

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Anoxybacillus* sp. PDF1 LİPAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fulya AY

**HAZİRAN 2010
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Anoxybacillus* sp. PDF1 LİPAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Biyolog Fulya AY

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21.05.2010
Tezin Savunma Tarihi : 17.06.2010**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Edip KEHA**

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

“*Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geninin klonlanmasını, ekspresyonunu ve enziminin karakterizasyonunu“ konu alan bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan ve yol gösteren Hakan KARAOĞLU’na teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Aynı zamanda bana her an destek olan Kadriye İNAN’a, Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Murat KAÇAĞAN’a, Zümrüt ÖZTEKİN’e ve tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma, çalışma konum hakkında bilgilerinden yararlandığım Rize Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç. Dr. Özlem FAİZ’e ve beni yalnız bırakmayan ailem ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Fulya AY
Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Esteraz/Lipazların Özellikleri.....	3
1.2.1. α/β Hidrolaz Katlanması.....	4
1.2.2. Bakteriyel Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması.....	5
1.3. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları.....	6
1.3.1. Lipaz/Esteraz Katalizli Hidroliz Reaksiyonu	8
1.3.2. Esterifikasyon ve Transesterifikasyon Reaksiyonları	9
1.4 Esteraz/Lipaz Üreten Organizmalar	10
1.5. Bakterilerde Lipaz/Esteraz Aktivite Tespit Yöntemleri	11
1.5.1. Kalitatif Analiz	12
1.5.2. Titrimetri	12
1.5.3. Spektrofotometrik Analiz	13
1.5.4. Florimetrik Analiz	13
1.5.5. Kromatografik Prosedür	14
1.5.6. İmmunolojik Metodlar	14
1.6. Lipaz Üretimi	14
1.7. Lipazların Saflaştırılması	15
1.8. Termofilik Bakterilerin Özellikleri	16
1.8.1. Habitatları	16
1.8.2. Diğer Bakterilerden Ayıran Özellikleri	17

1.9.	<i>Anoxybacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	18
1.10.	Lipaz/Esterazların Endüstriyel Önemleri	19
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	24
2.1.1.	Kullanılan Kimyasallar	24
2.1.2.	Kullanılan Hücreler	24
2.2.	Moleküler Çalışmalar	24
2.2.1.	Primer Sentezi	24
2.2.2.	Genomik DNA İzolasyonu	25
2.2.3.	Lipaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi	26
2.2.4.	Lipaz Geninin pET-28a (+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	26
2.3.	Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması	27
2.3.1.	Lipaz Aktivitesinin Ölçümü	27
2.3.2.	Petride Lipaz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi	28
2.3.3.	Protein Konsantrasyonu Tayini	28
2.3.4.	Hücre Üretimi	29
2.3.5.	Hücre Ekstratının Elde Edilmesi	29
2.3.6.	Lipazın Saflaştırılması	29
2.3.6.1.	Isı Şoku Uygulaması	29
2.3.6.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi	30
2.3.7.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	30
2.4.	Lipazın Karakterizasyonu	31
2.4.1.	Optimum Sıcaklık	31
2.4.2.	Optimum pH	31
2.4.3.	Enzim Kinetiği	32
2.4.4.	pH Kararlılığı	32
2.4.5.	Isıl Kararlılığı	32
2.4.6.	Metal İyon Etkisi	32
2.4.7.	İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	33
3.	BULGULAR	34
3.1.	<i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 Lipaz Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi	34
3.2.	Lipaz Geninin Vektöre (pET28 a+) Klonlanması ve Ekspresyonu	35
3.3.	Lipaz Aktivitesi	36
3.4.	Petride Lipaz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi	36

3.5.	LipazınSaflaştırılması.....	37
3.5.1.	Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları	37
3.5.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi ve Jel Görüntüsü	37
3.6.	LipazınKarakterizasyonu.....	38
3.6.1.	Optimum Sıcaklık.....	38
3.6.2.	Optimum pH.....	39
3.6.3.	Kinetik İncelemeler	40
3.6.4.	pH Kararlılığı	41
3.6.5.	Isıl Kararlılığı	42
3.6.6.	Metal İyon Etkisi	42
3.6.7.	İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	43
4.	TARTIŞMA.....	44
5.	SONUÇLAR	47
6.	ÖNERİLER	49
7.	KAYNAKLAR.....	50
8.	EKLER	57
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Lipazlar (triasilgliserol hidrolazlar; EC.3.1.1.3) lipid-su arayüzeyinde trigliseritlerin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Mikrobiyal lipazlar, deterjan, transesterifikasyon ve kiral bileşiklerin sentezlenmesi açısından endüstriyel açıdan oldukça ilgi çekmektedirler. Termofilik mikroorganizmaların lipazları sıcaklık ve kimyasal denatürasyona karşı dirençli olduklarından dolayı endüstriyel süreçlerde önemli rolleri vardır.

Bu çalışma *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geninin klonlanmasını, gen ürününün izolasyonunu ve karakterizasyonunu konu almaktadır. PDF1 lipazını kodlayan 740 nt' lik genin baz dizilimi belirlenerek pET28a+ vektörüne klonlandı. Geni içeren vektör, *E.coli* BL21 hücrelerine aktararak lipaz ekspres edildi ve saflaştırıldı. Saflaştırılan lipazın maksimum aktivitesi 60°C pH 8'de incelendi. *p*-nitrofenil butirat için olan 0,348 mM K_m değeri ile diğer birçok lipaz enzimlerine göre daha düşük bir K_m değerine sahip olduğu belirlendi. Mg^{+2} , Li, Ca^{+2} , K, Zn^{+2} , ve Co^{+2} metal iyonlarının etkisi incelendi. PDF1 lipazının moleküler ağırlığı 28 kDa olarak tespit edildi. Elde edilen veriler ışığında, enzimin biyokimyasal özellikleri, enzimin önemli bir endüstriyel enzim olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Anoxybacillus*, Lipaz, Ekspresyon

SUMMARY

Cloning, Expression and Characterisation of Lipase From *Anoxybacillus* sp. PDF1

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases; EC.3.1.1.3) catalyze the hydrolysis of triglycerides at the oil-water interface. Microbial lipases have currently received considerable attention with regard to biotechnological applications for detergents, transesterification and chiral compound synthesis. In particular, lipases from thermophiles are expected to play a significant role in industrial processes, since they are thermostable and resistant to chemical denaturation.

This work describes the cloning, isolation, and characterization of lipase from *Anoxybacillus* sp. PDF1. A 740 nt lipase gene coding for lipase from *Anoxybacillus* sp. PDF1 sequenced and cloned into pET28a+ vector. Vector encoding this gene was transformed into *E.coli* BL21, expressed and purified. The purified lipase showed optimal activity at 60°C in pH 8. It was determined that the enzyme had a lower K_m (0,348 mM) for paranitrophenylbutyrate than most of the lipases. Metal ion effects to lipase were observed with chloride salts of Mg^{+2} , Li, Ca^{+2} , K, Zn^{+2} , ve Co^{+} metal ions. The molecular mass of the lipase was determined to be 24 kDa on SDS-PAGE. In the light of all data it has been suggested that the enzyme's biocatalytic properties proved to be one of the important industrial enzymes.

Key Words: *Anoxybacillus*, Lipase, Expression

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'e ait lipase α/β hidrolaz katlanmasının sekonder yapısı ..	4
Şekil 2. α/β hidrolaz katlanmasının sekonder yapısı	4
Şekil 3. Lipaz / Esteraz katalizli reaksiyon denklemi	9
Şekil 4. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipaz geninin PGEM-T easy vektörüne klonlanması.....	34
Şekil 5. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipaz geninin pET28a+ vektörüne klonlanması	35
Şekil 6. LB- Rodamin B agar petrilerinde PDF1 lipaz aktivitesi.....	36
Şekil 7. Saflaştırılmış rekombinant <i>Anoxybacillus</i> sp.PDF1 lipazının SDS-PAGE analizi.	37
Şekil 8. İyon değişimi grafiği	38
Şekil 9. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının optimum sıcaklık grafiği	39
Şekil 10. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının optimum pH grafiği	39
Şekil 11. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının Michaelis- Menten eğrisi	40
Şekil 12. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının Lineweaver-Burk eğrisi	40
Şekil 13. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının Kcat grafiği	41
Şekil 14. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının pH kararlılığı.....	41
Şekil 15. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının ısı kararlılığı.....	42
Şekil 16. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazına metal iyonlarının etkisi	43

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Lipolitik enzim aileleri (Arpigny vd., 1999)	7
Tablo 2. Lipaz üreten bazı organizmalar	11
Tablo 3. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları	22
Tablo 4. Ticari olarak elde edilen mikrobiyal lipazlar (Jaeger ve Reetz, 1998).....	23
Tablo 5. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipaz geninin diğer mikroorganizmalara % benzerliği. .	35
Tablo 6. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının aktivitesi	36
Tablo 7. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazının saflaştırma tablosu	38
Tablo 8. <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1 lipazına inhibitör ve aktivatörlerin etkisi	43

SEMBOLLER DİZİNİ

BSA	: Bovin Serum Albumin
LB	: Luria-Bertani
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PNPB	: p-nitrofenilbutirat
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS- PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
UV	: Ultraviolet
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ϵ	: Molar absorblama katsayısı
kDa	: Kilodalton
mA	: Miliamper
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
$V_{\max}$	: Maksimum hız
μM	: Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Biyoteknoloji, çok çeşitli alanlarda gelişme gösteren ve günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerin de yaygın şekilde kullanımıyla birlikte, giderek moleküler biyoteknoloji şeklinde transformasyon geçiren, çok yeni ve geleceğe damgasını vuracak bir alandır. Ticari alanda kullanılan ürünlerin üretilmesi ile ilgili çalışmaların giderek hız kazanması sonucu, önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkelerin bu konuda tamamen dışa bağımlı olmaları dikkate alındığında, bu konu daha da önemli duruma gelmektedir.

Enzimler, kimyasal reaksiyonları büyük bir spesifiklikle ve hızını artırarak katalizlerler. Bütün bu enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar, canlı organizmaların metabolizmasının temeli olup randımanlı ve ekonomik olarak biyokatalitik değişim uygulamalarında endüstri için muazzam fırsatlar sağlamaktadır (Van Beilen ve Li, 2002). Biyolojik sistemlerde olduğu kadar endüstriyel uygulamalar içinde önemli özelliklere sahip olan enzimler, asitler, bazlar ya da metal oksitler gibi inorganik katalistlerin tersine son derece seçici ve verimli olmaları, ılımlı şartlarda çalışmaları ve biyolojik olarak parçalanabilmeleri gibi pek çok avantaja sahiptirler. Bu özellikleri sebebiyle endüstri açısından büyük önem taşımaktadırlar (Sağiroğlu, 1999). Günümüzde enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda prosesi, ziraat, tekstil, deri sektörü, birçok endüstriyel malzemenin üretimi ve islenmesi, çeşitli toksik maddelerin muamelesi gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Telefoncu, 1997; Karademir vd., 2002). Enzimler bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı orijinlerden elde edilmektedir. Fakat potansiyel endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimler geniş çapta kullanılmaktadır (Sağiroğlu, 1999). Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi pazar faktörleri tarafından da etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim nispeten kolay elde edilebilir. Fakat, bitkisel kaynakların da endüstriyel hammadde olarak kullanılmaları, gıda ihtiyaçlarına bağlıdır. Mikrobiyal enzimler ise büyük çapta üretimi mümkün kılacak

yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca, mikroorganizmaların üreme süreleri kolaylıkla enzimlerin pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir (Telefoncu, 1986). Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görünmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Topal vd., 2000).

Endüstrilerin ihtiyaç duyduğu enzimlerden bir grubu da lipazlar/esterazlar oluşturur. Esterazlar, (EC 3.1.1.x) organik çözücü ortamında, ester bağlarının oluşumunu ve sulu ortamlarda ise bu bağların hidrolizini ve modifikasyonunu (transesterifikasyon) katalizleyen hidrolaz sınıfı ve oldukça ilgi çeken enzimlerdir. Bu enzimler tarafından katalizlenen esterleşme/hidroliz reaksiyonları genellikle yüksek bir stereoseçicilik ile yani sadece tek bir ürünün oluşmasıyla gerçekleşir ki, bu durum lipazların/esterazların farmakoloji, gıda mühendisliği ve kimya endüstrilerinde önemli bir biyokatalizör olmasını sağlar. Böylece enzimler kullanılarak ılımlı şartlarda ve çok kısa zaman dilimlerinde, yüksek verim ve saflıkta endüstrinin ihtiyaç duyduğu maddeler üretilebilmektedir (Bornshcheuer ve Kazlauskas, 1999; Kawamoto vd., 1987).

Lipazların/esterazların endüstride birçok alanda kullanıma girmesi bu enzimlerle ya da bu enzimleri üreten mikroorganizmalarla ayrıntılı çalışmaların yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmalar, lipaz/esteraz üreten yeni mikroorganizmaların izole edilmesi ve tanınması, bu enzimlerin saflaştırılması, immobilizasyonu (tutuklanması), ekspresyonu ve karakterize edilmesi ile yüksek sıcaklık, pH, organik çözücüler, çeşitli yükseltgen/indirgenlere karşı kararlı olmasının ve aktivasyonunun sağlanması olarak özetlenebilir. Özellikle yağlarla ilgili son zamanlarda yapılan çalışmalar, kimyasal işlemlerin yerini biyolojik işlemlere terk etmesi konusunda yoğunlaşmaktadır. Bunun en temel sebebi kimyasal işlemlerde yan ürün oluşma ihtimalidir ve yan ürün sayısı çoktur ve ayrıca yüksek sıcaklık, basınç, pH vb. gibi olağanüstü şartlar gerektirir. Dolayısıyla kimyasal yöntemler biyoteknolojik yöntemlere göre çoğu kez daha az ekonomiktirler. Endüstride son yıllarda termofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar tercih edilmektedir. Termofilik bakteriler ekstrem sıcaklık şartlarında yaşamaya adapte olmuş canlılar olup, bunların içerdiği termofilik enzimler son zamanlarda biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin endüstri alanlarında tercih edilme nedenleridir. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftir. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek

kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır, çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg, 2003). Ayrıca bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev, 1993; Kumar ve Swati, 2001).

Endüstri alanında oldukça fazla ihtiyaç duyulan lipazlar ile ilgili yapılacak çalışmalar, bu alana oldukça önemli katkılar sağlayacaktır.

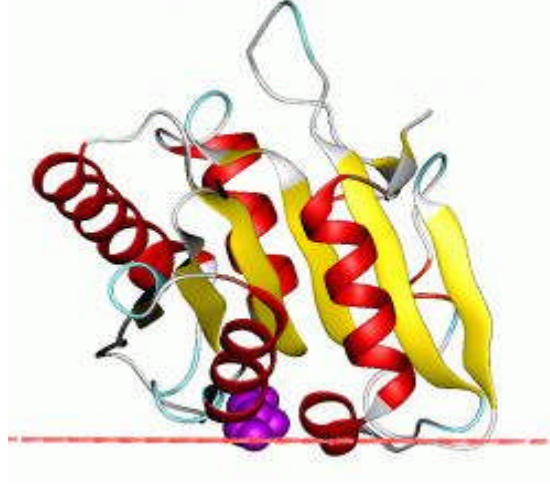
1.2. Esteraz/Lipazların Özellikleri

Lipazlar (EC 3.1.1.3) ve esterazlar (EC 3.1.1.1) ester bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Hidrolizledikleri ester bağlarına bağlı olarak esterazlar, birçok alt sınıfa ayrılırlar. Karboksil ester hidrolazlar (EC 3.1.1.x), tiyoesterazlar (EC 3.1.2.x), fosforik monoester hidrolazlar (EC 3.1.3.x), fosfodiester hidrolazlar (EC 3.1.6.x), difosforik monoesteraz (EC 3.1.7.x), fosforik triester hidrolazlar (EC 3.1.8.x) esterazların alt sınıflarını oluştururlar. Bu enzimler insan, hayvan ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Schmid vd., 1998). Karboksil ester hidrolazların (EC 3.1.1.x) iki önemli sınıfı mevcuttur ki bu türler bakteriler tarafından da üretilmektedir. Bunlar; lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve gerçek esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilesterazlar). Her iki enzimin üç boyutlu yapısı karakteristik α/β -hidrolaz katlanması oluşturur. Lipazlar katalitik bölgede G-X1-S-X2-G aminoasit sırasına sahiptir. (G= glisin S=serin X1= histidin X2= glutamik veya aspartik asit)(Svedsen ,1994). Birkaç yıl öncesine kadar tüm lipazların ve esterazların aktif bölgede Gly-X1-Ser-X2-Gly aminoasit sekansına sahip olduğu düşünülüyordu. Daha sonraları lipazların karşılaştırılan 53 aminoasit sekansı göstermişti ki, bundan başka aminoasit sekansına sahip lipazlar ve esterazlar da vardır. Örneğin *Streptococcus scabies*, aktif bölgede Gly-Asp-Ser-Leu aminoasit sekansına sahiptir.

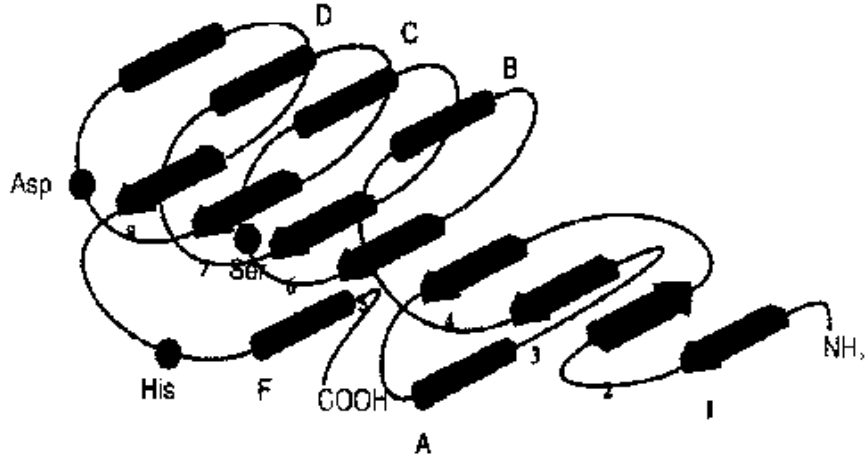
Esterazlar suda çözünebilen substratlarda etkilidir ve kısa zincirli yağların reaksiyonlarını katalizlerler.(C<12) Buna karşılık lipazlar, suda çözünemeyen yağlarda etkilidirler ve uzun zincirli yağların reaksiyonunu katalizlerler.(C>12) (Jaeger vd.1994)

1.2.1. α/β Hidrolaz Katlanması

α/β hidrolaz katlanması, $\alpha/\beta/\alpha$ sandviçi oluşturacak şekilde beşten sekize kadar α -helikslerle bağlanmış bir β -sheet kordan oluşan bir yapıdır. Çoğu familyada β -sheet paraleldir. Katalitik bölgede Ser-Asp-His üçlüsü yer almaktadır.



