

***Bacillus megaterium* M22'DEN LİPAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Refiye TEKİNER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2011
ANKARA**

Refiye TEKİNER tarafından hazırlanan “*Bacillus megaterium* M22’DEN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Fatma ARSLAN (Jüri Başkanı)

Kimya Anabilim Dalı, G.Ü.

Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

Kimya Anabilim Dalı, G.Ü.

Yrd. Doç. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, G.Ü.

Tarih: 15/06/2011

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Refiye TEKİNER

***Bacillus megaterium* M22'DEN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU**

(Yüksek Lisans Tezi)

Refiye TEKİNER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2011

ÖZET

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolaz, EC. 3.1.1.3), mikro-sulu çevrede rol oynamaları ve hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon (interesterifikasyon, aminoliz, asidoliz, alkoliz) reaksiyonlarını katalizleme yeteneklerine bağlı olarak endüstride geniş bir uygulama alanına sahiptir. Kimyasal olarak sentezi zor olan özel bileşiklerin üretimini stereo ve bölgesel spesifik özellikleri ile kolaylaştırmaları, ester bağına spesifik olmaları, geniş spektrumdaki substratları kullanabilme kabiliyetleri, yan ürün oluşumunu önlemeleri, hidrolitik reaksiyonları katalizlemek için kofaktöre ihtiyaç duymamaları ve organik çözücülerde aktifliklerini korumaları gibi özelliklerinden dolayı lipazlar, son yıllarda özel ilgi kazanmıştır. Yapılan bu çalışmada topraktan izole edilmiş yeni bir *Bacillus megaterium* M22'den lipaz enzimi saflaştırılarak karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Lipaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisi ile % 34,42 verim ile 4 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile lipaz enziminin molekül kütlesi 45 kDa olarak tespit edilmiştir. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığı 40 °C, optimum pH değeri ise 7,0 olarak belirlenmiştir. Metanol, toluen, benzen ve klorobenzen lipaz aktivitesini büyük ölçüde arttırmıştır. Çeşitli metallerin ise lipaz aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. Lipaz enzimi üzerine ayrıca çeşitli reaktiflerin etkisi de incelenmiştir. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin Michaelis-Menten kinetik

sabitleri olan K_m ve V_{maks} değerleri ise sırasıyla 4,74 μM ve 8,13 U/ml olarak tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler : lipaz, saflaştırma, *Bacillus megaterium*, karakterizasyon
Sayfa Adedi : 102
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE LIPASE ENZYME
FROM *Bacillus megaterium* M22**

(M.Sc. Thesis)

Refiye TEKİNER

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

June 2011

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol acylhydrolase, EC. 3.1.1.3), have a wide application field in industry depending on to act in micro-aqueous environment and the capabilities of catalyze esterification, transesterification (interesterification, aminolysis, acidolysis, alcoholysis) reactions. Lipases have gained special interest in recent years because of their features such as the facilitations production of special compounds which has chemically difficult to synthesis with stereo and regional specific features, being specific to ester bond, the capabilities of using a wide spectrum of substrates, preventing the formation of side products, not to need cofactor to catalyze hydrolytic reactions and protections activity in organic solvents. In this study, lipase enzyme from a new *Bacillus megaterium* M22 isolated from soil was purified and made characterization studies. The lipase enzyme was purified 4 fold with % 34,42 yield using ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose anion exchange chromatography. The molecular mass of lipase enzyme was identified 45 kDa with SDS-PAGE. The lipase was purified from *Bacillus megaterium* M22, were determined as the optimum temperature is 40 °C and the optimum pH value is 7,0. Methanol, toluene, benzene and chlorobenzene greatly enhanced the activity of lipase. Various metals were observed to reduce the activity of the lipase. The effect of various reagents on the lipase enzyme also was examined. Michaelis-Menten kinetic constants of the lipase enzyme which were purified from

***Bacillus megaterium* M22, Km and Vmax values of 4.74 μ M and 8.13 U/ml respectively were determined.**

Science Code : 201.1.020

Key Words : lipase, purification, *Bacillus megaterium*, characterization

Page Number : 102

Adviser : Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezim boyunca, çalışmalarımnda bana yol gösteren, mesleki bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Elif LOĞOĞLU'ya, kendisinden 'proteinler' hakkında çok şey öğrendiğim ve deneylerime emek veren Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Aşı Serum Üretim Arş. Müd.'de çalışan 'sayın hocam' kimyager Mustafa HACİÖMEROĞLU'na, laboratuvar arkadaşlarım Esmâ SARI ve Münteha Nur SONUÇ'a ve destekleri ile bugünlere gelmemi sağlayan aileme içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Lipazlar.....	3
2.1.1. Lipazların substrat spesifikliğı.....	5
2.1.2. Lipazların önemi.....	5
2.1.3. Lipazların tarihi ve kaynakları.....	6
2.1.4. Lipazların yapısı ve arayüzey aktivasyonu.....	13
2.1.5. Lipazların etki mekanizması.....	15
2.1.6. Biyoetkileşme.....	16
2.1.7. İmmobilize ve nano lipazlar.....	17
2.1.8. Lipazların kullanım alanları.....	19
2.2. Saflaştırma Basamakları.....	30

2.2.1. Üretim ortamı.....	32
2.2.2. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	33
2.2.3. Diyaliz.....	36
2.2.4. İyon-değişirme kromatografisi.....	37
2.2.5. Jel filtrasyon kromatografisi.....	39
2.2.6. Elektroforez.....	41
2.3. Kaynak Araştırması.....	43
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	53
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	53
3.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar.....	53
3.3. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den Lipaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması.....	54
3.3.1. <i>Bacillus megaterium</i> M22.....	54
3.3.2. <i>Bacillus megaterium</i> M22'nin çoğaltılması ve lipaz üretimi.....	54
3.3.3. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den lipaz enziminin saflaştırılması.....	54
3.4. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den Üretilen Lipaz Enziminin Protein Miktarının ve Aktivitesinin Belirlenmesi.....	55
3.4.1. Protein miktar tayini.....	55
3.4.2. Lipaz enziminin aktivite tayini.....	57
3.5. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den Saflaştırılan Lipaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları.....	58
3.5.1. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin jel elektroforezi ile molekül kütesinin tayini.....	58
3.5.2. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin jel filtrasyon kromatografisine uygulanması.....	61

