğretmenlik görevine başladı. Sivas ve Rize illerinde değişik okullarda görev yaptı. 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir. Çayeli Yamantürk Ortaokulunda öğretmenlik mesleğine devam etmekte olup, evlidir.