Şekil 1. *Bacillus thuringiensis*'e ait lipase α/β hidrolaz katlanmasının sekonder yapısı



Şekil 2. α/β hidrolaz katlanmasının sekonder yapısı

1.2.2. Bakteriye Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin sınıflandırılması, substrat spesifitelerine, aminoasit sekansına ve gen dizi analizlerine göre yapılabilir. Lipazların ve esterazların yapıları hakkında bilgiler son yıllarda bir çok gen dizisinin açıklanmasıyla ve kristal yapıların aydınlatılmasıyla birlikte büyük ölçüde artmıştır. Böylelikle, farklı kaynaklardan elde edilen enzimler karşılaştırılabilir olmuştur. Diğer taraftan yüksek dizin homolojisi enzimlerin benzer substrat spesifitesine, benzer optimum pH ya da sıcaklığa sahip olduklarını göstermemektedir. Hatta bazı durumlarda da benzer bir dizine sahip enzimlerin tamamıyla farklı reaksiyonları katalizledikleri görülmektedir.

Bakteriyel lipolitik enzimler, amino asit sekansları ve biyolojik özellikleri esas alındığında temel olarak 7 sınıfa ayrılmaktadır (Arpigny ve Jaeger, 1999).

I. Aile I

Gerçek lipazlar olarak adlandırılırlar ve 6 alt sınıftan oluşmaktadır. *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus* gibi bakterilerin lipazları bu sınıfa dahildir.

II. GDSL ailesi

Klasik Gly-X1-Ser-X2-Gly aminoasit sırası yerine Gly-Asp-Ser-Leu sırasına sahiptirler. Aktif serin kısmı, N-terminal uca diğer lipazlardan daha yakındır. *Streptococcus*, *Salmonella* gibi bakteriler bu sınıfta yer alır.

III. Aile III

Bu enzim ailesi ilk olarak Cruz ve arkadaşları (1994) tarafından tanımlanmıştır. *Moraxella* cinsleri bu sınıfa dahildir.

IV. Hormon duyarlı lipaz ailesi

Bu sınıf enzimlerin aminoasit sırası, memeli hormon duyarlı lipazı aminoasit sırası ile benzerlik göstermektedir. Memeli hormon duyarlı lipazı ve *Moraxella* suşundan elde edilen lipaz oldukça düşük sıcaklıklarda (15 °C'nin altında) yüksek aktiviteye sahiptirler. Bu durumun, korunmuş sıralarından kaynaklandığı düşünülmüş olsa da benzer aminoasit sırasına sahip mezofilik (*Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*) ve termofilik (*Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Archeoglobus fulgidus*) bazı mikroorganizmaların aynı şekilde davranmaması bu tür bir davranışın aminoasit sırasından kaynaklanmadığını ortaya koymaktadır (Arpigny ve Jaeger, 1999).

V. Aile V

Bu sınıf lipolitik enzimlerin çoğu *Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus* gibi mezofil bakteri kökenlidir. Aminoasit sıraları

α/β -hidrolaz yapısına sahip ve katalitik üçlü içeren epoksit hidrolaz, dehalojenaz ve haloperoksidaz gibi lipolitik olmayan enzimlerle benzerlik gösterir.

VI. Aile VI

23-26 kDa'luk molekül ağırlıklarıyla bilinen en küçük esteraz sınıfını oluştururlar. *Pseudomonas fluorescens* karboksil esterazının üç boyutlu yapısı belirlenmiştir. Bu enzimin aktif formu bir dimerdir ve alt birimleri alfa/beta-hidrolaz yapısına sahiptir ve klasik Ser-Asp- His katalitik üçlüsünü içerir. Bu karboksil esteraz küçük substratları hidrolizlemesine rağmen uzun zincirli trigliseritlere karşı aktivite göstermemektedir. Bu ailede yer alan enzimler hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Aminoasit sırasını veren gen sıraları başka gen sıralarıyla benzerlik göstermemektedir. Bununla birlikte yalnızca bir tane enzimin ökaryotik lizofosfolipaz ile (Ca^{+2} a bağımlı olmayan lizofosfolipaz A2) ile %40 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Arpigny ve Jaeger, 1999). *Spirulina platensis*, *Rickettsia* lipazları bu sınıfa dahildir.

VII. Aile VII

Bu sınıf bakteriyel esterazlar Aile VI enzimlerine göre daha büyük molekül ağırlığına (yaklaşık olarak 55 kDa) sahiptirler. Homolojileri, ökaryotik asetilkolin esteraz, bağırsak ya da karaciğer karboksil esterazları (domuz karaciğer esterazı) ile oldukça benzerdir. *Bacillus subtilis* esterazı p-nitrobenzil esterlerini hidrolizleyebilmektedir.

VIII. Aile VIII

Bu aileyi meydana getiren üç enzim de yaklaşık 380 aminoasit içermekte ve C (3-laktamaz sınıfı enzimlerle benzerlik göstermektedir (Arpigny ve Jaeger, 1999). Bu ailedeki esterazların katalitik mekanizmasını açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

1.3. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları

α/β -hidrolazların sekonder yapılarının 5-6 kadar alfa -sarmal ve 8 kadar da beta-tabaka yapısından ibaret olduğu ve aktif bölgede bulunan katalitik üçlünün (Ser-His-Asp/Glu) hidrofobik aminoasitlerce (Phe, Trp, ile, Leu ve Try gibi) zengin, 1 veya 2 alfa-sarmal yapıda polipeptid zincirinden ibaret, bir kapakla kuşatıldığı bilinmektedir (Jaeger ve

Reetz, 1998). Bu hidrofobik birimlerin çoğu lipazların lipid-su arayüzeyine tutunabilmesi için görev görürler ve böylece lipid yüzeyinin hidrofobik kısmına enzimin nüfuz 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 hidrofobik bir yarık oluşur. Bu yarık acil gruplarının ulaşabilmesi için uzanmış bir cep şeklindedir. Bir çok 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).

Tablo 1. Lipolitik enzim aileleri (Arpigny vd., 1999)

Aile	Subaile	Enzim üreten Suşlar	Benzerlik (%)		Özellikleri
			Aile	Subaile	
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>	D50587	100	True lipases
		<i>Pseudomonas fluorescens C9</i>	AF031226	95	
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57	
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X60800	43	
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40	
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39	
	2	<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38	100
		<i>Burkholderia glumae*</i>	X70354	35	
		<i>Chromobacterium viscosum*</i>	Q05489	35	
		<i>Burkholderia cepacia*</i>	M58494	33	
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	
		<i>Pseudomonas fluorescens SIK W1</i>	D11455	14	
	3	<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51
		<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16	
	4	<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80
		<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	
	5	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	
		<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	
		<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	U80063	14	
II (GDSL)		<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100	Secreted acyltransferase
		<i>Streptomyces scabies*</i>	M57297	36	Secreted esterase
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35	OM-bound esterase
		<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28	OM-bound esterase
		<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379	28	Secreted esterase
		<i>Streptomyces exfoliatus*</i>	M86351	100	Extracellular lipase
		<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82	Extracellular lipase
		<i>Moraxella sp.</i>	X53053	33	Extracellular esterase 1
		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100	Esterase
		<i>Pseudomonas sp. B11-1</i>	AF034088	54	Lipase
IV (HSL)		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48	Carboxylesterase
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	I36817	40	Putative lipase
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36	Carboxylesterase
		<i>Moraxella sp.</i>	X53668	25	Extracellular esterase 2
	V	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100	PHA-depolymerase
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41	Putative esterase
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34	Extracellular esterase
		<i>Moraxella sp.</i>	X53669	34	Extracellular esterase 3
	VI	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32	Esterase
		<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	20	Esterase
		<i>Synechocystis sp.</i>	D90904	100	Carboxylesterases
		<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50	
VII		<i>Pseudomonas fluorescens*</i>	S79600	24	
		<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20	
		<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16	
		<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100	Carbamate hydrolase
		<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48	p-Nitrobenzyl esterase
		<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45	Putative carboxylesterase
	VIII	<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492	100	Stereoselective esterase
		<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43	Cell-bound esterase
		<i>Pseudomonas fluorescens SIK W1</i>	AAC60471	40	Esterase III

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 (Bornscheuer, 2002) (Şekil 3).

1- İlk basamakta aktif bölgedeki serin biriminin substratın karbonil karbonuna nükleofilik saldırısıyla tetrahedral bir ara ürün oluşur. Bu ara ürün histidin ve asparagin amino asitleri 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.

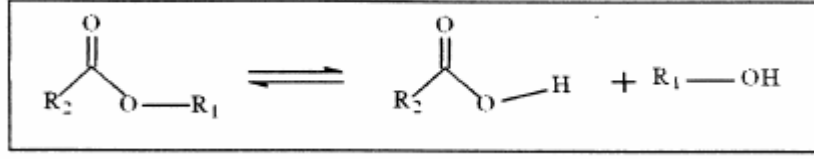
4- Son olarak bir asit ya da esterin ayrılması ile enzim yeniden elde edilir (Bornscheuer ve Kazlauskas, 1999).

Her iki tetrahedral ara ürün bir oksianyona sahip olup bu oksianyon, oksianyon boşluğundaki protein atomlarının hidrojen bağı kapasitesi ile kararlı kılınır (Gandhi vd., 2000).

Lipazlar ve esterazlar hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon, alkolizis, aminolizis, asidolizis reaksiyonlarını katalizlerler.

1.3.1. Lipaz/esteraz Katalizli Hidroliz Reaksiyonu

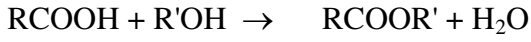
Lipazların, gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden ester sentezi reaksiyonlarından başka esterlerin gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerine hidrolizi reaksiyonlarını da katalizledikleri bilinmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998) (Şekil 2). Enzimin bu aktivitesi şüphesiz ortamın hidrofobisitesine bağlı olmakla birlikte, lipazların yağların hidrolizini katalizledikleri uygun ortamın lipid-su arayüzeyi olduğu bildirilmektedir (Martinelle vd., 1995). Özellikle deterjan endüstrisinde yağ kaynaklı kirliliklerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılması, deterjan katkısı olarak lipazların kullanılmasıyla sağlanmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998). Burada lipazların hidroliz yönündeki reaksiyonu katalizledikleri bilinmektedir. Kağıt sanayinde odundan istenmeyen lipidik maddelerin uzaklaştırılmasında da lipazlar kullanılmaktadır. Nippon Paper Industries firması *Candida rugosa* lipazının odunun yapısında bulunan trigliseridlerin % 90'ını hidrolizlediği bir yöntem geliştirmiştir (Sharma vd., 2001).



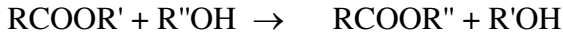
Şekil 3. Lipaz / Esteraz katalizli reaksiyon denklemi

1.3.2. Esterifikasyon ve Transesterifikasyon Reaksiyonları

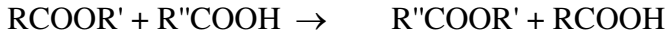
Esterifikasyon



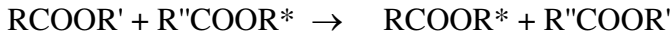
Alkolizis



Asidolizis



İnteresterifikasyon



Son üç reaksiyon genellikle birlikte sınıflandırılır ve transesterifikasyon olarak adlandırılır. Lipazların geri dönüşümlü sentez reaksiyonlarını katalizleme kabiliyetleri istenilen bazı ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Esterifikasyon, su ve ester oluşumuna yol açarken, alkolizis, asidolizis ve interesterifikasyon gibi transesterifikasyon işlemleri sırasında su yerine alkol, asit veya ester oluşur. Bu nedenle, bu oluşan ürünlerden herhangi biri istenilen bir ürün ise, transesterifikasyon reaksiyonları esterifikasyona göre daha karlı bir işlem olur. Esterifikasyon temel olarak bir asitin alkolle reaksiyonunu kapsarken, lipazlar çok daha geniş bir substrat spektrumu gösterirler. Bu da lipazlara şeker esterleri, tiyol esterleri, peptitler, yağ amidleri gibi ürünlerin sentezlerini katalizleme olanağı sağlar. Bu durumun sonucu olarak, lipazlar potansiyel uygulamalar için bilinen diğer enzimlerden çok daha önemli bir yere sahiptirler (Gandhi, 1997).

1.4. Esteraz/Lipaz Üreten Organizmalar

İnsan-hayvan, bitki ve mikroorganizmalar enzimlerin elde edilmesinde kullanılan kaynaklardır. Günümüzde, mikroorganizmalar, enzimlerin üretilmesinde en önemli ve en yaygın kaynak durumundadır (Kademi vd., 1999). Lipaz üreten mikroorganizmalar; endüstriyel atıklar, bitki yağı işleme fabrikaları, süt ürünleri, petrol veya yağ ile kirletilmiş topraklar, sıcak su kaplıcaları gibi alanlarda bulunabilmektedir. Lipaz üreten mikroorganizmalar; bakteri, maya, küflerdir (Sharma vd., 2001). Fungal lipazlarla çalışmalar 1950'lerin başında başlamış, Lawrence ve daha sonra Brockerhoff ve Jensen tarafından bu enzimler çeşitli yönlerden tartışılarak kapsamlı olarak incelenmiştir. Bundan sonra birçok araştırmacı termal stabilite, substrat özgülüğü ve organik çözücülerdeki aktivitelerinden dolayı değerli lipaz kaynağı olarak fungusları göstermişlerdir (Ghosh vd., 1996). Fungal lipazlar, grup fermentasyonunda kullanılmaları ve düşük maliyette ekstraksiyon metotlarından dolayı bugün teknolojiye tercih edilmektedir. Bu sebeplerden lipaz üretimi için funguslar araştırılmıştır. Ticari lipazların belli başlı üreticileri; *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. carneus*, *Candida cylindracea*, *Humicula lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae*'dir (Ghosh vd., 1996).

Lipazlar, bakteriler tarafından da üretilmektedir. 1901'de *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* ve *B. fluorescens*'de bu enzimlerin varlığı gözlenmiştir.

Lipaz çalışmaları *Candida sp.* , *Pseudomonas sp.* , *Bacillus sp.* , *Rhizopus sp.* , üzerinde yoğunlaşmış durumdadır.

Tablo 2. Lipaz üreten bazı organizmalar

Enzim Kaynağı	Cins	Tür
Bakteri	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
		<i>B. subtilis</i>
		<i>B. coagulans</i>
		<i>B. thermoleovorans</i> ID-1
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. canosus</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i>
	<i>Burkholderia</i>	<i>Bu. glumae</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		<i>P. putida</i> 3SK
		<i>P. glumae</i>
		<i>P. cepacia</i>
		<i>P. fluorescens</i>
		<i>P. fluorescens</i>
Mantar	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizop. delemar</i>
		<i>Rhizop. oryzae</i>
		<i>Rhizop. arrhizus</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>
		<i>A. niger</i>
		<i>A. oryzae</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Pe. cyclopium</i>
	<i>Mucor</i>	<i>Mu. Miehei</i>
	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>
		<i>C. antarctica</i>
		<i>C. cylindracea</i>
Maya	<i>Saccharomyces</i>	<i>Sa. lipolytica</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>Str. cinnamomeus</i>
Aktinomisitler		

1.5. Bakterilerde Lipaz/Esteraz Aktivitesi Tespit Yöntemleri

Lipazlar, trigliseritleri hidrolize ederler ve serbest yağ asitleri ve gliserolün meydana çıkmasını sağlarlar. O nedenle, bu enzimler için analiz metotları genel olarak serbest yağ asitlerinin oluşumunun analiz edilmesi kriterleri etrafında gelişmiştir (Jensen vd., 1983).

Serbest yağ asitlerinin oluşumunu araştırmak amacıyla kalitatif olarak jel difüzyon analizleri ve kantitatif olarak titrimetri, kolorimetrik analiz, floresans, kromatografik prosedürler (TLC/GC/HPLC) ve immünolojik metotlar kullanılmaktadır (Jaeger vd., 1994; Beisson vd., 2000; Gupta vd., 2003).

1.5.1. Kalitatif Analiz

Lipaz üreten suşlar tribütrin içeren agarda incelenebilmektedir. Dört karbonlu (Lee vd., 2001) sentetik bir trigliserit olan (Gao, 2000) tribütirinin hidrolizi ile oluşan zon ya esteraz ya da lipazı aktivitesini göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, zeytinyağı ilave edilen katı besiyerleri lipaz üreten kolonilerin seçilmesinde kullanılmıştır (Hube vd., 2000; Martinez ve Soberón-Chávez, 2001). Alternatif olarak katı besiyerlerine indikatör eklenerek renkli zon oluşumu gözlenmiştir (Gupta vd., 2003). Nile blue sülfat, Victoria blue, metil red, fenol red indikatör olarak kullanılmıştır (Lawrence vd., 1967; Converse vd., 1981; Christen ve Marshall, 1984; Samad vd., 1989). Bu testler katı besiyerlerinde lipolitik mikroorganizmaların gelişimlerini hızlı bir şekilde araştırmak için uygundur. Ancak bazı pozitif yanlış sonuçlar görülebilir. Bu mikrobiyal lipazlar tarafından serbest bırakılan yağ asitlerinin, asidik metabolitler üretmesinden dolayı ortamın asidifikasyonundan kaynaklanmaktadır (Beisson vd., 2000; Gupta vd., 2003). Bunu engellemek için Kouker ve Jaeger (1987) floresan Rhodamine B boyasını kullanarak 350 nm dalga boyunda UV ışığı altında turuncu floresan olarak lipolizis zonlarını göstermişlerdir. Rhodamin, serbest yağ asitleriyle floresan bir kompleks oluşturur. Böylece lipaz üreten koloniler UV ışığı altında floresan haleler oluşturur. Burada substrat olarak triolein (trioleoilgliserol) kullanılır (Gupta vd., 2003). Son zamanlarda bunun yerine zeytinyağı kullanılmaktadır (Jette ve Ziomek, 1994; Jarvis ve Thiele, 1997).