3.5.3. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi.....	61
3.5.4. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH'sının ve pH stabilitesinin belirlenmesi.....	62
3.5.5. Metal iyonlarının <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi.....	62
3.5.6. Organik çözücülerin <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi.....	63
3.5.7. Çeşitli reaktiflerin <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi.....	63
3.5.8. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin Michaelis-Menten kinetik sabitlerinin belirlenmesi.....	63
4. BULGULAR.....	64
4.1. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den Saflaştırılan Lipaz Enzimi.....	64
4.2. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den Saflaştırılan Lipaz Enziminin Karakterizasyonu.....	65
4.2.1. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE ile tayin edilen molekül kütlesi.....	65
4.2.2. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesinin tespiti.....	66
4.2.3. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığı ve sıcaklık stabilitesi.....	67
4.2.4. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH'sı ve pH stabilitesi.....	69
4.2.5. Metal iyonlarının <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi.....	69
4.2.6. Organik çözücülerin <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi.....	70
4.2.7. Çeşitli reaktiflerin <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi.....	71

4.2.8. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin Michaelis-Menten kinetik sabitleri.....	72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Lipazların katalizlediği reaksiyonların özet halinde gösterimi.....	4
Çizelge 2.2. Proteinlerin özelliklerine göre saflaştırılmalarında kullanılan kromatografik teknikler.....	31
Çizelge 3.1. BSA standartları ve protein örneğinin hazırlanışı.....	56
Çizelge 3.2. % 10'luk poliakrilamid jelinin hazırlanışı.....	59
Çizelge 3.3. SDS-PAGE'de örneklerin gümüş boyama tekniği ile boyanma prosedürü.....	60
Çizelge 4.1. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den üretilen lipaz enziminin saflaştırılma tablosu.....	65
Çizelge 4.2. Çeşitli reaktiflerin lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	72

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Trigliseridlerin lipolitik hidrolizi.....	3
Şekil 2.2. Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.3. Bir lipaz reaksiyonun basitleştirilmiş katalitik mekanizması.....	16
Şekil 2.4. Diyaliz işleminin şematik gösterimi.....	37
Şekil 2.5. Katyon değiştiricili iyon-değiştirme kromatografisi.....	38
Şekil 2.6. Jel filtrasyon kromatografisi.....	40
Şekil 2.7. Jel elektroforez tankı.....	41
Şekil 3.1. BSA standart grafiği.....	56
Şekil 3.2. p-nitrofenol standart grafiği.....	58
Şekil 4.1. DEAE-selüloz kromatografisinden elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein miktarları.....	64
Şekil 4.2. Süperdeks 75 kolonu için hazırlanan standart grafik.....	67
Şekil 4.3. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin sıcaklık profili.....	68
Şekil 4.4. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin 40, 50 ve 60 °C'deki sıcaklık stabilitesi.....	68
Şekil 4.5. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin pH profili.....	69
Şekil 4.6. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi.....	70
Şekil 4.7. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	71
Şekil 4.8. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin p-nitrofenil laurat kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	72

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. İyon-değiştirme ve jel filtrasyon kromatografilerinin kullanıldığı Pharmacia BioPilot FPLC	55
Resim 3.2. SDS-PAGE'in basamakları.....	61
Resim 4.1. DEAE-selüloz kolonundan elde edilen kromatogram	64
Resim 4.2. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE'de moleköl kütlesinin tespiti.....	66
Resim 4.3. <i>Bacillus megaterium</i> M22'den saflaştırılan lipaz enziminin jel filtrasyon kromatogramı.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
APS	Amonyum persülfat
Asp	Aspartik asit
ATPS	Sulu iki fazlı sistem
B.	<i>Bacillus</i>
BSA	Sığır serum albümini
C.	<i>Candida</i>
DEAE-selüloz	Dietilaminoetil selüloz
dH₂O	Damıtık su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	Ditiyotreitol
EBA	Genişletilmiş tabaka absorpsiyonu
EC.	Enzim Komitesi
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
Gly	Glisin
HIC	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
His	Histidin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
H₂O₂	Hidrojen peroksit
Leu	Lösin
MPGM	Metoksilfenil glisidik asit metil ester
P.	<i>Pseudomonas</i>
PET	Poliyeten tereftalat
PCMC	Protein-kaplı mikro kristaller
PLA	Polilaktat

Kısaltmalar	Açıklama
PLLA	Poli-L-laktik asit
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
pNP	<i>p</i> -nitrofenil
pNPC	<i>p</i> -nitrofenil kaprilat
pNPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitat
SDS	Sodyum dodesilsülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat - poliakrilamid jel elektroforezi
Ser	Serin
TBO	<i>t</i> -bütil oktanoat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan

1.GİRİŞ

Bir reaksiyonu hızlandıran, fakat kendisi reaksiyondan değişmeden çıkan maddeye 'katalizör' denir. 'Enzim' ise canlı hücreler tarafından meydana getirilen, ancak etki yapabilmesi için hücrenin varlığını gerektirmeyen, ısıya dayanıksız, protein yapısında organik bir katalizördür. Enzimler, oldukça özel yapı kazanmış genellikle büyük protein molekülleridir. Proteinlerdeki aminoasitlerin primer dizilişi, genler tarafından belirlenen sıraya göre olmaktadır. Enzim proteininde bulunan aminoasitlerin özel dizilişi, enzimin belirli bir konformasyonu ve kuarterner yapıyı kazanmasında en önemli rolü oynamaktadır. Enzim proteinlerinin yapısı sadece enzimin biyolojik aktivitesi için değil, aynı zamanda metabolik olayların kontrolünü sağlamak için de gereklidir. Enzimler, hücrenin ara metabolizmasını oluşturan binlerce kimyasal reaksiyonu yöneten moleküller oldukları için; enzim reaksiyonları yaşam yönünden en önemli reaksiyonlardır. Enzimler bir veya birden fazla substratı etkilerken aktivite göstermek için bazen koenzime bazen de kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Bir enzimin ürünü, başka bir enzimin substratı olabilir ve bu karşılıklı etkileşimler, hücre metabolizmasının düzenlenmesinde etkin rol oynar.

Enzimlerin 2 çarpıcı özelliği vardır:

- Enzimlerin katalize ettiği reaksiyonların hızları, katalize edilmeyen aynı reaksiyonun hızından 10^3 - 10^8 kat daha fazladır.
- Enzimler o kadar stereospesifiktirler ki, tek bir metabolitin tek bir reaksiyonunu katalize ettikleri gibi, sadece enantiyomerleri değil identik atomları veya grupları da parçalayabilirler [Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008].

İnsanoğlu enzimleri; bitkilerden, hayvan organlarından veya mikroorganizmalardan elde edilen özütlerle farklı formlarda yıllardır kullanmaktadır. Modern enzim teknolojisinin başlangıcı, XIX. yüzyılın sonlarında Danimarkalı kimyager 'Christian Hansen'in buzağuların kurutulmuş (tuzlu çözeltisi) midelerinden rennin enzimini özütleyerek üretmesi sayılmaktadır. Bu çalışmayı, enzimlerin uygulama alanları ve

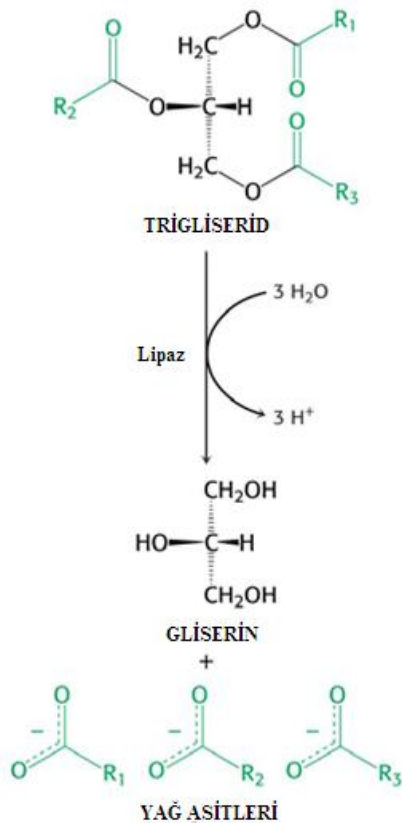
kaynakları üzerinde yapılan geniş araştırmalar takip etmiştir. Enzimlerin ticari olarak smrlebildiği anlaşıldığı zaman, endüstriyel biyoteknoloji sektörü büyük bir buluşla karşılaşmıştır. Çeşitli amaçlar için, büyük miktarda enzimler üretilmeye ve satılmaya başlanmıştır. Endüstriyel enzim pazarının çiçeklenmesi, hayat bilimi-endüstri sektörünün ana gelir jeneratörlerinden biri olmuştur. Global Endüstri Araştırma Kuruluşu, endüstriyel enzimlerin dünya çapındaki pazarı üzerinde kapsamlı bir analiz yapmıştır. Bu global stratejik iç raporunda, enzimlerin dünya pazarındaki bütçesinin 2012 yılıyla 2,9 milyar doları aşacağı ve ana ürün parçalarının karbohidraz, proteaz ve lipazları içereceği bildirilmiştir [Sangeetha ve ark., 2011].

Yapılan bu çalışmada, topraktan izole edilmiş yeni bir *Bacillus megaterium* M22 bakterisi uygun besi ortamında çoğaltılarak lipaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücre izolatları uzaklaştırılarak elde edilen ham ekstrakt, uygun amonyum sülfat konsantrasyonu ile muamele edilerek çöktürme işlemi yapılmıştır. ktrme sonucu elde edilen protein numunesi diyaliz edilerek kromatografik teknikler için hazır hale getirilmiştir. n saflaştırma basamakları tamamlanan enzim numunesi, iyon değiştirme ve jel filtrasyon kromatografilerine uygulanmıştır. İleri derecede saflaştırılmış lipaz enziminin SDS-PAGE yöntemiyle molekül kütlesi tespit edilmiştir. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak; lipaz enziminin metaller, organik çözücüler, pH, sıcaklık gibi faktörlerde aktivitesindeki değişiklikler belirlenerek yorumlanmış ve endüstriyel olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipazlar

Lipaz (triacilgliserol açilhidrolaz, EC. 3.1.1.3), pek çok uygulaması ve endüstriyel potansiyeli olan önemli bir hidrolitik enzimdir. Lipazlar, ‘Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komitesi’nce belirlenen enzim sınıflandırmasında hidrolazlar (EC. 3), ester bağlarını parçalayanlar (EC. 3.1), karboksilik ester hidrolazlar (EC. 3.1.1) ve triacilgliserol hidrolazlar (EC. 3.1.1.3) içinde yer almaktadır (Anonim, 1992). Genel olarak trigliseridleri, di ve mono-açilgliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 2.1) [Brocher ve Holf, 1979; Jaeger ve ark., 1994; Gilham ve Lehner, 2005; Rahman ve ark., 2006]. Bununla birlikte, lipazlar esterleşme, transesterleşme, interesterleşme, aminoliz, asidoliz ve alkoliz reaksiyonlarını da katalizlemektedir [Sangeetha ve ark., 2011].