1.5.2. Titrimetri

Hidrolaz sınıfı enzimlerin katalizlediği reaksiyonların büyük çoğunluğunda H^+ açığa çıkar. Oluşan H^+ konsantrasyonu reaksiyon hızı ile orantılıdır (Telefoncu, 1986). Özellikle substratları suda iyi çözünmeyen hidrolazların (lipazlar gibi) aktivite tayinleri için titrasyon çok uygun bir yöntemdir (Telefoncu, 1986; Ghosh vd., 1996). Burada substrat olarak uluslararası kabul gören triolein veya buna ucuz bir alternatif olan zeytinyağı kullanılır (Jensen, 1983). Bundan başka tribütrin, triasetin (triasetilgliserol) ve tripropiyonin (tripropiyonilgliserol) de enzimatik aktivite tayininde substrat olarak kullanılabilir (Lanz ve Williams, 1973; Staubmann vd., 1999). Bununla birlikte lipazlar, kısa zincirli triaçilgliserollerle karşılaştırıldığında, triolein gibi uzun zincirli triaçilgliserollerini daha yüksek oranda hidrolize etmektedir (Gupta vd., 2003). Lipolitik reaksiyonda, asidin serbest

bırakılması titrimetrik olarak analiz edilebilir. Nicel yöntemde reaksiyon yönünde pH ölçülür (Jaeger vd., 1994). Titrimetrik metotlar zamana bağlı olarak serbest yağ asitlerinin serbest bırakılmasıyla sodyum veya potasyum hidroksitin nötralizasyon oranını ölçmektedir (Naka ve Nakamura, 1992).

1.5.3. Spektrofotometrik Analiz

Genel olarak yağ asidi zinciri çeşitli uzunluğa sahip *p*-nitrofenil esterleri substrat olarak kullanılır ve meydana gelen *p*-nitrofenol 410 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür (Winkler vd., 1979; Pencreac’h ve Baratti, 1996). Kısa zincirli esterler suda çözünür ve o nedenle bu hidroliz lipaz aktivitesinden ziyade esteraz aktivitesinin ölçülmesini sağlar. Bununla birlikte *p*-nitrofenil palmitat lipaz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılır. Bu analiz için sınırlayıcı olan enzimatik aktivitenin asidik pH’da *p*-nitrofenol’ün absorbans vermemesinden dolayı asidik pH’da yapılamamasıdır. Enzimatik aktivite sadece nötral veya alkali pH değerlerinde bu prosedürle tespit edilebilir (Kademi vd., 2000). Kalorimetrik analiz, renksiz alfa-naftil karpilat (oktanat) esterinin hidrolizi ile meydana gelen renkli alfa-naftol’un 560 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle de yapılabilir (Degrassi vd., 1999; Gandolfi vd., 2000). Alfa-naftil asetat, naftil propiyonat ve naftil bütirat gibi alfa-naftil esterleri substrat olarak kullanılmaktadır (Gupta vd., 2003). Renk üretiminin ölçülmesinden başka spektrofotometrik analizler yağ asitlerinin, kalsiyum veya bakırla çöktürülmesiyle yapılabilir. Substrat olarak Tween kullanılır. Absorbans artışı 500 nm’de ölçülür (Von Tigerstrom ve Stelmaschuk, 1989) ve bu türbidimetrik metot, basit bir yöntem olup Tween 20 ile yapılan titrimetrik analizden 36 kat, *p*-nitrofenil palmitatla yapılan spektrofotometrik analizden en az dört kat daha hassastır.

1.5.4. Florimetrik Analiz

Floresan bileşikler lipaz analizi için kullanılırlar. Metot, lipaz aktivitesinden dolayı serbest bırakılan floresan yağ asitlerinin ölçümünü gerektirir. Triaçilgliserollerin alkil grubunun, pirenil gibi floresan grupla yer değiştirmesiyle analiz gerçekleşir. Floresan özellikte serbest pirenil grupları oluşur. Triaçilgliseroller hidrolize olduktan sonra piren grupları 400 nm’de yer değiştirir (Thuren vd., 1987; Negre-Salvayre vd., 1991). Floresan olmayan 4-metilumbelliferil oleat substratı, lipaz etkisinden sonra floresan 4-

metilumbelliferon'un serbest bırakır (Jacks ve Kircher, 1967). Hızlı bir yöntem olmasına rağmen substratların pahalı olması bunların kullanımını sınırlandırmaktadır (Gupta vd., 2003).

1.5.5. Kromatografik Prosedür

Kromatografi; lipit substratında, enzim katalizinin hidrolizini takiben serbest bırakılan yağ asitlerinin doğrudan tespit edilmesi için kesin bir metottur. Spesifik kolonlar vasıtasıyla ürün veya artakalan substratın miktar tayini ve analizi yapılır. Rutin analizler için zaman alıcı olmasına rağmen substrat spesifikliğinin tayininde kullanımı tavsiye edilmektedir (Gupta vd., 2003). TLC; triağılglicerollerden serbest yağ asitlerinin kalitatif analizde, işaretlenmiş triağılgliceroller densitometrik veya autoradiografik metotları kullanılarak uygulanır. Bunlar çok hassas metotlar olmalarına rağmen zaman alıcıdır (Ruiz ve Rodriguez, 1982). GC; resmi American Oil Chemists Society metoduna göre; yağ asitleri bunların metil esterlerine çevrilir ve GC ile miktar tayinleri yapılır. HPLC; lipolizis ürünleri kolaylıkla HPLC kullanılarak tanımlanabilir. Alfa-naftil laurat'ın substrat olarak kullanıldığı Maurich vd. (1991) tarafından lipaz aktivitesini tanımlanması için HPLC metodu geliştirilmiştir.

1.5.6. İmmunolojik Metodlar

İmmunolojik metotlar veya ELISA yüksek hassasiyet ve lipazların tespiti ve miktar analizleri için spesifik sistemlerdir. Bu immünolojik metotlar aktif veya aktif olmayan lipazların tespit edilmesinde kullanılırlar (Grenner vd., 1982; Dati ve Grenner, 1984). Lipazların immünolojik tespitinde doğal veya rekombinant kaynaklardan enzimin saflaştırılmasına ihtiyaç vardır (Beisson vd., 2000).

1.6. Lipaz Üretimi

Sharma vd. (2001b), mikrobiyal lipazların çoğunlukla sıvı kültür olarak üretildiklerini, fakat katı kültür fermentasyon metotlarının ve birkaç çalışmada da immobilize hücre kültürlerinin kullanıldığını bildirmişlerdir. Sıvı kültür yöntemiyle lipaz üretiminde optimum kültür koşullarının ve besin gereksinimlerinin belirlenmesine yönelik

pek çok çalışma yapılmaktadır. Lipid yapıdaki karbon kaynakları genellikle lipaz verimini artırmaktadırlar, bununla beraber birkaç araştırmacı yağ kullanmadan iyi bir verim elde ettiklerini bildirmişlerdir (Sharma, 2001b). Karbon ve azot kaynaklarının uygunluğu, aktivatörlerin, stimülatörlerin, inhibitörlerin, surfaktanların bulunması, inkübasyon sıcaklığı ve pH'sı, inokülüm seviyesi ve kaynağı ve oksijen miktarı gibi büyüme koşulları lipaz sentezini etkileyebilmektedir (Hasan vd., 2009). Shelley (1987), lipaz-pozitif bir bakterinin belirlenebilmesi için üç faktörün birlikte bulunması gerektiğini söylemiştir: (1) organizma üremeli; (2) organizma genel büyüme koşulları altında lipaz üretmeli veya ortama salmalı ve (3) aktivite tayini için kullanılan metot yeterli hassasiyette olmalı (Hasan vd., 2009).

1.7. Lipazların Saflaştırılması

Woolley ve Peterson (1994), pek çok lipazın pH, sıcaklık, metal iyonları ve şelatlayıcı ajanlar karşısındaki aktivite ve stabiliteleri göz önüne alınarak geniş ölçüde saflaştırılıp karakterize edildiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kullanılan saflaştırma metotlarının genellikle presipitasyon, hidrofobik etkileşim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi spesifik olmayan teknikler olduğunu fakat bazı durumlarda saflaştırma adımlarının sayısını azaltmak için afinite kromatografisinden yararlanıldığını bildirmişlerdir (Sharma *et al.*, 2001b). Mikrobiyal lipazların çoğu ekstraselülerdir ve fermentasyon işleminden sonra hücreler kültür sıvısından santrifüjle veya filtrasyonla uzaklaştırılır. Daha sonra kültür sıvısı ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi veya organik çözücülerle ekstraksiyon işlemlerinden biriyle konsantre edilir (Saxena *et al.*, 2003a). Eğer enzim hücre içi ise bu defa hücreler santrifüjle kültür sıvısından ayrılır ve tekrar tamponda çözülerek parçalanır. Hücrelerin parçalanmasında sonikasyon veya French pres gibi fiziksel yöntemler kullanılabileceği gibi enzimler (bakteriler için lizozim ve mayalar için zimoliyaz) veya çeşitli kimyasalların (safra tuzu, SDS ve Triton gibi deterjanlar) kullanıldığı kimyasal yöntemler de kullanılabilir (Metin, 2007). Hücreler parçalandıktan sonra santrifüjle hücre atıkları uzaklaştırılır ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılır.

Saflaştırma işlemlerinin yaklaşık % 80'inde ilk olarak çöktürme işlemi yapılır. Çöktürme işlemlerinin % 60'ında amonyum sülfat ve % 35'inde etanol, aseton veya bir asit (genellikle hidroklorik asit) kullanılır. Aires-Barros vd. (1994), diğer tekniklerle

karşılaştırıldığında çöktürme yöntemlerinde genellikle yüksek bir ortalama verim (% 87) elde edildiğini bildirmişlerdir (Saxena *et al.*, 2003a). Çöktürme işlemini çeşitli kromatografik yöntemler izlemektedir. Çoğu zaman istenilen saflaştırma düzeyine ulaşmak için tek bir kromatografik basamak yeterli değildir ve birkaç kromatografi adımı ard arda kullanılır. Lipazların saflaştırılmasında, iyon değişim kromatografisi en çok kullanılan kromatografik yöntemdir; saflaştırma işlemlerinin % 67'sinde kullanılmışlardır ve bunların % 29'unda birden çok kez kullanılmışlardır. En çok kullanılan iyon değiştiriciler, bir anyon değiştirici olan dietilaminoetil (DEAE) (% 58) grubu ve bir katyon değiştirici olan karboksimetil (CM) (% 20) grubudur. Jel filtrasyon kromatografisi en çok kullanılan ikinci saflaştırma yöntemidir; saflaştırma işlemlerinin % 60'ında kullanılmışlardır ve bunların % 22'sinde birden çok kez kullanılmışlardır. Afinite kromatografisi saflaştırma işlemlerinin % 27'sinde, hidrofobik etkileşim kromatografisi ise % 18'inde kullanılmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde en çok kullanılan hidrofobik adsorbenler oktil veya fenil fonksiyonel grubuna sahip olanlardır (Saxena *et al.*, 2003a). Aires-Barros vd. (1994), bir proteini, % 30 verimle ve 320 katlık bir saflaştırma katsayısı ile saflaştırmak için dört veya beş tane saflaştırma adımının gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bu değerleri her bir saflaştırma planından elde edilen verimlerin ve saflaştırma katsayılarının ortalamalarından elde etmişlerdir (Saxena *et al.*, 2003a). Lipaz saflaştırmasının alışılmış işlemleri oldukça güç ve zaman alıcı olabilmektedir ve sonuçta oldukça düşük bir verim elde edilebilmektedir.

Lipazların saflaştırılmasında son zamanlarda bazı yeni saflaştırma teknolojileri uygulanmaktadır. Bunlar arasında, membran işlemleri, immüno-saflaştırma, durgun faz olarak epoksi bağlanmış ligand ve sefaroza immobilize edilmiş polietilen glikolün kullanıldığı hidrofobik etkileşim kromatografisi ve sıvı iki-faz sistemleri sayılabilir (Saxena *et al.*, 2003a).

1.8. Termofilik Bakterilerin Özellikleri

1.8.1. Habitatları

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında bunların üç ana grup altında toplandığı görülmektedir. Bunlar, ökaryotlar, bakteriler ve arkebakterilerdir (Trent 2000). Bakteriler dünya üzerinde çok geniş bir yayılım göstermektedir ve büyüyebildikleri en

uygun sıcaklıklılara göre üç grup altında toplanırlar. Sakrofiller, -10°C 'ye kadar olan düşük sıcaklıklarda büyüeyebilen fakat optimum büyüme sıcaklığı 15°C veya daha düşük sıcaklıklar olan bakterileri içermektedir. Mezofiller normal ortam sıcaklıklarında ($15-50^{\circ}\text{C}$) büyüeyebilirler ve insan sağlığı açısından patojen olan bakterileri içermektedirler. Termofiller ise genel olarak 50°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilen, hatta bazı türlerinin ise 100°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile yaşayabildiği bakteri grubudur.

Optimum büyüme sıcaklıkları $50-105^{\circ}\text{C}$ arasında olan pek çok termofilik bakteri tanımlanmıştır. Bu bakteriler yüksek sıcaklıklarda yaşayabildikleri için, bunlar aşırı termofiller ve çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadırlar. Termofiller ve aşırı termofiller yüksek sıcaklıklarda yalnızca hayatta kalmazlar, ayrıca onların büyümeleri ve çoğalabilmeleri için bu yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyarlar. Termofillerin optimum büyüme sıcaklığı 50°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarken, aşırı termofillerin optimum büyüme sıcaklığı 80°C 'nin üzerindedir. Ayrıca aşırı termofiller genellikle 60°C 'nin aşağısındaki sıcaklıklarda büyüyemezler.

Termofilik bakterilerin doğal yaşam alanları, dünya üzerinde çok geniş yayılım gösterir. En yaygın ve erişilebilir alanları, termal alanlar, kaplıcalar ve jeotermal sıcak topraklardır. Termofilik bakteriler ilk olarak 1879 yılında Miquel tarafından topraktan, çöplerden, dışkı ve pisliklerden, kanalizasyon ve nehir çamurlarından izole edilmiştirler. İzole edilen bu termofilik bakteriler, 72°C 'de büyüebilmekteydiler (Miquel, 1888).

1.8.2. Termofillerin Diğer Bakterilerden Farklı Olan Yönleri

Yüksek sıcaklıklarda büyümeyi sınırlayan faktörlerin ne olduğu veya büyümenin üst sıcaklığının ne olduğu, halen açıklanamamaktadır. Ancak, termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklarda hücre ve moleküllerinin fonksiyonel halde kalmasına izin verecek çeşitli adaptasyonlara sahiptirler. Bu adaptasyonlar şu şekilde incelenebilir.

DNA yapısı: Lineer çift zincirli DNA 65°C 'de termal denatürasyona uğrarken süpersarmal plazmitlerin en az 107°C 'ye kadar termal denatürasyona dirençli olduğu görülmektedir. Plazmit DNA'sı topolojik olarak kapalı olduğu için termal denatürasyona karşı daha dirençlidir. Plazmit DNA'sı termal denatürasyona dirençli olmasına rağmen, termal degradasyona karşı dirençli değildir. Marguet ve Foreterre (1994) yapmış oldukları bir çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun, çift zincirli DNA'yı 107°C 'de termal degradasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Tuzlar tarafından DNA'nın termal

degradasyona karşı korunması, termofilik bakterilerin yaşamı ile ilgilidir. Çünkü termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptirler.

Protein yapısı: Termal proteinler, mezofilik proteinlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini korurlar ve kararlı halde kalırlar.

Querol ve arkadaşları (1996) yaptıkları bir çalışmada, termal kararlılığı arttıran en az 13 farklı fiziksel ve kimyasal faktörün olduğunu göstermiştir. Bu faktörlerden bazıları tuz köprülerinin optimizasyonu, daha kısa halkalar, halkalarda glisin miktarının azaltılması ve prolin miktarının artırılması, hidrojen bağları ve proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlemelerdir.

Hücre membran yapısı: Normal sıcaklıklarda yaşayan canlı organizmalar, lipid bilayer yapısında bir hücre membranına sahiptirler ve lipid bilayer membran yapısı ısıya karşı dirençli değildir. Hipertermofiller, yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilmeleri için lipid monolayer yapısında olan değişik bir membran yapısına sahiptirler. Bu hücre membranı, yüksek sıcaklıklarda erimeye karşı direnç gösterir. Ayrıca arkeobakteriler, hücre membran yapılarında sıcaklığa ve degradasyona karşı dirençli olan eter lipidlerini içerirler.

Termofilik organizmaların hücre membran proteinlerinin en önemli özelliği daha etkili ve sıkı bir şekilde katlanabilen aminoasitlere, daha yoğun bir şekilde sahip olmasıdır. Aspartik ve glutamik asitler içerdikleri amin gruplarından dolayı heliks yapısını kuvvetlendirirken, glisin ve serin kuvvetli hidrojen bağı yapma özelliklerinden dolayı proteininin daha iyi katlanmasını ve ısıya karşı daha yüksek bir direnç göstermesini sağlar. (Senes vd., 2000; Zhou vd., 2001; Adamian ve Liang, 2002; Rinia vd., 2002)

RNA yapısı: Galtier ve arkadaşları (1999) yapmış oldukları bir çalışmada, rRNA'nın GC içeriği ile optimum büyüme sıcaklıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu göstermiştir.