Lipidler önemli fizyolojik rollere sahip temel makromoleküllerdir. Çevirme (turnover) özellikleriyle değerlendirilen lipolitik enzimler, genellikle karboksiesterazlar (EC. 3.1.1.1) olarak adlandırılan esterazları ve lipazları içermektedir. Esterazlar ve lipazlar arasındaki dikkat çekici temel fark; esterazların suda çözünen kısa zincirli trigliseridleri ($C \leq 12$) hidrolizlerken, lipazların suda çözünmeyen uzun zincirli ($C \geq 12$) açilgliseridleri hidrolizlemesidir. Yani lipazların substrat hidrofobikliği esterazlara göre daha yüksektir. Esterazlar lipazlardan; lipazlara özgü olan arayüzey aktivasyonu göstermemeleri ve enantiyoseçici özelliğinin daha düşük olması ile de ayrılmaktadır [Eggert ve ark., 2002; Faiz, 2005].

Şekil 2.1. Trigliseridlerin lipolitik hidrolizi [Elibol ve ark., 2008]

Lipazlar 3 tip reaksiyonu katalizlemektedir:

- i) *Hidroliz:* Su oranının fazla olduğu sulu ortamlarda meydana gelir ve ester hidrolizi baskın olan reaksiyondur.
- ii) *Esterifikasyon:* Susuz çözücüler gibi susuz ortamlarda veya düşük oranda su bulunan şartlarda gerçekleşmektedir (ortamdaki su miktarı kontrol edilebilirse yüksek verimli ürünler elde edilebilmektedir).
- iii) *Transesterifikasyon:* Bir esterin asit kısmı diğeriyle yer değiştirdiğinde (eğer açıl veren serbest bir asitse asidoliz reaksiyonu; açıl veren bir esterse interesterifikasyon reaksiyonu; açıl alan grup nükleofil bir alkolese alkoliz; açıl alan grup bir amin grubu ise de aminoliz reaksiyonu) oluşmaktadır (Bkz. Çizelge 2.1) [Divakar ve Manohar, 2007].

Çizelge 2.1. Lipazların katalizlediği reaksiyonların özet halinde gösterimi [Rahman ve ark., 2006].

HİDROLİZ $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array} + \text{H}_2\text{O}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{OH} \end{array} + \text{R}_2-\text{H}_2\text{O}$
ESTERİFİKASYON $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{OH} \end{array} + \text{R}_2-\text{OH}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array} + \text{H}_2\text{O}$
TRANSESTERİFİKASYON Alkoliz $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array} + \text{R}_3-\text{OH}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_3 \end{array} + \text{R}_2-\text{OH}$
İnteresterifikasyon $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_3-\text{C}-\text{O}-\text{R}_4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_4 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_3-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array}$
Asidoliz $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_3-\text{C}-\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{OH} \end{array}$
Aminoliz $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{R}_2 \end{array} + \text{R}_3-\text{NH}_2$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{NHR}_3 \end{array} + \text{R}_2-\text{OH}$

2.1.1. Lipazların substrat spesifikliği

Lipazlar özelliklerine göre spesifik olmayan lipazlar, (1,3)-spesifik lipazlar ve yağ asidi spesifik lipazlar olmak üzere üç grup altında incelenebilmektedir.

Spesifik olmayan lipazlar; trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki ester bağlarını hidrolizleyebilme yeteneğine sahip olup reaksiyon sonunda trigliseridlerden, gliserin ve serbest yağ asitleri elde edilmektedir. Ara ürün olarak diaçil ve monoaçil gliseridler oluşmaktadır. *Candida cylindraceae*, *Corynebacterium acnes* ve *Staphylococcus aureus* tarafından üretilen lipazların bu grupta olduğu bilinmektedir.

Spesifik lipazlar, nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve/veya 3 pozisyonlarından spesifik olarak katalizlerler. Reaksiyon sonunda yağ asitleri, (1,2)-veya (2,3)-diaçilgliseridler ve 2-monoaçilgliseridler oluşur. Oluşan bu ürünler kararsız oldukları için (1,3)-diaçilgliseridlere ve 1 veya 3-monoaçilgliseridlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilir ve sonuçta 1,3-spesifik lipazlar da spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseridleri, gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalayabilmektedir. Pankreas, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* sp. ve *Mucor* sp. türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-spesifik lipazlardır.

Yağ asidi spesifik lipazlar ise açilgliseridlerdeki bazı yağ asitlerine spesifik olup sadece bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını hidrolizlerler. Bu lipazlar organik sentez tasarımlarında özellikle içesterleşme reaksiyonlarında kullanılarak hedeflenen özel bileşikler elde edilebilmektedir [Faiz, 2005; Sağ Açıkkel ve Çelebi, 2006].

2.1.2. Lipazların önemi

Lipazlar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda geniş ölçüde dağılmış her yerde bulunan enzimlerdir [Dutta ve Ray, 2009]. Lipazlar mikro-sulu çevrede rol oynamaları ve hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon (interesterifikasyon, aminoliz, asidoliz, alkoliz) reaksiyonlarını katalizleme yeteneklerine bağlı olarak son

yıllarda özel ilgi kazanmıştır [Rahman ve ark., 2006; Divakar ve Manohar, 2007; Joseph ve ark., 2008]. Lipazların çoğu endüstriyel uygulaması, onların yüksek bölge ve enantiyo seçicilik özellikleri üzerinde odaklanmıştır [He ve ark., 2010]. Kimyasal olarak sentezi zor olan özel bileşiklerin üretimini (örneğin organik sentez tasarımlarında) stereo ve bölgesel spesifik özellikleri ile kolaylaştırmaları, ester bağına spesifik olmaları, geniş spektrumdaki substratları kullanabilme kabiliyetleri, yan ürün oluşumunu önlemeleri gibi avantajlara sahiptirler. Aynı zamanda, lipazlar hidrolitik reaksiyonları katalizlemek için kofaktöre ihtiyaç duymazlar ve organik çözücülerde aktifliklerini korurlar [Sekhon ve ark., 2005; Salgın ve ark., 2007; Sangeetha ve ark., 2011]. Tüm bu özelliklerinden dolayı lipazlar son yıllarda büyük bir ilgi uyandırarak enzimolojistlerin birinci odak merkezi haline gelmiştir ve sınıflandırılması [Arpigny ve Jaeger, 1999], deney ve keşfetme yöntemleri [Gilham ve Lehner, 2005; Hasan ve ark., 2009], saflaştırma stratejileri [Saxena ve ark., 2003; Gupta ve ark., 2004] ve endüstriyel uygulamaları [Hasan ve ark., 2006; Sangeetha ve ark., 2011] üzerinde ilgi çekici kapsamlı incelemeler mevcuttur.

2.1.3. Lipazların tarihi ve kaynakları

Lipaz ilk defa 1856 yılında 'Claude Bernard' tarafından pankreas salgısında keşfedilmiştir. Hayvan pankreas özütleri, lipazın ticari uygulamalarında geleneksel olarak kullanılmaktaydı. Ancak, lipazın endüstriyel potansiyelinin büyümesiyle ve ihtiyacın haysansal kaynaklardan karşılanamaması üzerine lipazın mikrobiyal kaynakları keşfedilmiştir.

Lipazlar, çok sayıda bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaktan izole edilmektedir. Mikroorganizmalardan lipazların kolaylıkla izole edilebilmesi, bakteri ve mantarların lipaz kaynağı olarak baskın kullanılmalarını sağlamaktadır.

Mikrobiyal kaynaklar

Enzim üretiminde mikrobiyal kaynaklar bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre daha üstündür. Bu durum, mikroorganizmaların kolay üretilibilmeleri ve genetik olarak

modifiye edilebilmeleriyle ilişkilendirilmektedir [Hasan ve ark., 2006]. Bunlara ek olarak, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları gibi sebepler de bulunmaktadır. Mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre seçilmesi de önemlidir [Eren Kıran ve ark., 2006]. Endüstride kullanılan mikrobiyal lipazlar bakteri, mantar ve bir geçiş formu olan aktinomiçet sınıfı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir [Babu ve Rao, 2007]. Mantarlardan izole edilen lipazlar, mikrobiyal lipazlar arasında en çok çalışılan lipazlardır. Bununla birlikte, bakteriyel kaynaklar da sık sık görüntülenmekte ve lipaz üretimi için geliştirilmektedir. Bakteriyel lipazlar ilk defa 1901 yılında *Serratia marescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinde gözlenmiştir [Hasan ve ark., 2006]. Bu tarihten itibaren, pek çok farklı bakteri türünden lipaz üretimi yaygın bir şekilde çalışılmakta ve bildirilmektedir. Özellikle, *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. türlerinden olmak üzere bakteriyel lipazların üretimini içeren pek çok belge mevcuttur. *P. aeruginosa* [Madan ve Mishra, 2010], *P. fragi* [Nishio ve ark., 1987], *P. fluorescens* [Rajmohan ve ark., 2002; Yang ve ark., 2009], *Pseudoalteromonas haloplanktis* [De Pascale ve ark., 2008], *B. megaterium* [Lima ve ark., 2004; Sekhon ve ark., 2005], *B. pumilus* [Kim ve ark., 2002; Sangeetha ve ark., 2010a], *B. sphaericus* [Ropaning Sulong ve ark., 2006], *B. stearothermophilus* [Kambourova ve ark., 2003], *B. alcalophilus* [Ghanem ve ark., 2000], *B. thermocatenulatus* [Quyen ve ark., 2003], *B. subtilis* [Ahmed ve ark., 2010; Singh ve ark., 2010], *B. licheniformis* [Chakraborty ve Raj, 2008b; Madan ve Mishra, 2009; Sangeetha ve ark., 2010b], *B. coagulans* [Mnisi ve ark., 2005; Kanwar ve ark., 2006], *B. thermoleovorans* [Lee ve ark., 2001; Castro-Ochoa ve ark., 2005], *B. cereus* [Chen ve ark., 2007; Dutta ve Ray, 2009] ve *B. halodurans* [Ramchuran ve ark., 2006]. *Acinetobacter* sp. [Li ve ark., 2004; Ahmed ve ark., 2010], *Staphylococcus* sp. [Talon ve ark., 1996; Mosbah ve ark., 2005; Pogaku ve ark., 2010], *Streptococcus* sp. [Tripathi ve ark., 2004], *Streptomyces* sp. [Gunalakshmi ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2008], *Burkholderia* sp. [Boekema ve ark., 2007; Wang ve ark., 2009], *Serratia marescens* [Long ve ark., 2007], *Enterococcus faecalis* [Kar ve ark., 1996], *Lactobacillus plantarum* [Lopes ve ark., 1999], *Aeromonas sobria* [Lotrakul ve Dharmstithi, 1997], *Corynebacterium* sp. [Roy ve ark., 2004; Joshi ve

ark., 2006], *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Alcaligenes* sp. ve *Chromobacterium* sp. [Riaz ve ark., 2010] de çalışılan diğer türlerdir.

Bacillus sp. nin genel özellikleri

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle, bakteriler dünyasında dikkat çeken mikroorganizmalardandır. *Bacillaceae* ailesine ait olan *Bacillus* cinsi; çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşmaktadır. Genellikle gram-pozitif boyanmakla birlikte, bazı türleri kültürün yaşına bağlı olarak gram-negatif reaksiyon verebilmektedir. *Bacillus* cinsinin asıl habitatı, çeşitli toprak mikroflorasıdır. Besin maddeleri açısından zengin topraklarda bulunabildikleri gibi, besince fakir topraklardan da izole edilebilmektedirler. Toprak dışında tatlı su ve denizlerden, buraların çöküntülerinden, gıdalardan, bitki rizosferlerinden, bazı canlıların bağırsak sistemlerinden ve hatta bazı böcek larvalarından da izole edilebilmektedirler. Bazı türleri ise, ekstrem şartlarda büyüebilme özelliği gösterdiklerinden, uç pH değeri olan ve/veya yüksek ısıli ortamlardan izole edilebilmektedir [Yılmaz, 2003a].