1.9. *Anoxybacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Anoxybacillus cinsi Pikuta ve arkadaşları tarafından 2000 yılında *Bacillus* cinsinden ayrılıp bakteri sistematigine kazandırılmış olan yeni bir cinstir. Bu cinsin tip türü *Anoxybacillus pushchionensis* K1^T'dir İlk izole edildiğinde *Anoxybacillus pushchionensis* bakterisinin anaerob bir bakteri olduğu düşünüldüğünden, üremesi için oksijen gerektirmeyen anlamına gelen “anoksi” eki cins isminin başına ilave edilmiştir. Ancak

Anoxybacillus pushchionensis bakterisi üzerinde yapılan düzeltme çalışmasında bu tip türün tam olarak oksijensiz ortamda değil, oksijenin var olduğu ortamlarda da yaşabileceği ortaya çıkarıldı ve *Anoxybacillus* cinsinin zorunlu anaerop özelliği aerotolerant veya fakültatif anaerobik olarak değiştirildi (Pikuta vd., 2003). Bu cinse ait bakteriler Gram pozitif, hareketli veya hareketsiz, endosporlu, alkalofilik veya alkolotolerant orta derecede termofilik özellikteki bakterileri içermektedir. Bu cinsin %G+C içeriği %42-50 arasında değişmekte olup şu an sistematiki yapılmış olan *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus kestanbolensis*, *Anoxybacillus ayderensis*, *Anoxybacillus pushchionensis*, *Anoxybacillus voinovkiensis*, *Anoxybacillus gonensis* ve *Anoxybacillus contaminans* bakterilerini içermektedir.

Anoxybacillus cinsini *Bacillus* cinsinden ayıran en önemli özellik 16S rRNA gen sıralarıdır. 16S rRNA gen dizin analizini temel alan çalışmalara göre, *Anoxybacillus* cinsi üyeleri ile *Bacillus* cinsi üyeleri arasında %95'den daha az bir benzerlik vardır. Ancak *Anoxybacillus* cinsi kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği %97'den daha fazladır. Bu yüzden 16S rRNA gen dizi analizi *Anoxybacillus* cinsine ait türlerin ayrımında geçerli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli rol oynar.

1.10. Lipaz/esterazların Endüstriyel Önemleri

Ticari alanda kullanılan ürünlerin üretilmesi ile ilgili çalışmaların giderek hız kazanması sonucu, enzimlerin önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Günümüzde A.B.D de 900, bütün dünyada ise yaklaşık 1200 biyoteknoloji şirketi çalışmalarını çeşitli alanlarda sürdürmektedirler. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkelerin bu konuda tamamen dışa bağımlı olmaları dikkate alındığında, bu konu daha da önemli duruma gelmektedir. Sonuç olarak; pek çok çeşitteki enzim, gerek gıda sanayinde gerekse temizlik sanayinde geniş kullanım alanına sahiptir. Teknolojideki gelişmelere bağlı olarak kullanım alanları yaygınlaşmakta daha da önem arz eder hale gelmektedir. Bu enzimlerin elde edilmesinde ise mikroorganizmaların önemi her geçen gün daha artmaktadır.

Lipazlar üzerine yapılan çalışmaların %90'ı bazı avantajlarından dolayı bakteri veya mantar orjinlidir ve ticari olarak çeşitli özelliklere sahip lipazlar mevcuttur. Fakat, son

yıllarda yapılan çalışmalar özellikle endüstrinin duyduğu talepten dolayı sıcaklığa karşı dirençli lipazlar üzerine odaklanmıştır (Dharmsthiti ve Luchai, 1999; Nawani ve Kaur, 2000; Kademi vd., 2000; Lee vd., 2001).

Termofilik bakterilerden elde edilen lipazlar, endüstride önemli bir rol oynayacağına dair beklentiler vardır. Bu nedenle sıcaklığa ve kimyasal denatürasyona dayanıklı yeni enzimlerin elde edilmesine ihtiyaç vardır. Lipazların biyoteknolojik önemi, sadece triaçilgliserollerin hidroliz reaksiyonlarını katalizlemelerinden değil, aynı zamanda gliserol ve yağ asitlerinden de triaçilgliserol sentez reaksiyonlarını katalizlemelerinden kaynaklanır. Lipaz ve esterazlar, yüksek regio ve stereospesifiklik gösterirler, bu özellikleri, kimyasal sentezinde saf bileşikler üretimini sağlar. Bu enzimler üzerindeki ilgi, kofaktöre ihtiyaç duymamalarından da ileri gelir. Genellikle organik çözücülerde stabil ve aktiftirler. Oda sıcaklığı üzerinde erime noktasına sahip bazı yağlar vardır. Bu bazen enzimatik katalizli reaksiyonları inhibe eder. Bu nedenle mezofilik kaynakları enzimleri kullanmak pek etkili değildir. Dolayısıyla endüstride termofilik kaynaklı enzimlerin önemleri büyüktür.

Lipaz enzimi, gıda, deterjan, kimyasal ve biomedikal endüstrilerde geniş çapta kullanılır. (Pandey et al,1999) Bitkisel yağlardan biodizel eldesinde de kullanılmaktadır.

Patojenik mikroorganizmalardan salgılanan lipazlar, bakterial patojenitede rol oynayabilirler. Örneğin, *Helicobacter pylori* nin proteaz ve lipazı gastrik mukusu degrede eder ve mukozal hasara yol açar.

Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Yüksek lipolizis çeşitli peynirlerin üretiminde zorunlu olmaktadır. Peynir yapımında kullanılan renninin kütesinde, proteolitik enzimler gibi lipazlarda mevcuttur. Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, çikolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margarinler, şorteningler, fırın ürünleri ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır. Lipazlar bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayiinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. (Kıran vd., 2006)

Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar; *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*'dir. Son yıllarda biyoteknoloji alanında lipazların kullanımında hızlı bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle lipazların aşırı üretimini sağlamak amacıyla yönlü mutasyonlar yardımıyla suş geliştirme çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

Kıyafetlerimizi kirleten maddelerin başında proteinler, yağlar ve nişasta gelir. Bu lekeleri yüksek sıcaklıkta kimyasal deterjanlar yoluyla gidermek mümkünse de, enzimlerin kullanılması düşük sıcaklıkta ve daha az mekanik enerji ile istenen temizliği sağlar. Ayrıca çimen, kan, süt ve ter lekelerini çıkarmakta biyolojik olmayan deterjanlara göre çok daha etkilidir. Deterjanlarda kullanılan enzimlerden proteazlar yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri parçalar; lipaz yağ lekelerini, amilaz ise nişasta bazlı lekeleri çıkartmakta etkilidir. Çamaşırların yıpranmasıyla oluşan selüloz fibriller ise, selüloz enzimi ile parçalanarak çamaşırların daha yumuşak olması ve renklerini koruması sağlanır (Hiol ve ark., 2000).

Yağ giderme işleminde sürfaktanların kullanımı hem enzimler kadar etkili değildir hem de çevreye zararlıdır. Sığır postlarından yağ giderme işleminde lipazlar tamamen yüzey aktif maddelerin yerini alabilmektedir. Yaklaşık % 40 oranında yağ içeren koyun derilerinde ise çözücülerin kullanımı çok yaygındır ancak bunların yerine de lipazlar ve sürfaktanlar kullanılabilir. (Hasan vd., 2005)

Aktif çamur ve diğer aerobik atıksu işlemlerinde lipazlardan yararlanılmaktadır. Biokütlenin yaşam koşullarını sürdürebilmesi için havalandırma tanklarında sürekli bir oksijen geçişinin olması gerekir. Bu nedenle de havalandırma tanklarının yüzeyinde biriken ince yağ tabakasının sürekli uzaklaştırılması gerekir. Bu kaymaklaşmış yağca zengin sıvı lipazlar kullanılarak parçalanır. Bu amaçla kullanılan lipazlardan biri *Candida rugosa*'nın lipazıdır ve Lipaz-MY ticari adı altında Meito Sangyo Co. (Nagoya, Japan) tarafından üretilmektedir. Atık su arıtımı mezbaha, besin endüstrisi, deri endüstrisi ve kümes hayvanlarının atıklarının işlenmesi gibi endüstriyel işlemlerde de kullanılmaktadır (Gandhi, 1997).

Lipaz enzimi, unda bulunan %1-2 civarındaki lipid (yağ) içeriğine etki etmektedir. Bu enzim içinde kullanım miktarı ve tipi oldukça önemlidir. Örneğin, yüksek miktarlarda kullanımda hamur özellikleri açısından sorunlar yaşanmasına neden olmaktadır. Öte yandan uygun lipaz tipinin seçilmesi de önemlidir. Türk ekmek üretim biçimine uygun olmayan lipaz tipinin ekmek özelliklerine olumlu bir katkısı bulunmamaktadır. Unlara uygun lipaz tipinin ilavesi; Hamurun işlenebilirliğinde kolaylık, hamur stabilitesinde artış, ekmek içi yumuşaklık, ekmek hacminde artış sağlar .

Lipaz enzimi medikal alanda da önemlidir. Hyaluronidaz ve thiomukaz enzim ve lipaz birlikte deri iltihaplanmasını önlemede kullanılmaktadır. *Candida rugosa* lipazı kolesterol seviyesini düşüren lovastatin üretiminde kullanılır. *S. marcescens* lipazı ,

diltiazem hydrochloride sentezinde kullanılan ara bileşik olan 3-phenylglycidic asitin ester hidroliz reaksiyonunu katalizler. (Hasan vd., 2005)

Lipazlar, kağıt endüstrisinde beyazlaşmayı artırır, kimyasal kullanımını ve işlem süresini azaltır. Fukuda *et al.* (1990), *Pseudomonas* türlerinden (KWI-56) elde edilen 200 ünite lipazın boya giderme çözeltisine eklenmesi ile kağıdın beyazlaşma oranının % 56,5'den % 58'e çıktığını ve atık mürekkep lekelerinin 18 cm'den 7 cm'ye indiğini bildirmişlerdir (Hasan vd., 2005).

Yağların interesterifikasyonu ile istenilen özelliklere sahip sentetik trigliseritler, lipazların sentez reaksiyonu ile üretilmektedir. Bu uygulamalardan biri çikolata ve şekerlemelerin önemli bir bileşeni olan kakao yağının hurma yağından üretilmesidir (Gandhi, 1997).

Fosil yakıt kaynaklarının sınırlı oluşu (ve hızla tükenmesi), ham yağ fiyatlarının artması ve çevre sorunları nedeniyle bitkisel yağlar alternatif yakıt olarak araştırılmaya başlanmıştır (Hasan vd., 2005).

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

Tablo 3. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları

Endüstri	Katalizlenen İşlem	Ürün ya da Uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Kirlerin uzaklaştırılması
Mandıra ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaşması, tereyağının modifikasyonu	Süt, yağ ve peynirde lezzet artırıcı bileşenlerin geliştirilmesi
Fırın ürünleri	Lezzet artırımı	Raf ömrünün uzatılması
Meşrubatlar	Aroma artırımı	Meşrubat
Sağlık besinleri	Transesterifikasyon	Sağlık besinleri
Et ve balık	Lezzet artırımı	Et ve balık ürünleri
Kimyasallar	Enantiyoseçicilik, sentez	Kiral yapı blokları
Eczacılık	Transesterifikasyon, hidroliz	Özel lipidler, sindirim amaçlar
Kozmetik	Sentez	Emülsifiyer, nemlendirici
Kağıt	Hidroliz	Kalitesi artırılmış kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri

Tablo 4. Ticari olarak elde edilen mikrobiyal lipazlar (Jaeger ve Reetz, 1998)

Kaynak	Organizma	Biyoteknoloji	Firma
Mantar	<i>Candida rugosa</i>	Organik sentez	Amano, Biocatalysts, Boehringer, Mannheim, Fluka, Sigma
	<i>Candida antarctica</i>	Organik sentez	Boehringer, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Deterjan katkısı	Novo Nordisk, Boehringer,
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Besin işlemleri	Novo Nordisk, Amano, Biocatalysts
Bakteriyal	<i>Burkholderia cepacia</i>	Organik sentez	Fluka, Boehringer, Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Organik sentez	Asahi, Biocatalysts

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Trypton (Merck V441613949), Yeast ekstrakt (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), Etil alkol, Kanamisin (Applichem A1493), IPTG (Applichem A1008), Amfisilin (Applichem A0839), *NcoI* (Promega), *E.coRI* (Promega), T4 DNA ligaz (NEB), Taq DNA polimeraz (Promega), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega A1125), Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas K0513), EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega A1360), pET-28a(+) Ekspresyon Vektörü (İnvitrogen), CaCl₂ (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck 2C2133453), Etanol, Fosforik Asit (Merck 563.2500), BSA (NEB), DEAE-Sepharose (Sigma DFF100) , Sodyum Asetat (Merck TA867065), K₂HPO₄ (Merck A678671), KH₂PO₄ (Merck 567300), Trizma Baz (Sigma T1503), Nutrient Agar (MerckVL646350), Asetonitril (carlo erba 401185), Fast Red TR Salt (Sigma F8764), α -naftilasetat (Sigma N8505), p-nitrofenilbutirat (sigma N9876), SDS, Akrilamid (Sigma A8887), Bis-akrilamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbu 080702), β -merkaptotanol (Merck 805740), Metanol, Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), Gliserol (Merck K40789992008), Rodamin B (Sigma R6626).

2.1.2. Kullanılan Hücreler

Escherichia coli BL21, *Escherichia coli* JM101, *Anoxybacillus* sp. PDF1

2.2. Moleküler Çalışmalar

2.2.1. Primer Sentezi

Anoxybacillus sp. suşlarında lipaz genlerini ortaya çıkarmak için LipF1 ve LipR1 primerleri dizayn edildi. Bu primerler *Anoxybacillus flavithermus*'a ait lipaz-esteraz geni baz alınarak, lipaz genini direkt olarak pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlanabilecek

şekilde, bu enzim geninin içerisinde kesim bölgesi olmayan ve ayrıca pET28 a+ ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği özel ekspresyon primerleri (*NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içerecek şekilde) dizayn edildi.

NcoI ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içerecek şekilde dizayn edilen primerler:

LipF1: 5'-CCC ATg gTg AAg ATg ATT CC-3' 20 nt

LipR1: 5'-Cgg AAT TCC TAT CTA CCA ATC TAA TgA TTC-3' 30 nt

2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapıldı. *Anoxybacillus* sp. PDF1 bakterisi 3 ml LB besiyerine ekildi ve 55°C'de gece boyunca bir sulu çalkalayıcıda inkübe edildi. Büyümüş olan gece kültürü 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler 480 µl 50 mM EDTA içerisinde çözüldü. 120 µl 10 mg/ml lizozim ilave edildi, hafifçe pipetleyerek karıştırıldı ve 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Elde edilen karışım 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpe 600 µl *Nuclei Lysis* solüsyonu eklendi ve hafifçe pipetle karıştırıldı. Karışım 80°C'de 5 dk inkübe edildi ve oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 3 µl *RNase* solüsyonu eklendi. Tüp 2-5 kez alt-üst edildi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Karışım oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 200 µl *Protein Precipitation* solüsyonu eklendi ve 20 sn vorteksledikten sonra 5 dk süreyle buza bırakıldı. 5 dk sonunda 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant içinde 600 µl izopropanol bulunan yeni bir ependorfa aktarıldı. Ependorf pelet oluşuncaya kadar alt üst edildi ve 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve kurutma kağıdı kullanarak tüm süpernatant sıvısının atıldığından emin olundu. Pelletin üzerine 600 µl oda sıcaklığında % 70'lik etanol eklendi ve alt üst edildikten sonra 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pipetörle süpernatant uzaklaştırıldı ve etanolün tamamının uzaklaşması için mikrosantrifüj tüpü 15 dk 37°C'de bekletildi. Pellet üzerine 100 µl *DNA Rehydration* solüsyonu eklendi ve 65°C'de 1 saat inkübe edildi. Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zaman kadar +4 °C'de saklandı.

2.2.3. Lipaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

Lip F1 ve Lip R1 primerleri ile *Anoxybacillus* sp. PDF1'in genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekildedir: 95°C'de 3 dakikalık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü 94°C'de 30 sn denatürasyon, 52°C'de 30 sn bağlanma (annealing) ve 72°C'de 45 sn uzama (extention) ve son olarak da 72°C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 0,7'lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. PCR reaksiyonu ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı (5 µl 2X tampon, 1 µl pGEM-T vektör, 3 µl PCR ürünü ve 1 µl T4 DNA ligaz). Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve ark. (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildi ve agaroz jelde yürütülerek rekombinant genler seçildi. Klon olduğunu teyit etmek için *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim yapıldı ve PCR ürünün elde edilip edilemediği kontrol edildi. Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini, otomatik dizi analizatörleri aracılığı ile (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Sekans sonuçları Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın lipaz-esteraz genine ait olduğu tespit edildi.

2.2.4. Lipaz Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

PCR ürününün, sekans sonuçlarıyla lipaz genine ait olduğu kesinleştikten sonra, PCR kısmında anlatılan şartlarda bu dizayn edilen ekspresyon primerleri ile tekrar PCR yapılarak gen çoğaltıldı. Diğer taraftan klonlama şansını arttırabilmek için sekans edilerek içerisinde lipaz geni olduğu kesinleşen pGEM-T vektörü kitle (invitrogen) plazmit izolasyonu yöntemi ile izole edildi. PCR ile üretilen bu genin uç kısımlarında *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri bulunmaktadır. pET-28a(+) ekspresyon vektörü, etanol presipitasyonu ile temizlenen PCR ürünü ve içerisinde lipaz geni taşıyan pGEM-T vektörü, *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyonu, 1X enzim tamponu içerisinde, 3 U enzim varlığında 37°C'de 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Bir enzim kesim basamağından sonra etanol presipitasyonu yapılarak

ikinci enzim için kesime hazırlandı. Kesim ürünleri % 0,7'lik agaroz jelde yürütüldü. Lineer hale getirilen pET28a+ vektörü ve uç kısımlarından kesilen PCR ürününün bulunduğu bantlar jelden kesilip alındı ve bir Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) aracılığı ile temizlendi. Temizlenen ürünler ligasyon işlemi ile halkalaştırıldı. Ligasyon; 1 µl 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi içerecek şekilde 10 µl son hacimde 16°C'de 16 saat boyunca gerçekleştirildi.