Bacillus megaterium toprakta en çok bulunan öbakterilerden biri olup, tarla ve bahçelerde toprak aşılama olarak kullanılan bir bakteri türüdür. Gram-pozitif olan *Bacillus megaterium*, yüksek protein salgılama potansiyeline sahiptir. Çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanabildiği için *Bacillus megaterium*'un çoğalması kolay ve ucuzdur. Bunlara ek olarak, bazı *Bacillus megaterium* türleri ekstrem koşullara dayanıklı olup yaşayabilmektedir [Stammen ve ark., 2010; David ve ark., 2011; wikipedia, 2011].

Bakteriyel lipazların hücresel yerleşimi

Bakteriyel lipazlar hücre içinde, hücre zarına bağlı veya hücre dışında bulunabilmektedir. Örneğin, *Bacillus clausii* türünün sadece hücre içi lipaz ürettiği bildirilmiştir [Lee ve Park, 2008]. Sadece hücre içi lipaz üreten türler, uzun zincirli

trigliseridler yerine gliserol ve basit lipidlerde büyüyebilmektedir. Ertuğrul ve ark. (2007), bir *Bacillus* sp. türünde hem hücre içi hem de hücre dışı lipaz üretimini tespit etmiştir. Boekema ve ark. (2007), hücre zarına bağlı yardımcı proteinler tarafından, birikmiş hücre içi lipazın salgılanmasının sonucu olarak hücre dışı lipaz üretimi olduğunu bildirmiştir.

Bakteriler lipazı, salgısal sistemlerin farklı tipleri aracılığıyla dış ortama salgılar. Tip I Salgısal Sistem (T1SS) üç protein altbiriminden oluşmuş enerjiye dayalı bir yürütücü kompleks içermektedir. Tip II Salgısal Sistemi (T2SS) iki unsura sahiptir; salgı-bağımlı yol (genel protein salgısı) ve ikiz-arjinin yer değiştirmesine bağlı yol. Bakteriyel lipazlar genel protein salgısı yolu (T2SS) ile katlanmamış durumda periplazmik boşluğa salgılanır; burada lipaz-spesifik foldaz (Lif) adı verilen bir yardımcı protein yardımıyla katlanır. Daha sonra, katlanmış lipazlar taşıyıcı kompleks (T1SS) tarafından dış ortama taşınırlar [Angkawidjaja ve Kanaya, 2006; Buist ve ark., 2006].

Bakteriyel lipazların sınıflandırılması

Serin hidrolazlar ailesine ait olan lipazların aktivitesi serin, histidin ve aspartat/glutamattan oluşan üçlü bir katalitik içerik ve α/β hidrolaz katlanmasına dayanmaktadır [De Pascale ve ark., 2008]. Bakteriyel lipazlar, araştırmacıların sınıflandırma için yaptığı pek çok girişime rağmen lipolitik ve esterolitik enzimler olarak iyi ayırt edilememektedir [Rosenstein ve Gotz, 2000]. Bakteriyel lipolitik enzimler 8 sınıfa ayrılır; en geniş aile ise Arpigny ve Jaeger (1999) tarafından 6 alt sınıfa daha ayrılmıştır. Bu sınıflandırma enzimlerin biyolojik özelliklerine ve korunmuş dizi motiflerine göre yapılmıştır. Aile I'e ait olarak gerçek lipazlar *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Staphylococcus* sp. lipazlarının çoğunu içermektedir. Bu lipazlar, klasik katalitik Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly pentapeptidine sahiptir. Aile II lipazları aktif bölgelerinde Gly-Asp-Ser-Leu dizilimi gösterir ve *Streptomyces* sp., *Aeromonas* sp. ve *Salmonella* sp. türlerinin esterazları da bu aileye aittir. Aile III, Aile II esterazlarından farklı olarak *Streptomyces* sp. türlerinin hücre dışı lipazlarını kapsamaktadır. Memeli hormon duyarlı lipazlar Aile IV'de

gruplandırılırken, *Pseudomonas oleovorans* ve *Haemophilus influenza* gibi mezofilik bakterilerin lipazları Aile V'de incelenmektedir. Aile VI lipazları en küçük esterazlardan oluşur ve aktif enzimler dimerik yapılıdır. Aile VII lipazları daha büyük (molekül kütleli) esterazlar olup, aminoasit dizilimi ökaryotik asetilkolin esterazları ile benzerdir. Aile VIII lipazları ise β -laktamaz sınıfı enzimlerle benzerlik göstermektedir. Arpigny ve Jaeger'in tanımına göre diğer bazı enzimlerin dizilimleri bu sekiz aile içinde gruplandırılmamıştır ve keyfi olarak yeni Aile IX ve X olarak sınıflandırılmıştır. De Pascale ve ark. (2008) tarafından bildirilen kesin olarak aktif bir lipaz klasik sınıflandırmaya uymamıştır ve bu yüzden yeni bir lipolitik aileye ait olan bir lipaz olarak bildirilmiştir.

MELDB, mikrobiyal lipaz ve esterazların kapsamlı bir veritabanıdır [Kang ve ark., 2006]. Sekiz süper aileden hiçbirine ait olmayan lipazlar MELDB veritabanında grup-dışı, keyfi olarak klasik sınıflandırmada gruplandırılmıştır. Bu sınıflandırma, bölgesel bir dizilim sıralaması ve algoritma ile oluşan bir grafiğe bağlı olarak enzimlerin korunan dizilimlerine göre yapılmaktadır [Sangeetha ve ark., 2011].