Ligasyon ürünü CaCl_2 transformasyon metoduyla *E.coli* BL21 suşuna aktarıldı. Transformasyon için, 200 µl alıcı konak hücre içeren tüpe 10 µl ligasyon ürünü eklendi ve tüp, 30 dakika buz içinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında daha önceden hazırlanan 42°C ısıtıcı blokta 2 dakika bekletilerek plazmidin hücre içine geçmesi sağlandıktan sonra her bir tüpe 200 µl LB besiyeri eklendi. Tüpler 37°C'de iki saat bekletildikten sonra daha önce hazırlanmış olan LBA petrilere (50 µg/ml kanamisin içeren) yayılarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi. pET-28a(+) ekspresyon vektör sisteminde *lac* operon sistemi bulunmadığından X-gal ve IPTG kullanarak mavi-beyaz koloni oluşturma imkanı bulunmamaktadır. Bu sebepten ötürü petri üzerinde oluşan kolonilerin hangisinin geni taşıdığını belirlemek için kolonilerden rastgele seçim yoluyla tarama yapıldı. Seçilen koloniler 3 ml (50 µg/ml kanamisin içeren) LB besiyeri içinde bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Üretilen hücrelerden plazmit izolasyon kiti (invitrogen) ile plazmitler izole edildi. İzole edilen plazmitler *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz ile kesilerek klonlamanın olup olmadığı kontrol edildi. Ayrıca bu koloniden enzim izolasyonu yapılarak lipaz aktivitesi kontrol edildi. Aktivitesi gözlemlendikten sonra enzim çalışmalarına başlandı.

2.3. Gen Ürününün Elde Edilmesi ve Saflaştırılması

2.3.1. Lipaz Aktivitesinin Ölçümü

Enzim aktivitesinin spektrofotometrede tayini için substrat çözeltisi; 1:4:95 (v/v/v) oranında olacak şekilde sırasıyla; asetonitrilde çözülmüş PNPB, etanol, tampon bileşenlerinden hazırlandı. Rutin çalışmalarda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazında kör olarak; 900 µl substrat çözeltisi ve 300 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu, numune olarak 900 µl substrat çözeltisi, 270 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu ve 30 µl enzim kullanılarak 405 nm de ölçümleri yapıldı (Lee, vd. 1999).

1 Ünite, hazırlanan enzim özütü ile pH 8 ve 60 °C’de PNPB’ den 1 dakikada oluşan 1 µmol p-nitrofenolat olarak tanımlanmıştır. 405 nm de PNP ün molar absorblama katsayısı, $1,457 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ dir. Her saflaştırma basamağında elde edilen enzimin spesifik aktivitesi bu formülle hesaplandı.

Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH’sı, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlenmiştir.

2.3.2. Petride Lipaz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi

Anoxybacillus sp. PDF1 e ait lipaz aktivitesini petride gözlemlemek için Rhodamine B ve substrat olarak zeytinyağı içeren LB agar kullanıldı. 1 mg/ml’lik Rhodamine B ddH₂O da çözülerek hazırlandı ve filtre ile steril edildi. LB sıvı besiyeri (5g/l NaCl, 5 g/l yeast extract ve 10 g/l tripton) hazırlanarak pH’sı 7,4 e ayarlandı. İçerisine substrat olarak %2,5 w/v olacak şekilde zeytinyağı ilave edildi ve otoklavda steril edildi. Sıcaklığı yaklaşık 60°C ‘ye düşünce, %0,001 w/vol olacak şekilde filtre ile steril edilen rhodamine B besiyeriye eklenerek iyice karışması için bir süre çok hızlı bir şekilde sallayıcıda karıştırıldı. Petrilere dökülerek *Anoxybacillus* sp. PDF1 bakterisinin ekimi yapıldı ve 50°C’de büyümeye bırakıldı.

2.3.3. Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein konsantrasyonu tayini Bradford’un (1976) yılında geliştirdiği yöntemle göre yapılmıştır. 1000 ml boya solusyonu hazırlanırken 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası önce 50 ml % 95’lik etanol içinde iyice çözülerek, üzerine 100 ml %85’lik fosforik asit eklendi. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 1000 ml’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı ile filtre edildi. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 12, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözelti 0,15 m NaCl ile 100 µl’ye tamamlandı. Her bir örneğin üzerine 5 ml hazırlanan boyadan eklendi. Protein ve boya karışımları vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlarda örnek 0,15 m NaCl ile 100 µl’ye tamamlandı ve üzerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımı vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Süre

sonunda standart grafiğın yüklendiğı Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm’de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cinsinden hesaplandı.

2.3.4. Hücre Üretimi

Lipaz genini içeren koloniden 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamisin içeren 50 ml LB’ye ekilerek gece boyu büyümeye bırakıldı ve oluşan kültürün optik yoğunluğu ölçüldü. Bu kültür kullanılarak, 2 L 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamisin içeren LB’ye optik yoğunluğu 0,1 olacak şekilde tekrar ekim yapıldı. Kültürün optik yoğunluğu 0,6-0,9 olduktan sonra son hacimde 1 mM IPTG olacak şekilde, IPTG eklenerek enzim üretimi indüklendi. İndükleme yapıldıktan sonra kültür yaklaşık 4 saat daha büyütüldü. Büyütülen hücreler 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.

2.3.5. Hücre Ekstratının Elde Edilmesi

Elde edilen pellet Tris-HCl (pH 8) tamponunda çözülerek %70 şiddetinde, 0,6 devirde 5 dk Sartorius Labsonic sonikatör ile sonike edildi. Elde edilen hücre solüsyonu 14800 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak süpernatant alındı. Ekim için kullandığımız klonun doğruluğundan emin olmak için süpernatantta tekrar lipaz aktivitesi bakıldı. Lipaz aktivitesinden emin olduktan sonra kaba ekstrattan; protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 300 μl örnek ayrılarak enzim saflaştırma işlemlerine başlandı.

2.3.6. Lipazın Saflaştırılması

2.3.6.1. Isı Şoku Uygulaması

Elde edilen ham ekstrat 15 dk süreyle 55 °C’de bekletildi. Bekletildikten sonra 15 dk 14800 rpm’de santrifüj yapıldı. Süpernant alındı, çöken kısım uzaklaştırıldı. Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatantta tekrar lipaz aktivitesi bakıldı.

Lipaz aktivitesinden emin olduktan sonra protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 300 µl örnek ayrılarak iyon değişimi kromatografisi basamağına geçildi.

2.3.6.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi

İyon Değişimi Kromatografisi için 50 cm uzunluğundaki ve 1,5 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak anyonik iyon değiştirici olan DEAE-Sepharose kullanıldı. Hareketli faz olarak 20 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompasında alındı ve sonrasında bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 500 ml 20 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu ile dengeye getirildi. Özüt kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu malzemesine bağlanmaları sağlandı. Sonrasında kolondan 50 ml daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırıldı. Daha sonra kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,6 molar kadar çıkarıldı. Bunun için 200 ml'lik NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 3,5 ml olacak şekilde toplandı. İyon değişimi grafiğinden kullanılmak üzere, elde edilen tüm tüplerde spektrofotometrik olarak 280 nm'de protein absorbansları ölçüldü. Diğer taraftan tüm tüplerde lipaz taraması yapılarak aktivite veren tüplerde yine iyon değişimi grafiğinde kullanılmak üzere ünite hesabı yapıldı. En fazla enzim bulunduran tüpler seçilerek birleştirildi ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi. Elde edilen enzimi tuzdan arındırmak için diyaliz yapıldı. Bunun için enzim diyaliz membranı içinde 20 mM Tris-HCl (pH 8) tamponu içerisine alındı ve 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda döndürülerek tuzdan arınması sağlandı. Diyalizden sonra 14.800 rpm de 15 dk santrifüj edilerek bozulan proteinlerin atılması sağlandı.

2.3.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein jel elektroforezleri Hoeffer SE 600 marka elektroforezde % 12'lik jel kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının moleküler ağırlığını hesaplamak ve saflığını kontrol etmek amacıyla saflaştırılan enzim,

moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek belirlendi. Her bir örnekten 50 µg protein kullanılarak yürütüldü. Her bir örnek üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; %20 Gliserol; % 6 β-merkaptotanol) tamponu ilave edildi ve sonrasında 99°C’de 4 dakika bekletilerek Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12’lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (% 0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve hemen ardından 1. yıkama solüsyonunda (%50 Metanol, %10 Asetik asit %40 ddH₂O) 1 saat bekletildi. Daha sonra 2. yıkama solusyonunda (%7 asetik asit ve %5 metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildikten sonra bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.4. Lipazın Karakterizasyonu

2.4.1. Optimum Sıcaklık

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 ve 90°C’ye ayarlanmış ısıtıcı blokta gerçekleştirilen bir seri reaksiyonlar ile belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

2.4.2. Optimum pH

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının aktivitesine pH’nın etkisinde, 50 mM fosfat tamponu (pH 6), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7-8-9) kullanıldı. Reaksiyonlar belirlenen optimum sıcaklık değerinde gerçekleştirildi. Gözlenen optimum pH aktivite değeri daha sonra yapılacak olan kinetik parametrelerin belirlenmesi gibi çalışmalarda reaksiyon pH’sı olarak kullanılmıştır.

2.4.3. Enzim Kinetiği

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının kinetik verileri, yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen, 25-1000 μ M arasındaki substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile belirlendi. Reaksiyonlar 50 mM Tris-HCl (pH 8) kullanılarak 60°C de gerçekleştirildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934). Michaelis-Menten grafiği çizilerek elde edilen 500 mM substrat konsantrasyonu yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu olarak belirlendi. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının Kcat değeri Orijin programıyla hesaplandı.

2.4.4. pH Kararlılığı

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının pH kararlılığı belirlemek için enzim, pH'sı 5 ve 5,5 olan 50 mM asetat tamponunda; pH'sı 6 olan 50 mM fosfat tamponlarında, pH'sı 7, 8, 8,5 ve 9 olan Tris-HCl tamponlarında ve pH'sı 10 olan CAPS tamponunda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi.

2.4.5. Isıl Kararlılığı

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının kararlılığına ısıнын etkisini incelemek için 30 dakika 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C ve 75 °C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü.

2.4.6. Metal İyon Etkisi

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; Mg^{+2} , Li, Ca^{+2} , K, Zn^{+2} , ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzları ile gerçekleştirildi. Enzim, ilave edilen 1 mM metal iyonlarıyla 15 dakika, 5 mM metal iyonları ile 60°C'de 1 saat inkübe

edildi. Bekletilen enzimlerle *para*-nitrofenilbutirat substrat olarak kullanılarak aktivite bakıldı. Enzimin metalsız hali 100 kabul edilerek metal içeren enzimlerin % kalan aktivitesi hesaplandı.

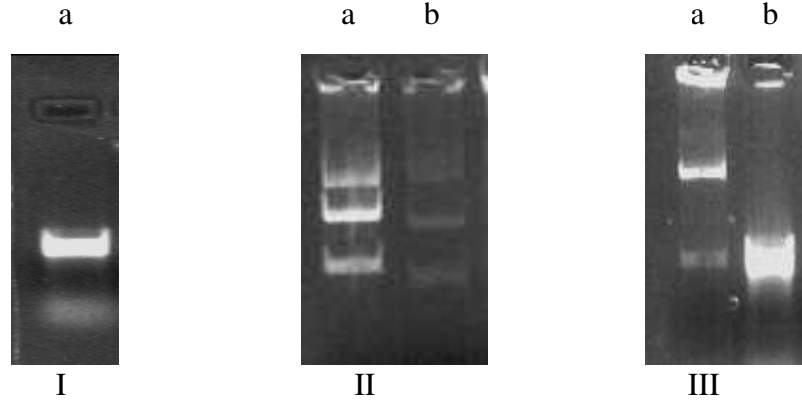
2.4.7. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Deterjan ve organik çözücülerin *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzim, 30 dk, % 1 (v/v) DMSO, β- merkaptoetanol, DMSO, etanol, izopropanol, 5 mM EDTA, %0,1 (v/v) SDS içerecek şekilde 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü. Enzimin kimyasalları içermeyen hali 100 kabul edilerek kimyasalları içeren enzimin % kalan aktivitesi hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. *Anoxybacillus* sp. PDF1 Lipaz Geninin Baz Diziliminin Belirlenmesi

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazını tespit etmek amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak LipF1 ve LipR1 primerleri ile PCR gerçekleştirildi. PCR sonuçları 0,5 mg/ml etidyum bromür içeren %1,0'lik agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Ekspresyon primerler kullanılarak elde edilen DNA parçası pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, kitle plazmit izolasyon yöntemi ile izole edildi. Sekans sonuçları Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı (Şekil 4) ve bu sekansın 740 nt'lik lipaz-esteraz geni olduğu tespit edildi. Elde edilen baz dizilimi Ek.1'dedir. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geninin diğer mikroorganizmalara % benzerliği de Tablo 5 ' de verilmiştir.



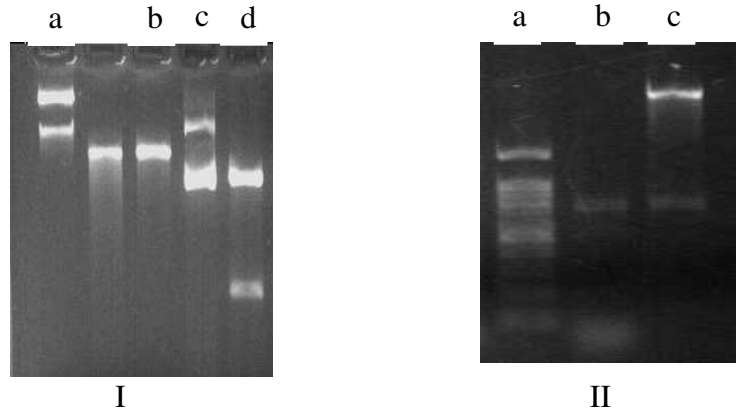
Şekil 4. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geninin PGEM-T easy vektörüne klonlanması I- *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geni II- a) Lipaz genini içeren pGEM-T easy klonlama vektörü b) Lipaz geni içermeyen pGEM-T easy klonlama vektörü III- a) Lipaz genini içeren pGEM- T easy klonlama vektörünün *EcoRI* ile kesimi b) Lipaz geni

Tablo 5. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geninin diğ er mikroorganizmalara % benzerliğı

Mikroorganizma	% Benzerlik
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> WK1	95
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	86
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	84
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	83
<i>Bacillus cereus</i> W	79
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	75

3.2. Lipaz Geninin Vektöre (pET28 a+) Klonlanması ve Ekspresyonu

Lipaz geninin vektöre (pET28a+) klonlanması için *Anoxybacillus* sp. PDF1'e ait genomik DNA kullanılarak klonlama için sentez edilen ekspresyon primerleri ile PCR gerçekleştirildi. Diğ er taraftan lipaz genini içeren pGEM-T easy vektörü izole edildi. PCR sonucu elde edilen DNA fragmeti, lipaz genini içeren pGEM-T easy vektörü ve plazmit izolasyonu ile elde edilen pET28a+ ekspresyon vektörü *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon ezimleriyle kesildi. %1,0'lık agaroz jelde yürütölen DNA fragmentleri jelden çıkarma kiti ile jelden çıkartıldı ve ligasyon yapıldı (şekil 5).



Şekil 5. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geninin pET28a+ vektörüne klonlanması a) Kesilmemiş pET28a+ vektörü b) pET28a+ vektörünün *NcoI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesimi c) Kesilmemiş pGEM-T easy vektörü d) Lipaz genini içeren pGEM-T easy vektörünün *NcoI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesimi II- a) Marker b) Lipaz geni c) Lipaz genini içeren pET28a+ vektörünün kesimi

3.3. Lipaz Aktivitesi

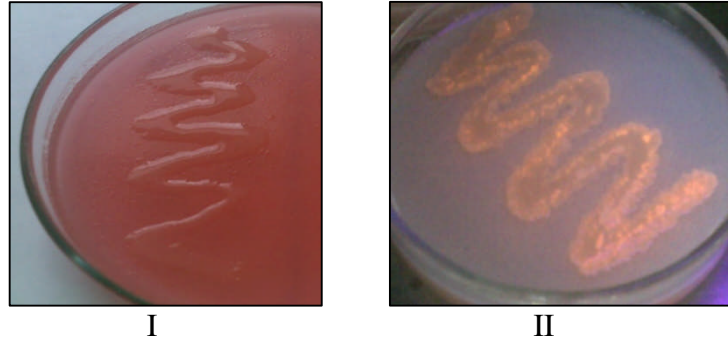
Anoxybacillus sp. PDF1 lipaz aktivitesi Lee, vd. (1999)'ne göre belirlendi. (Tablo 6) 405 nm de PNP' ün molar absorblama katsayısı, $1,457 \times 10^5 \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ dir. 1 Ünite, hazırlanan enzim özütü ile 60 °C de PNPB' den 1 dakikada oluşan 1 µmol p-nitrofenolat olarak tanımlanmıştır.

Tablo 6. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının aktivitesi

Bakteri	Aktivite (U/mg)
<i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1	287,22

3.4. Petride Lipaz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi

Anoxybacillus sp. PDF1 lipaz aktivitesine sahip olduğu yapılan petride gösterildi. Deneyde kontrol olarak lipaz negatif *E.coli* BL21 suşu kullanıldı. 1 günlük bir inkübasyon süresi sonunda *E.coli* BL21 suşunun lipaz aktivitesi göstermediği, *Anoxybacillus* sp. PDF1'in ise lipaz aktivitesi gösterdiği gözlemlendi. Aktivite gösteren koloniler UV' nin altında turuncu renk vermekte, aktivite göstermeyenler pembe görünmektedir. (Şekil 6)



Şekil 6. LB- Rodamin B agar petrilerinde PDF1 lipaz aktivitesi I- Lipaz aktivitesi negatif II- Lipaz aktivitesi pozitif

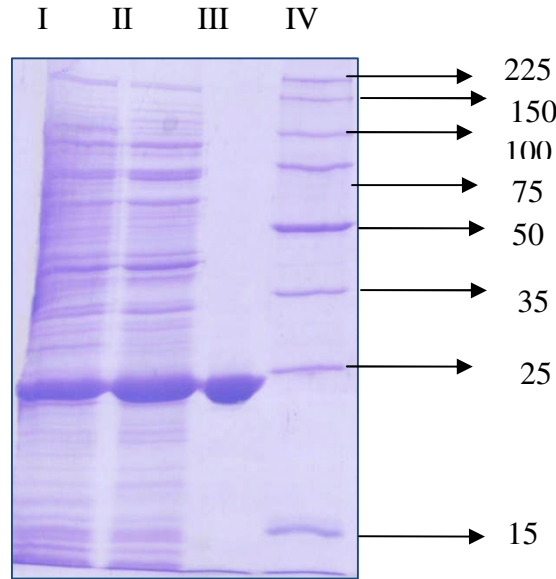
3.5. Lipazın Saflaştırılması

3.5.1. Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları

Elde edilen hücre özütünde ve bu özütün ısı şoku uygulamasından sonra elde edilen özütte protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 7’te gösterilmiştir.

3.5.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi ve Jel Görüntüsü

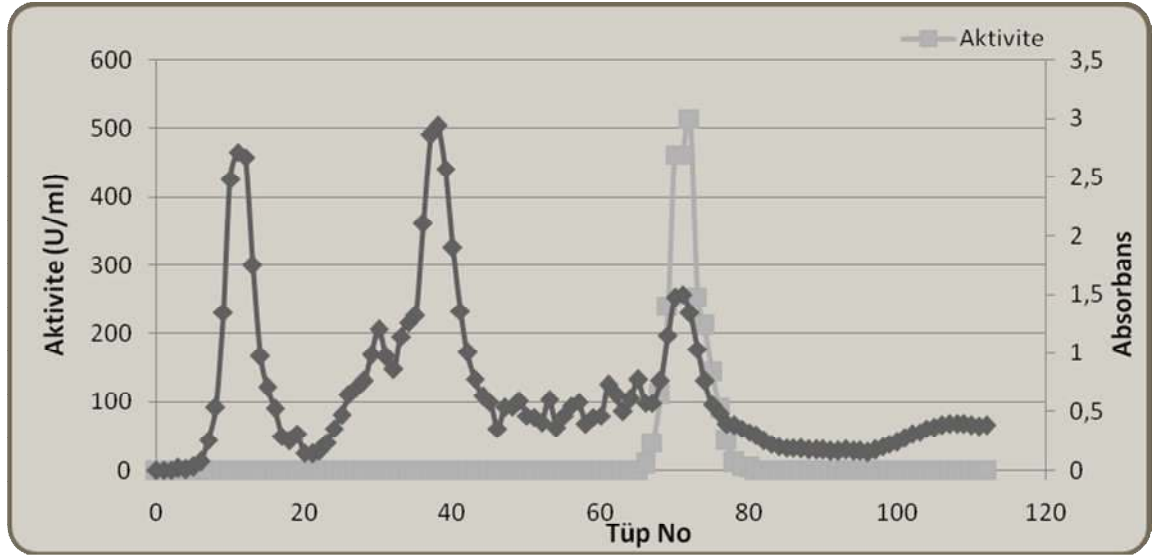
Isı şoku uygulamasından sonra elde edilen hücre özütü iyon değişimi kolon kromatografisinden geçirildikten sonra, en iyi aktivite görülen fraksiyonlar birleştirilerek SDS-PAGE’de yürütüldü. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, saflaştırılmış özütte protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı. Bulunan veriler Tablo 7’de, elde edilen jel görüntüsü Şekil 7’de verildi.



Şekil 7. Saflaştırılmış rekombinant *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının SDS-PAGE analizi I- Kaba ekstrat II- Isı şoku uygulaması III- İyon değişimi kolon kromatografisi IV- Protein marker

Tablo 7. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının saflaştırma tablosu

Saflaştırma basamağı	Hacim (ml)	[Protein] (mg/ml)	T. protein(mg)	T. aktivite(U)	Spesifik aktivite(U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	12	3,84	46,14	13253,36	287,22	100	1
Isı bozunum	10,3	2,89	29,83	11287,49	378,37	85,16	1,31
İyon değişimi (DEAE-S.)	36	0,58	20,99	11127,45	530	83,95	1,84

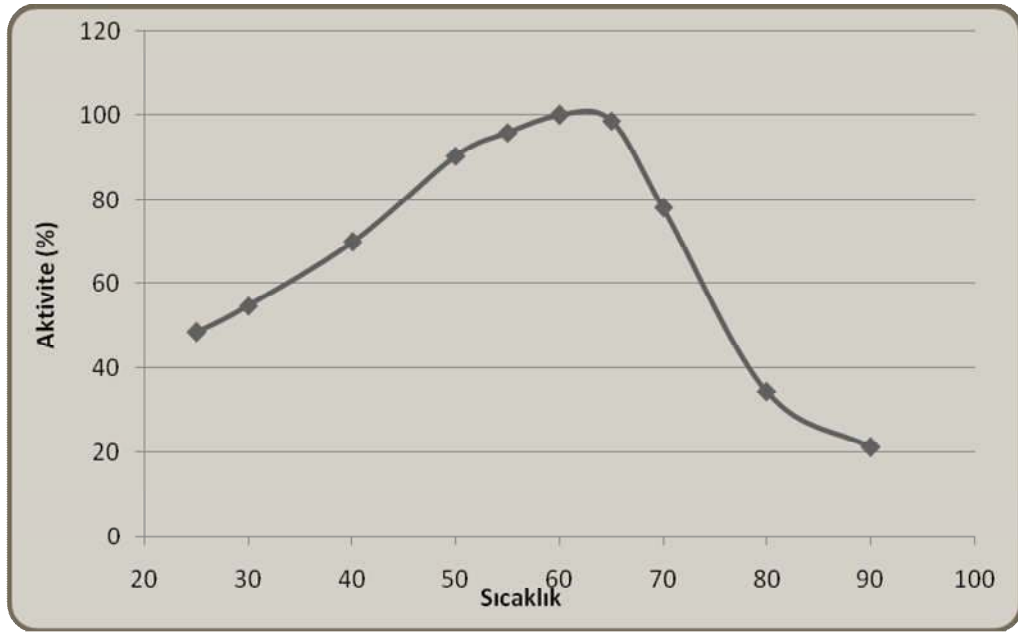


Şekil 8. İyon değişimi grafiği

3.6. Lipazın Karakterizasyonu

3.6.1. Optimum Sıcaklık

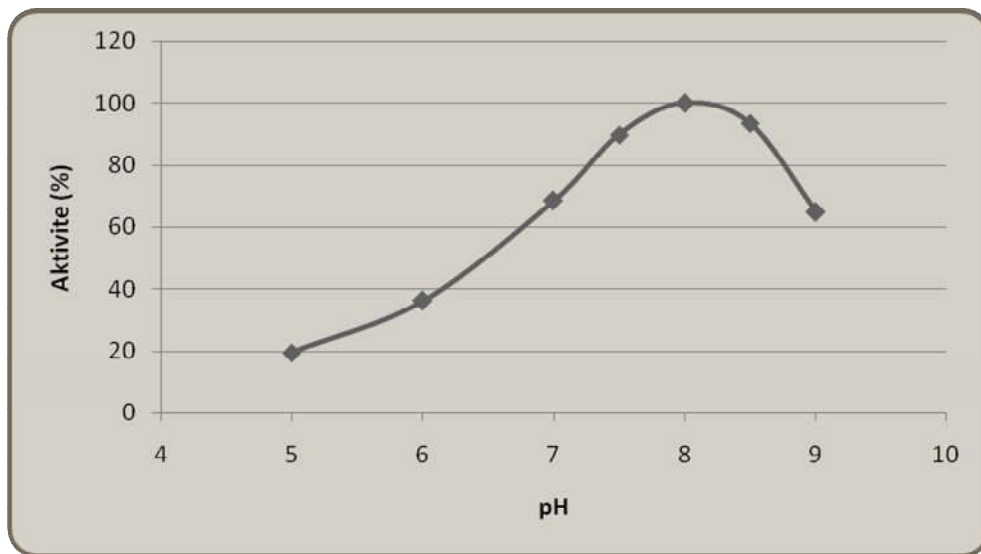
Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 ve 90°C’de aktivitesi ölçülerek enzimin çalışmasına sıcaklığın etkisi araştırıldı ve sıcaklık-aktivite grafiği oluşturularak enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlendi, sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirildi (Şekil 9).



Şekil 9. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının optimum sıcaklık grafiği

3.6.2. Optimum pH

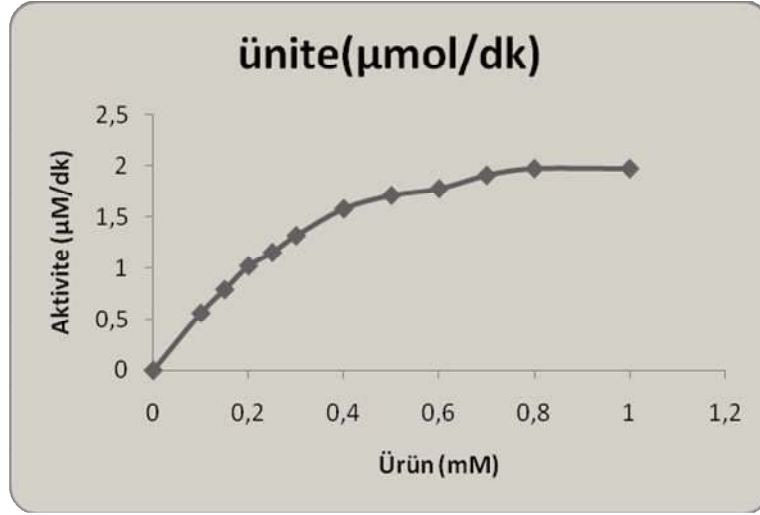
pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi pH 6-9 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-Aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 10'da da görüldüğü üzere lipaz aktivitesi en yüksek pH 8'de gözlemlendi.



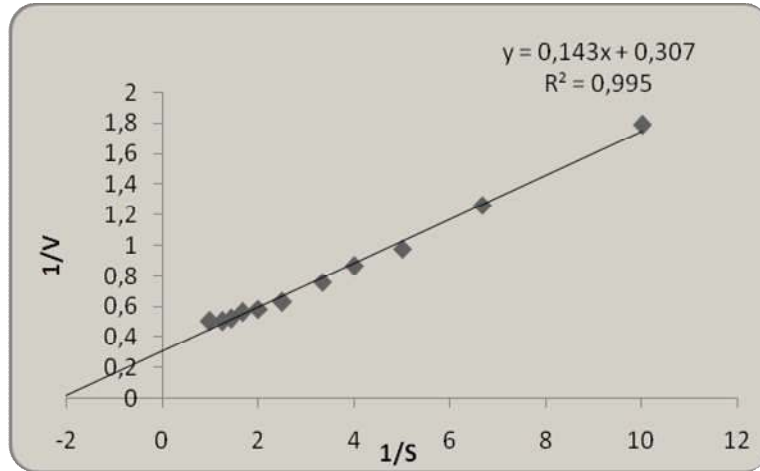
Şekil 10. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının optimum pH grafiği

3.6.3. Kinetik İncelemeler

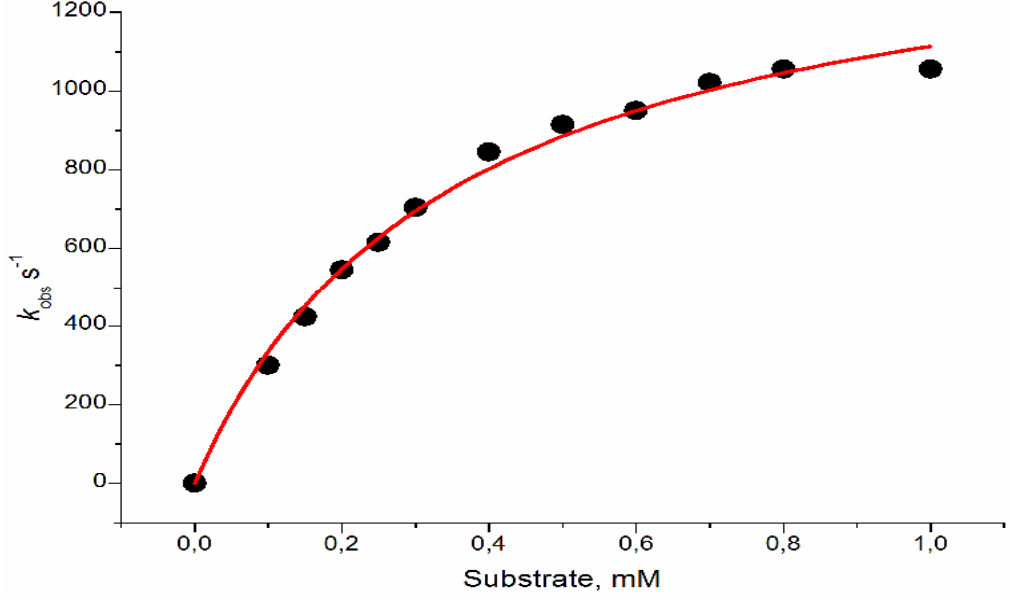
Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının substrat olarak *p*-nitrofenilbutirat varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Substrat olan *p*-nitrofenilbutirat için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 0,348 mM, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri 3725,8 U/mg olarak hesaplandı. Sonuçlar Şekil 12 ve 13 'te gösterilmiştir. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının K_{cat} değeri Orijin programıyla hesaplanarak $1500.71 \pm 54.50 \text{ s}^{-1}$ olarak belirlendi.



Şekil 11. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının Michaelis- Menten eğrisi



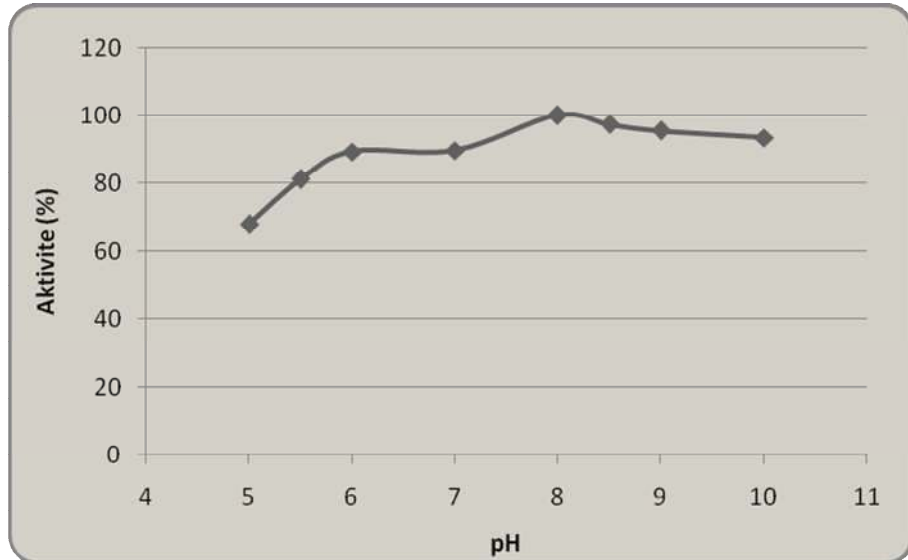
Şekil 12. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının Lineweaver-Burk eğrisi



Şekil 13. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının Kcat grafiği

3.6.4. pH Kararlılığı

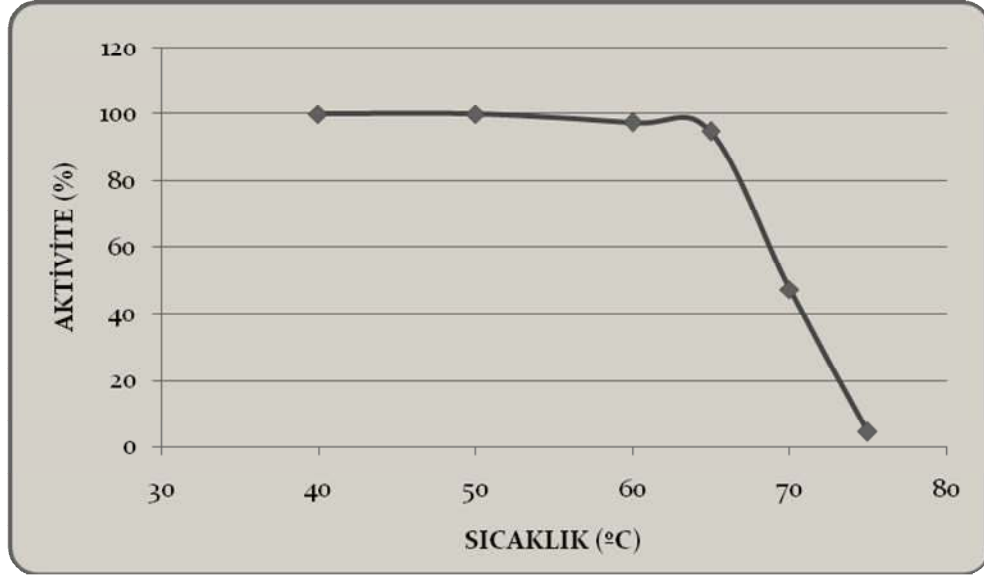
Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının pH kararlılığını belirlemek için enzim, pH 5, 5,5, 6, 7, 8, 8,5, 9, 10'da inkübe edildi ve % kalan aktivite hesaplandı. Enzimin aktivitesi pH 5'de % 68'e, pH 5,5'de %81'e ve pH 10'da % 93'e düştüğü gözlemlendi.



Şekil 14. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının pH kararlığı

3.6.5. Isıl Kararlılığı

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının kararlılığına ısıнын etkisini incelemek için enzim, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C ve 75 °C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 40 °C, 50 °C, 60 °C'de aktivitenin azalmadığı, 65 °C'de aktivitenin % 95'e, 70 °C 'de % 48'e, 75 °C'de %5'e düştüğü belirlendi.