Bakteriyel lipazların biyokimyasal özellikleri

Bir enzimin maksimum katalitik performansını göstermesi için ihtiyaçlarının anlaşılması, enzimin biyokimyasal özelliğinin bilinmesi ile gerçekleşmektedir. Bu, aynı zamanda enzimin en iyi endüstriyel kullanımı için de gereklidir. Enzimlerin genellikle optimum pH ve sıcaklık, katalitik aktivite üzerinde kofaktör, inhibitör ve arttırıcı maddeler, organik çözücüler ve proteazlara karşı dayanıklılığı gibi özellikleri çalışılmaktadır.

Asidik ve alkalin lipazlar: Doğada bulunan çoğu bakteriyel lipaz alkalin lipazdır; alkalin lipazlar pek çok endüstriyel proses için ümit verici katalizörlerdir [Nawani ve Kaur, 2007; Ahmed ve ark., 2009]. Lipazlar ve lipaz üreten mikroorganizmalar ile ilgili pek çok kaynak varken, asidik lipazlar hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Mantarlardan özellikle *Aspergillus niger*'den elde edilen asidik lipaz bilinmekle

beraber, Ramani ve ark. (2010), *Pseudomonas gessardii* bakterisinden asidik lipazın üretimini bildirmiştir.

Termofilik ve düşük sıcaklıklara uyumlu lipazlar: Isıya karşı stabilite, 60 °C ve daha yüksek sıcaklıklar gerektiren proseslerde kullanılan endüstriyel enzimler için istenen bir özelliktir. Lipazlar genelde ısıya dayanıklıysa tercih edilmektedir. Bunun sebebi, lipolitik reaksiyonlarda çalışılan yüksek sıcaklıklar ve proseslere erime noktası yüksek lipidik substratların katılmasıdır. *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. türünden çok sayıda ısıya dayanıklı lipaz izole edilmekte ve çalışılmaktadır [Nawani ve Kaur, 2000; Kumar ve ark., 2005; Ahmed ve ark., 2009; Dutta ve Ray, 2009]. Düşük sıcaklıklara uyumlu lipazlar da biyoteknolojik uygulamalarda geniş bir alan ihtiva etmektedir. Bu enzimler, 0 ve 30 °C arasındaki sıcaklıklarda yüksek katalitik aktivite gösterir [Cai ve ark., 2009] ve genellikle 5 °C civarındaki sıcaklıklarda yaşayan, soğuğu seven mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir [Joseph ve ark., 2008]. Joseph (2006), *Bacillus sphaericus* MTCC 7526'dan, Choo ve ark. (1998) ise *Pseudomonas* sp. türünden elde edilen soğuk-uyumlu lipaz bildirmiştir.

Deterjan/yüzey aktif maddelerin etkisi: Yüzey aktif maddeler, su-yağ arayüzeyini genişleterek lipoliz oranını arttırmaktadır. Bununla birlikte, bu durum tüm yüzey aktif maddeleri için geçerli değildir; konsantrasyonlarına bağlı olarak etkileri değişmektedir. Örneğin, Tween-80'in yüksek konsantrasyonu (% 1) *Bacillus pumilus* tarafından üretilen lipazı inhibe ederken, % 0,5 Tween-80 maksimum lipaz üretimini sağlamıştır [Zhang ve ark., 2009a,b]. SDS lipazlarda inhibitör etkisi gösterirken Triton X-100 ve Tween reaksiyon oranlarını arttırmıştır [Quyên ve ark., 2003; Lianghua ve Liming, 2005]. Bu etkilerin tersi de görülmüş olup; Dutta ve Ray (2009) SDS'nin uyarıcı bir etki gösterirken Triton ve Tween'in lipaz aktivitesini inhibe ettiğini tespit etmiştir.

Metal iyonlarına bağlılık: Metal iyonları enzimlerin katalitik aktivitesini artırır ve aynı zamanda onların ısıya dayanıklı olmasını sağlar [Chakraborty ve Raj, 2008a]. Çoğu enzim aktif yapısını korumak için metal iyonlarının varlığına ihtiyaç duymaktadır [Sharma ve ark., 2002]. Farklı lipazlar metal iyonlarına farklı tepki

gösterir; gerçek lipazlar için aktivatör etkisi gösteren metal iyonları diğer bazı lipazların aktivitesini engelleyebilmektedir. Genellikle çalışılan metal iyonları Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} vb. dir. Pek çok metal-bağımlı/metalo lipazlar bilinmektedir ve Ca^{2+} bütün lipazlar için uyarıcı bir etki göstermektedir [Chakraborty ve Raj, 2008a; Ahmed ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2009a, b]. Bu etki Ca^{2+} 'nin enzime bağlanmasıyla yüklenen yapısal değişikliklerle ilişkilendirilebilmektedir. Katlanmış yapıdaki enzim, elektrostatik itme kuvvetlerini azaltmak için ayrı hareket etmeye çalışan negatif yüklü aminoasit kalıntılarının olduğu bir bölgeye sığınır ve bu durum enzimin stabilitesine zarar vermektedir. Bununla birlikte, metal iyonu enzime bağlanarak disülfür bağına benzer şekilde çapraz-bağlı polipeptit zincirinden oluşan bir köprü formunu alır böylece enzim-metal iyonu kompleksi sağlam ve dayanıklı hale gelmiş olur. Diğer yandan, Ca^{2+} metaline bağımsız ısıya-dayanıklı ve aktivite gösteren lipazlar da bildirilmiştir [Kim ve ark., 2002]. Kalsiyum-bağımsız lipazlar, çamaşır deterjanlarında bulunan EDTA gibi şelatörlerin varlığında etkin biçimde çalışabilmektedir [Sangeetha ve ark., 2011].