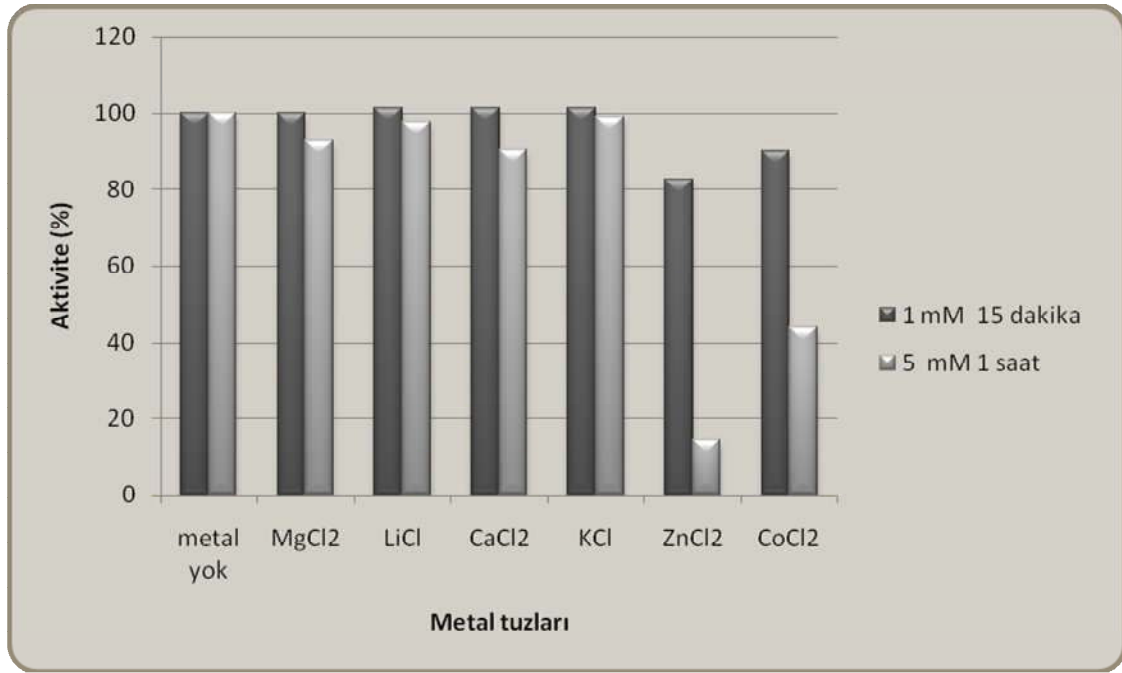


Şekil 15. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının ısı kararlılığı

3.6.6. Metal İyon Etkisi

Lipaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; MgCl₂, LiCl, CaCl₂, KCl, ZnCl₂, ve CoCl₂ metal tuzları ile gerçekleştirildi.

LiCl, CaCl₂, KCl metal tuzlarının 1 mM lık konsantrasyonlarda 15 dakikalık inkübasyonla aktiviteyi %102'ye çıkardığı, MgCl₂'ün bir değişiklik yapmadığı, ZnCl₂ metal tuzunun aktiviteyi %83'e, CoCl₂ metal tuzunun ise aktiviteyi %90'a düşürdüğü gözlemlendi. Bu tuzların 5 mM'lık konsantrasyonlarda enzimle 1 saatlik inkübasyonunda, MgCl₂'ün aktiviteyi %93'e, LiCl'ün %98'e, CaCl₂'ün %91'e, KCl'nin %99'a düşürdüğü, ZnCl₂ metal tuzunun aktiviteyi iyice azaltarak %15'e, CoCl₂ metal tuzunun ise %44'e düşürdüğü gözlemlendi. Sonuçlar Şekil 11 'de gösterildi.



Şekil 16. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazına metal iyonlarının etkisi

3.6.7. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Deterjan ve organik çözücülerin *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzimi bu kimyasallarla muamele ettikten sonra hiç bekletmeden, 15 dakika ve 30. Dakikada % kalan aktiviteyi hesaplandı. Sonuçlar Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. *Anoxybacillus* sp. PDF1 Lipazına İnhibitör ve Aktivatörlerin Etkisi

Enzim İnhibitörleri	Konsantrasyon	Aktivite (%)		
		0 dk	15 dk	30 dk
kontrol	0	100	100	100
DMSO	% 1 (v/v)	98	97	97
etanol	% 1 (v/v)	97	96	92
izopropanol	% 1 (v/v)	100	100	105
β-merkaptotanol	% 1 (v/v)	236	327	344
EDTA	5 mM	95	97	98
SDS	%0,1 (v/v)	44	42	36

4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmayla *Anoxybacillus* sp. PDF1'in lipaz geni klonlanmış, ekspres edilmiş ve enzimin biyokimyasal özellikleri ve kinetik parametreleri incelenmiştir. Bu çalışma, ilk kez *Anoxybacillus* cinsi bir bakteriden lipaz geninin klonlanmasıyla ilgili olması nedeniyle önemlidir. Yapmış olduğumuz çalışmalar sonucu ortaya çıkardığımız *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geni sekansı, *Anoxybacillus flavithermus* WK1 lipaz/esterazına %95 benzer bulunmuştur. Elde edilen enzim Genbank' taki verilere göre 3.1.1.x E.C numarasına sahip karboksilik ester bağları üzerinde etkili olan hidrolaz sınıfı bir enzimdir. Katalitik bölgede (katalitik üçlü), serin, glutamat veya aspartat ve histidin aminoasitlerini içermektedir.

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının aktivitesine hem floresans bir boya olan Rhodamine B ve zeytinyağı içeren LB agarda hem de p-nitrofenil bütirat ile spektrofotometrik olarak bakılmıştır (Lee, vd. 1999). Lipaz üreten bakteriler petri üzerinde genellikle tribütrin (Lawrence ve ark. 1967) veya Tween 80 (Sierra.,1957) substrat olarak kullanılarak seçilmektedir. Bu substratlar gerçek lipazı tespit etmek için uygun değildir çünkü esterazlar da lipazlar gibi bu substratları parçalamaktadır. Bu nedenle lipazların varlığını tespit etmek için bir çeşit trioleolgliserol olan zeytinyağı substrat olarak kullanılmıştır (Gisela kouker and Karl-Erich Jaeger, 1987). Lipaz aktivitesiyle serbest kalan yağ asitleri sayesinde Rhodamine B ile UV altında koloniler turuncu gözükmemektedir. Lipaz geninin kaynağını oluşturan *Anoxybacillus* sp. PDF1 kolonileri rhodamin B ve zeytinyağı içeren LB agarda UV altında turuncu renk vermektedir.

Termofilik lipazlar yüksek sıcaklık ve kimyasal denatürasyona karşı daha dayanıklı olduklarından, endüstriyel alanlarda mezofiliklere oranla daha çok tercih edilmektedirler. Ayrıca oda sıcaklığı üzerinde erime noktasına sahip bazı yağlar vardır. Bu bazen enzimatik reaksiyonları inhibe eder. Bu nedenle, mezofilik kaynakları enzimleri kullanmak pek etkili değildir. Dolayısıyla endüstride termofilik kaynaklı özellikle 50 °C 'nin üzerinde optimum sıcaklığa sahip olan enzimlerin önemleri büyüktür. Literatür incelendiğinde *Geobacillus stearothermophilus* JC lipazının optimum sıcaklığı 55°C (Yu Jiang vd., 2009), *Geobacillus* sp. TW1'in lipazının optimum sıcaklığı 40°C'dir (Li ve Zhong, 2005). *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazı ise verilen bu örneklerden daha yüksek (60-65°C) bir

sıcaklıkta çalıştığı tespit edilerek endüstri için çok iyi bir optimum sıcaklığa sahip olduğu tespit edilmiştir.

Ortamın pH'sı enzimin primer ve sekonder yapısını, dolayısıyla aktivitesini etkiler. Lipazların genellikle optimum pH'sının 8 civarı, esterazların ise 6 civarı olduğu bilinmektedir (Fojan ve ark.,2000). *Geobacillus stearothermophilus* JC ve *Geobacillus* sp. TW1 bakterilerine ait lipaz enzimlerinin optimum pH'sı sırasıyla 9 ve 7,5'tur. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının en iyi çalıştığı pH, pH 8-8,5 olarak belirlenmiştir. Çalıştığı optimum pH bakımından *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazı, alkali ortamda asidik ortamdakinden daha iyi çalışması açısından literatürdeki diğer lipazlara benzediği görülmektedir.

Metal iyon ve tuzları termofilik organizmalardan elde edilen enzimler için önemlidir. Bazı enzimler yüksek sıcaklıklarda stabilite ve aktif yapıları için Ca^{+} iyonu gibi metal iyonlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Bu iyonlar genellikle spesifik (özellikle negatif yükçe zengin) bölgelere bağlanırlar. Polipeptit zinciri de metal iyon köprüleriyle çapraz bağlanırlar ve bu kompleks daha kararlı hale gelir. Metal iyonları yokluğunda bu negatif yükçe zengin bağlanma bölgelerinin birbirini itme eğilimi, katlanmış polipeptidin stabilitesinde azalmaya yol açar.

Literatürdeki çoğu lipazların aktivitesinde 1 mM Ca^{+2} ile %1-16 oranında artış gözlemlenmiştir. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının da aktivitesi %102'ye çıkmıştır. Ca^{+2} iyonlarının hidrolizde salınan yağ asitleriyle çözünmeyen Ca tuzları oluşturmaları sayesinde enzim inhibisyonunu önledikleri düşünülmektedir. *Bacillus* sp. RSJ-1 in lipazının aktivitesinde Ca^{+2} dışında 1 mM'lık Na^{+} , Mg^{+2} ve Ba^{+2} ile ayrı ayrı %2 oranında artış sağlamışlardır. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının aktivitesi Zn ve Co tuzları ile (1 mM) %82 ve %89'a düşmüştür. 5 mM'lık Zn ve Co tuzları ile %14 ve %43'e kadar düşmüştür. *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazının aktivitesinin K, Co ve Zn ile %47'ye kadar düştüğü görülmüştür. Co^{+2} ve Zn^{+2} gibi ağır metaller, enzim konformasyonunu değiştirdiğinden dolayı enzimi inhibe etmektedirler (Sharon vd., 1998). *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının aktivitesinde K, önemli bir düşüşe (%98) sebep olmamıştır.

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının etanol, izopropanol gibi organik çözücülerde, EDTA ve DMSO varlığında stabil kaldığı, bir çeşit deterjan olan SDS varlığında aktivitesinin 30 dakikada %36'ya düştüğü, disülfid bağlarını indirgeyici bir kimyasal olan β -merkaptetanol varlığında aktivitesinin %334'e yükseldiği belirlendi. Disülfid bağlarını indirgeyici bir kimyasal olan β -merkaptetanol, enzimi inhibe etmediğinden dolayı bu enzim aktivitesi için serbest SH gruplarına veya S-S köprülerine ihtiyaç duymamaktadır

yorumu yapılabilir. Metal şelatlayıcı ajan olan EDTA enzimi inhibe etmediğinden dolayı, bu enzim metalloprotein değildir denilebilir.

Reaksiyonların hızı her 10 °C artışta yaklaşık 2 katına kadar çıkar. Isıl kararlılık da lipazların aranılan özelliklerindendir (Janssen vd., 1994). *Geobacillus thermoleovorans* ID-I bakterisine ait BTID-A ve BTID-B lipazları, 60°C’de 30 dakikada aktivitesini %25 oranında kaybetmiştir (Lee, 2001). *Bacillus* cinsine ait lipaz 60°C’de 15 dakikada aktivitesi %90’a düşmüştür (Wong vd., 1995). Buna karşılık *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının aktivitesi 60°C’de 30 dakikada %98’e düştüğü belirlendi. Isıl kararlılık enzimin yapısıyla alakalıdır (Zhu vd., 2001). Isıl kararlılık pH ve metal iyonları gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Enzimin immobilizasyonu ile ısı kararlılığı artan enzim çalışmaları da vardır.

Endüstriyel alanlarda kullanılabilecek lipazların K_m değeri genellikle 0,1 M-0,00001 M arasında değişmektedir (Fullbrook). *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının K_m ’si *p*-nitrofenil butirat substrat olarak kullanıldığında 0,348 mM olarak bulunmuştur ve bilinen lipazlara göre iyi bir K_m ’ye sahiptir.

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının K_{cat} değeri 1500.71 ± 54.50 olarak belirlenmiştir. *p*-nitrofenil butirat substratı varlığında *Bacillus acidocaldarius* (Manco G., 1994) lipazının K_{cat} değeri 1150, *Geobacillus stearothermophilus* (Wood A.N.P., 1995) lipazının K_{cat} değeri 1380 olduğu göz önüne alınarak *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının daha iyi bir K_{cat} değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazı saflaştırılmış ve aminoasit sekansına göre moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 28 kDa olarak tespit edilmiştir. Termofilik bakterilere ait lipazların moleküler ağırlıkları değişiklik göstermektedir. Örneğin *Bacillus thermocatenulatus* ve *Bacillus stearothermophilus* L1’e ait lipazlar 16 ve 43 kDa ‘dur (Schmidt-Dannerve ark.,1994 ve Kim, H.K vd., 1998). *Bacillus thermoleovorans* ID-1’a ait lipaz 34 kDa’dur (Dong-Woo Lee, 1999). Mezofilik enzimlerin moleküler ağırlıkları 19,4- 76 kDa arasında daha fazla çeşitlilik gösterir (Ihara, F. vd., 1991). Buradan küçük proteinler büyüklere göre daha fazla termal kararlılık gösterir denilebilir.

Anoxybacillus’larda lipaz-esteraz enziminin hiç klonlanıp çalışılmamış olması ve *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının çok iyi optimum pH ve sıcaklığa sahip olması sebebiyle diğer biyokimyasal özellikleri incelenerek endüstriyel alanda kullanılabilecek enzimler arasında yerini alabilir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipaz geni klonlandı ve ekspres edildi. Saflaştırılan lipazın optimum pH, optimum sıcaklık, metal iyon etkisi ve kinetik parametreleri gibi biyokimyasal özellikleri araştırıldı.

Bakterinin lipaz ürettiği katı besiyeride ve spektrofotometrik olarak gözlemlendi.

Bakterinin PCR ile elde edilen 740 nt'lik lipaz geni, ilk olarak p-GEMT Easy klonlama vektörüne klonlandı ve sekans edilerek lipaz olduğu kesinleşti. Lipaz olduğu kesinleşen gen pET28a+ ekspresyon vektörüne klonlanarak ekspres edildi ve saflaştırıldı.

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının optimum pH değerinin 8 optimum çalışma sıcaklığının ise 60°C olduğu tespit edildi. Enzimin substratı olarak paranitrofenil butirat ile ilgili kinetik parametreleri incelendi ve bu substrat için K_m değeri 0,46 mM ve V_{max} değeri 3725,8 U/mg olarak belirlendi. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının K_{cat} değeri $1500.71 \pm 54.50 \text{ s}^{-1}$ olarak belirlendi.

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının pH kararlılığına bakıldı. Enzimin aktivitesi pH 5'de % 68'e, pH 5,5'de %81'e ve pH 10'da % 93'e düştüğü gözlemlendi.

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının ısı kararlılığına bakıldı. 40 °C, 50 °C, 60 °C'de aktivitenin azalmadığı, 65 °C'de aktivitenin % 95'e, 70 °C 'de % 48'e, 75 °C'de %5'e düştüğü belirlendi.

Mg^{+2} , Li, Ca^{+2} , K, Zn^{+2} , ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzları ile metal iyon etkisine bakıldı. LiCl, CaCl_2 , KCl metal tuzlarının 1 mM lık konsantrasyonlarda 15 dakikalık inkübasyonla aktiviteyi %102'ye çıkardığı, MgCl_2 'ün bir değişiklik yapmadığı, ZnCl_2 metal tuzunun aktiviteyi %83'e, CoCl_2 metal tuzunun ise aktiviteyi %90'a düşürdüğü gözlemlendi. Bu tuzların 5 mM'lık konsantrasyonlarda enzimle 1 saatlik inkübasyonunda, MgCl_2 'ün aktiviteyi %93'e, LiCl'ün %98'e, CaCl_2 'ün %91'e, KCl'nin %99'a düşürdüğü, ZnCl_2 metal tuzunun aktiviteyi iyice azaltarak %15'e, CoCl_2 metal tuzunun ise %44'e düşürdüğü gözlemlendi.

Deterjan ve organik çözücülerin *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının aktivitesi üzerine etkileri incelendi. *Anoxybacillus* sp. PDF1 lipazının etanol, izopropanol gibi organik çözücülerde, EDTA ve DMSO varlığında stabil kaldığı, bir çeşit deterjan olan SDS varlığında aktivitesinin 30 dakikada %36'ya düştüğü, disülfid bağlarını indirgeyici bir kimyasal olan β - merkaptetanol varlığında aktivitesinin %334'e yükseldiği belirlendi.

Anoxybacillus sp. PDF1 lipazının moleküler ağırlığının aminoasit sekansına göre 28 kDa olduğu tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Termofilik bakterilerden elde edilen lipazlar, endüstride çok daha önemli bir rol oynayacağına dair beklentiler vardır. Bu nedenle yüksek sıcaklığa, yüksek pH ya ve kimyasal denatürasyona dayanıklı yeni enzimlerin elde edilmesine ihtiyaç vardır. Yapılan bu çalışmada enzimin çalışma pH ve sıcaklığının endüstride kullanılabilecek bir enzim olduğu tespit edildi fakat enzim daha ileri derecede karakterize edilmeli ve organik çözücü ortamlarındaki kararlılığı ve kimyasal sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği ayrıntılı bir şekilde ele alınmalıdır.

Özellikle ısı kararlılığını arttırmak ve endüstride yararlı bir enzim olmasını sağlamaya yönelik çeşitli mutasyon ve immobilizasyon çalışmaları yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y., 2002. Optimization of Thermostable Lipase Production From a Thermophilic *Geobacillus* sp. Using Box-Behnken Experimental Design, Biotechnology Letters, 24, 1217-1222.
- Abdul Hamid, N., Zen H., Tein, O., Halifah, Y., Saari, N. ve Bakar, F., 2003. Screening and Identification of Extracellular Lipase-Producing Thermophilic Bacteria From a Malaysian Hot Spring, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19, 961-968.
- Alkan, M., 2005. Katı Faz Fermantasyon Tekniği ile *Bacillus coagulans*' tan esteraz lipaz enzimi üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Arpigny, J. ve Jaeger, K., 1999. Bacterial Lipolytic Enzymes Classification and Properties, Biochemical Journal, 343, 177-183.
- Aydoğmuş Öztürk, F., 2006. *Pseudomonas* Türlerinde Lipaz Üretimi ve Bazı Kültürel Parametrelerin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Bakır Ateşlier, Z., 2009. Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ün Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Becker, P. ve Reesh, I., 1997. Determination of the Kinetic Parameters During Continuous Cultivation of the Lipase-Producing Thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on Olive Oil, Applied Microbiology and Biotechnology, 48, 184-190
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C. ve Verger, R., 2000. Methods for Lipase Detection and Assay A Critical Review, European Journal of Lipid Science and Technology, 133-153.
- Bornscheuer, U. T. ve Kazlauskas, R. J., 1999. Hydrolases In Organic Synthesis Regio and Stereoselective Biotransformations, Wiley Vch, Weinheim, 105 p.
- Bornscheuer, U. T., 2002. Microbial Carboxyl Esterases, Classification, Properties and Application in Biocatalysis, Fems Microbiology Reviews, 26, 73-81.
- Chen, S., Qian, L. ve Shi, B., 2007. Purification and Properties of Enantioselective Lipase From a Newly Isolated *Bacillus cereus* C71, Process Biochemistry, 42, 988-994.
- Christen, G. L. ve Marshall, R. T., 1984. Selected Properties of Lipase and Protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 Produced in Four Media, Journal of Dairy Science, 67, 1680-1687.

- Converse, C. A., Cooper, A. ve Nutley, M. A., 1981. A Radial-Diffusion Assay for Serum Lipase, Biochemical Society Transactions, 9, 320-321.
- Degrassi, G., Uotila, L., Klima, R. ve Venturi, V., 1999. Purification and Properties of an Esterase From the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Identification of the Encoding Gene, Applied Environmental Microbiology, 65, 3470-3472.
- Dharmstithi, S. ve Kuhasuntisuk, B., 1998. Lipase From *Pseudomonas aeruginosa* LP602 Biochemical Properties and Application for Wastewater Treatment, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 21, 75-80.
- Ewis, H., Abdelal, A. ve Lu, C., 2003. Molecular Cloning and Characterization of Two Thermostable Carboxyl Esterases From *Geobacillus stearothermophilus*, Gene, 329, 187-195.
- Faiz, Ö., 2005. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gönensis* A4, Hücre dışı Lipaz /Esteraz Yeteneğinin İncelenmesi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Fullbrook, P. D., 1996. Practical Applied Kinetics, Stockholm Press, In Godfrey T, West S, Editors, New York, 483–540 p.
- Gandhi, N. N., 1997. Applications of Lipases, Journal of American Oil Chemists Society, 74, 6, 621-634.
- Gandolfi, R., Marinelli, F., Lazzarini, A. ve Molinari, F., 2000. Cell-bound and Extracellular Carboxylesterases From *Streptomyces* Hydrolytic and Synthetic Activities, Journal of Applied Microbiology, 89, 870-875.
- Gao, X. G., Cao, S. G. ve 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.
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P. ve Davidson, S., 1996. Microbial Lipases Production and Applications, Science Progress, 79, 2, 119-157.
- Gray, C. J., 1995. Stabilization of Enzymes With Soluble Additives, Biocatalyst and Biotransformations, 1, 3, 187-196
- Grenner, G., Deutsch, G., Schmidtberger, R. ve Dati, F., 1982. Hochempfindlicher Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Pankreas-Lipase. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 20, 7, 515-519.
- Gupta, M. N., 1995. Thermostability of Enzymes, 124143, New York, 7 p.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N. ve Bradoo, S., 2003. Lipase Assay for Conventional and Molecular Screening: an Overview, Biotechnology and Applied Biochemistry, 37, 63-71.

- Hasan F., Shah A. A. ve Hameed A., 2005. Industrial Applications of Microbial Lipases, Enzyme and Microbial Technology, 235-251
- Hasan, F., Shah, A. A. ve Hameed, A., 2009. Methods for Detection and Characterization of Lipases A, Comprehensive Review, Biotechnology Advances, 10, 1016.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L. ve Comeau, L. C., 2000. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase From a Thermophilic *Rhizopus oryzae* strain Isolated From Palm Fruit, Enzyme and Microbial Technology, 26, 421-430.
- Honda, K., Kataoka, M., Ono, H., Sakamoto, K., Kita, S. ve Shimizu, S., 2002. Purification and Characterization of a Novel Esterase Promising for the Production of Useful Compounds From *Microbacterium sp.* 7-1W, Fems Microbiology letters, 206, 221-227.
- Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P. ve Chatonnet, A., 2004. Esther, the Database of the α/β Hydrolase Fold Superfamily of Proteins, Nucleic Acid Research, 32, 145-147.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretchmar, M. ve Schäfer, W., 2000. Secreted Lipases of *Candida albicans*: Cloning, Characterisation and Expression Analysis of a New Gene Family With at least Ten Members, Archives of Microbiology, 174, 362-374.
- İnan, K., 2005. Türkiyenin Çeşitli Kaplıcalarından *Anoxybacillus* Türlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jacks, T. J. ve Kircher, H. W., 1967. Fluorometric Assay for the Hydrolytic Activity of Lipase Using Fatty Acyl Esters of 4-methylumbelliferone, Analitical Biochememistry, 21, 279-284.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M. ve Misset, O., 1994. Bacterial Lipases, Fems Microbiology Reviews, 15, 29-63.
- Jaeger, K., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B., Schimossek, K., Zonta, A. ve Reetz, M., 1997. Bacterial Lipases for Biotechnological Applications, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 3-12
- Jaeger, K. E. ve Reetz, M. T., 1998. Microbial Lipases Form Versatile Tools for Biotechnology, Tibtech, 16, 396-403.
- Jarvis, G. M. ve Thiele, J. H., 1997. Qualitative Rhodamine B Assay Which Uses Tallow as a Substrate for Lipolytic Obligately Anaerobic Bacteria, Journal of Microbiological Methods, 29, 41-47.
- Jensen, R. G., 1983. Detection and Determination of Lipase (acylglycerol hydrolase) Activity From Various Sources, Lipids, 18, 650-657.

- Jette, J. F. ve Ziomek, Z., 1994. Determination of Lipase Activity by a Rhodamine-Triglyceride-Agarose Assay, Analiticaly Biochememistry, 219, 256-260.
- Jiang, Y., Zhou, X. ve Chen, Z., 2009. Cloning, Expression, and Biochemical Characterization of a Thermostable Lipase From *Geobacillus stearothermophilus* JC, World Journal of Microbiological Biotechnology, 26, 747-751.
- Kademi, A., Ait-Abdelkader, N. ve Fakhreddine, L., 1999. A Thermostable Esterase Activity From Newly Isolated Moderate Thermophilic Bacterial Strains, Enzyme and Microbial Technology, 24, 332-338.
- Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. ve Baratti, J., 2000. Characterization of a New Thermostable Esterase From the Moderate Thermophilic Bacterium *Bacillus circulans*, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 10, 395-401.
- Kaewthong, W. ve H-Kittikun, A., 2004. Glycerolysis of Palm Olein by Immobilized Lipase PS in Organic Solvents, Enzyme and Microbial Technology, 35, 218-222.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R. ve Derekova, A., 2003. Purification and Properties of Thermostable Lipase From a Thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 22, 307-313.
- Kawamoto, T., Sonomoto, K. ve Tanaka, A., 1987. Esterification in Organic Solvents Selection of Hydrolases and Effects of Reaction Conditions, Biocatalysis, 1, 137-145.
- Kıran, Ö., Çömlekçiöğlü, U. ve Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, Journal of Science and Engineering, 9, 1.
- Kouker, L. ve Jaeger, K., 1986. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases, Applied and Environmental Microbiology, 211-213.
- Kristjansson, J. K., 1989. Thermophilic Organisms as Sources of Thermostable Enzymes, Trends Biotechnology, 7, 349.
- Kumar, S., Tsai, C. ve Nussinov, R., 2000. Factors Enhancing Protein Thermostability, Protein Engineering, 13, 3, 179-191.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Lanz, W. W. ve Williams, P. P., 1973. Characterization of Esterases Produced by a Ruminant Bacterium Identified as *Butyrivibrio Fibrisolvens*, Journal of Bacteriology, 113, 1170-1176.
- Lawrence, R. C., Frayer, T. F. ve Reiter, B., 1967. Rapid Method for the Quantitative Estimation of Microbial Lipases, Nature, 213, 1264-1265.

- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. ve Pyun, Y., 1999. Isolation and Characterization of a Thermophilic Lipase From *Bacillus thermoleovorans* ID-1, Fems Microbiology Letters, 179, 393-400.
- Lee, D., Kim, H., Lee, K., Kim, B., Choe, E., Lee, H., Kim, D. ve Pyun, Y., 2001. Purification and Characterization of Two Distinct Thermostable Lipases From the Gram-Positive Thermophilic Bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID1, Enzyme and Microbial Technology, 29, 363-371.
- Li, H. ve Zhang, X., 2005. Characterization of Thermostable Lipase From Thermophilic *Geobacillus* sp. TW1, Protein Expression and Purification, 42, 153-159.
- Maqbool, Q., Johri, S., Rasool, S., Riyaz-ul-Hassan, S., Verma, V., Nargotra, A., Koul, S. ve Qazi, G., 2005. Molecular Cloning of Carboxylesterase Gene and Biochemical Characterization of Encoded Protein From *Bacillus subtilis* (RRL BB1), Journal of Biotechnology, 125, 1-10.
- Martinelle, M., Holmquist, M. ve Hult, K., 1995. On the Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase A and B as Compared with *Humicola lanuginosa* Lipase, Biochimica et Biophysica Acta, 272-276.
- Martinez, A. ve Soberón-Chávez, G., 2001. Characterization of the *lipA* Gene Encoding the Major Lipase From *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83, Applied and Microbial Biotechnology, 56, 731-735.
- Maurich, V., Moneghini, M., Zacchigna, M., Pitotti, A. ve Lencioni, E., 1991. Highperformance Liquid Chromatographic Assay of Pancreatic Lipase Activity, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 9, 5, 427-431.
- Metin, K., 2007. Moleküler Biyoloji, Protein Sentezi ve Yıkımı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 555-576 s.
- Naka, Y. ve Nakamura, T., 1992. The Effects of Serum Albumin and Related Amino Acids on Pancreatic Lipase and Bile Salts Inhibited Microbial Lipases, Bioscience Biotechnology and Biochememistry, 57, 7, 1066-1070.
- Nawani, N. ve Kaur, J., 2000. Purification, Characterization and Thermostability of Lipase From a Thermophilic *Bacillus* sp. J33, Molecular and Cellular Biochemistry, 206, 91-96.
- Nawani, N., Khurana, J. ve Kaur, J., 2006. A Thermostable Lipolytic Enzyme From a Thermophilic *Bacillus* sp. Purification and Characterization, Molecular and Cellular Biochemistry, 290, 17-22.
- Negre-Salvayre, A., Dagan, A., Gatt, S. ve Salvayre, R., 1991. New Fluorescent Pyrenecointaining Substrates for Assaying Cellular Lipases, Cholesterol Esterases and Carboxyl Esterases, Applied Fluorescens Technology, 3, 1-6.

- Noureddini, H., Gao, X. ve Philkana, R. S., 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel Production From Soybean Oil, Bioresource Technology, 96, 769-777.
- Nthangeni, M., Ramagoma, F., Litthauer, D. ve Derek, M., 2004. Development of a Versatile Cassette for Directional Genome Walking Using Cassette Ligation-Mediated PCR and Its Application in the Cloning of Complete Lipolytic Genes From *Bacillus* species, Journal of Microbiological Methods, 61, 225-234.
- Omarov, İ., 2003. *Anoxybacillus gönensis*'ten Isıl Kararlı α -amilazın Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol C. R., Nigam, P., Krieger, N. ve Soccol, U. T., 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology, Biotechnology and Applied Biochemistry, 29, 119-131.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., A Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium From Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. Nov., International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 50, 2109-2117.
- Ruiz, L. ve Rodriguez-Fernandez, M. F. C., 1982. Kinetic Study of Hepatic Triglyceride Lipase From Rat Liver Soluble Fraction, Enzyme, 27, 215-219.
- Sandoval, G. ve Marty, A., 2006. Screening Methods for Synthetic Activity of Lipases, Enzyme and Microbial Technology, 40, 390-393.
- Saxena, R., Sheoran, A., Giri, B. ve Davidson, W., 2003. Purification Strategies for Microbial Lipases, Journal of Microbiological Methods, 52, 1-18.
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L. ve Gupta, J., 2001. Purification and Characterisation of a Thermostable Alkaline Lipase From a New Thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1, Process Biochemistry, 37, 1075-1084.
- Shelley, A. W., Deeth, H. C. ve MacRae, I. C., 1987. Review of Methods of Enumeration, Detection and Isolation of Lipolytic Microorganisms with Special Reference to Dairy Applications, Journal of Microbiological Methods, 6, 123-137.
- Soliman, N., Knoll, M., Fattah, Y., Schmid, R. ve Lange, S., 2007. Molecular Cloning and Characterization of Thermostable Esterase and Lipase From *Geobacillus thermoleovorans* YN Isolated From Desert Soil in Egypt, Process Biochemistry, 42, 1090-1100.
- Sinchaikul S., Sookkheo B., Phutrakul S., Pan F. ve Chen S., 2001. Optimization of a Thermostable Lipase From *Bacillus stearothermophilus* P1 Overexpression, Purification, and Characterization, Protein Expression and Purification, 22, 388-398.
- Staubmann, R., Ncube, I., Gubitz, G. M., Steiner, W. ve Read, J. S., 1999. Esterase and Lipase Activity in *Jatropha curcas* L. Seeds, Journal of Biotechnology, 75, 117-126.

- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çesme, İzmir-Türkiye, 326 s.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu. Kuşadası, Aydın-Türkiye, 446 s.
- Teo J., Zhang L. ve Poh C., 2003. Cloning and Characterization of a Novel Lipase From *Vibrio harveyi* strain AP6, Science Direct, 312, 181-188.
- Thuren, T., Virtanen, J. A., Verger, R. ve Kinnunen, P. J. K., 1987. Hydrolysis of 1 palmitoyl 2 [6-pyren-1-yl]hexanoyl-*sn*-glycero-3-phospholipids by phospholipase A2 Effect of the Polar Head-group, Biochimica et Biophysica Acta, 917, 411-417.
- Topal, S., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M. ve Çeltik, Ö., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Önele Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I Amilaz, Proteaz, Lipaz, Turkish Journal of Biology, 24, 79-93.
- Vogt, G., Woell, S ve Argos, P., 1997. Protein Thermal Stability, Hydrogen Bonds, and Ion Pairs, Journal of Molecular Biology, 269, 631-643.
- Von Tigerstrom, R. G. ve Stelmaschuk, S., 1989. The Use of Tween 20 in a Sensitive Turbidimetric Assay of Lipolytic Enzymes, Journal of Microbiology, 35, 511-514.
- Winkler, U. K. ve Stuckmann, M., 1979. Glycogen, Hyaluronate and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*, Journal of Bacteriology, 138, 663-670.
- Woolley P. ve Peterson S. B., 1994. Lipases, Their Structure, Biochemistry and Applications, Cambridge University Press, Cambridge, 103-110 p,
- Yıldırım M., Çolak A., Çol M. ve Çanakçı S., 2009. A New Recombinant Phosphotriesterase Homology Protein From *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 An Extremely Thermo- and pH-stable Esterase, Process Biochemistry, 44, 1366-1373.

8. EKLER

Ek 1. Ekspresyon primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılan *Anoxybacillus sp.* PDF1e ait 740 nükleotitik lipaz geninin baz dizilimi

ATGGTGAAGATGATTCCCCACAGCCGTTTACGTTTGAAGCGGGCGAACGCGCTGTA
TTGTTGTTGCATGGATTCACTGGCAACTCAGCCGATGTGCGGATGCTTGGGCGTTTT
TTACAAGCGAAAGGCTATACATGCCATGCCCCGATTTACAAAGGACATGGTGTGCCG
CCAGAAGAAGCTTGTTCATACCGGTCCAGAAGATTGGTGGCAAGACGTGATGAACGCT
TACGAACATTTAAAACAAACCCATGAAAAAATCGCTGTAGTTGGCTTATCGCTTGGC
GGTGTGTTTTTCATTGAACTTGGCTATACTGTTCCCTGTTGTGGGCATTGTGCCGATG
TGTGCGCCGATGTATATTAAAAGCGAACAACGATGTACGAAGGAGTTTTAGCGTAC
GCTCGCGAATATAAAAAGCGAGAAGGAAAAGATGAGGAACAAATGAGCGGGAAATGA
TGGAGTTTGCCAAAACGCCGATGAAGACATTAAAAGCATTGCAACAACTGATTGCCG
AAGTGCGCGATCATTTAGATTTTCATTTATGCCCCTATTTTTGTTCGTACAAGCGCGCC
ATGATGACATGATTAACCCAGATAGTGCAATATTATTTATAACGGCGTCAATCTC
CGGTAAAACAAATGAAGTGGTATGAGGAGTCAGGGCACGTCATTACGCTTGATAAAG
AAAAAGAACAGCTTCATGAAGACATTTATACGTTTTTTAGAATCATTAGATTGGTAG

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Sinop'ta doğdu. İlköğrenimini Trabzon 24 Şubat İlkokulu'nda, Orta ve Lise öğrenimini Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2003-2004 öğretim yılında K.T.Ü Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. 2007 yılında K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen K.T.Ü Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmakta olup, iyi derecede İngilizce bilmektedir.