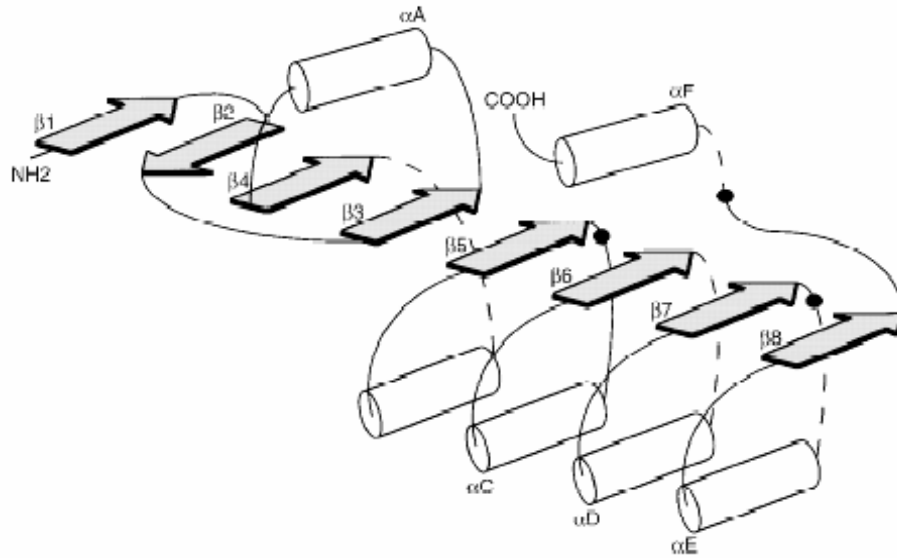
Organik çözücülere dayanıklılık: Organik çözücüler biyokatalizörleri içeren reaksiyon sistemlerinde kullanıldığında inorganik eşlerine veya suya göre daha avantajlıdır. Organik çözücüler, substratların çözünürlüğünün artmasına, ürünlerin kolayca geri kazanılmasına ve sentetik reaksiyonlarda değişken dengenin ileri yönde gitmesine yardımcı olmaktadır [Zhang ve ark., 2009a, b]. Organik çözücülere dayanıklı-lipazlar biyopolimerlerin sentezinde, transesterifikasyon reaksiyonlarında ve biyodizel üretiminde etkili katalizörler olarak rol oynamaktadır [Dizge ve ark., 2009; Singh ve ark., 2010]. Lipazların stabilite ve aktivitesi genellikle izopropanol, metanol, etanol, aseton, gliserin, n-hekzan, n-heptan, n-oktan, n-dekan, benzen, toluen, ksilen, stiren, etilbenzen, siklohekzan, dimetilsülfoksit, tetrahidrofuran, kloroform ve asetik asit gibi organik çözücülerin varlığında test edilmektedir [Cadirci ve Yasa, 2009; Zhang ve ark., 2009a, b]. Lipazların çözücülere olan duyarlılığı çözücülerin polaritelerine bağlı olarak değişir; non-polar çözücüler polar çözücülere göre stabiliteyi daha fazla arttırmaktadır [Ahmed ve ark., 2010]. Farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar, çeşitli organik çözücülere farklı derecelerde

dayanıklılık gösterir ve böylece lipazın ticari kullanımını, bu çözücülere karşı dayanıklılığın baştanbaşa bir analizini gerektirmektedir.

Proteazlara karşı dayanıklılık: Lipazların amilaz ve proteaz gibi diğer enzimlerle kombinasyonu geniş bir uygulama alanına sahiptir. Proteazlar midenin kendi mukozasını sindirmesi (otodijesyon) ve aynı zamanda üretilen diğer enzimlerin parçalanmasında yetenekli hidrolitik enzimlerdir [Aguilar ve ark., 2002]. Literatürde yer alan eksiksiz bir çalışmada, lipaz ve proteazın 'ilişkili' üretimini belirten çeşitli bilgiler mevcuttur [Rajmohan ve ark., 2002]. Bu çalışmalar üretim parametrelerinin etkisiyle veya genetik değişikliklerle proteaz üretimi etkilenmekte; lipaz üretimi de artmaktadır. Örneğin, fermantasyon sırasındaki artan hava basıncının proteaz ve dolayısıyla artan lipaz üretimini azalttığı tespit edilmiştir [Lopes ve ark., 2008]. Westers ve ark. (2005), hücre duvarına veya büyüme ortamına yerleşmiş stoplazma dışındaki proteazların *Bacillus subtilis* tarafından üretilen lipazın bozunmasına karşı etkisini araştırmıştır. Bununla beraber, proteolize dayanıklı lipazlarla ilgili de bazı bilgiler bulunmaktadır. Zhang ve ark. (2008), Dutta ve Ray (2009) *Streptomyces fradiae* ve *Bacillus cereus*'dan ticari nötral ve alkalin proteazlara her biri ayrı olarak dayanıklı lipaz üretmiştir. Ayrıca, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus pumilus* tarafından üretilen lipazların eş-üretilen doğal proteazlara karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir [Ruchi ve ark., 2008b; Sangeetha ve ark., 2010a, b].

2.1.4. Lipazların yapısı ve arayüzey aktivasyonu

Yapılan x-ışını yapı araştırmaları, tüm lipazların α -sarmal ve β -yaprakların spesifik dizininden oluşan ortak bir yapıya sahip olduklarını göstermiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi (Silindirler α -sarmalları, oklar β -yaprakları simgelemektedir. Aktif bölge kalıntıları ise (Ser, Asp/Glu, His) siyah yuvarlaklar halinde gösterilmiştir) [Salgın ve ark., 2007].

Lipaz ve esterazlardan başka benzer bir sekonder ve tersiyer yapıya sahip proteazlar, peroksidazlar, kolinesterazlar, epoksit hidrolazlar gibi diğer bazı enzimlere de α/β katlanmış hidrolazlar denilmektedir. α/β -hidrolaz enzim ailesi ilk defa Ollis (1992) tarafından ortaya konmuştur. Bu grupta yer alan tüm enzimler, 8 farklı β -yaprağı içeren merkezi β zincir yapısıyla bu yapılarla bağlantılı 5-8 α -sarmal yapı bulunduran $\alpha/\beta/\alpha$ sandviç modeli oluştururlar.

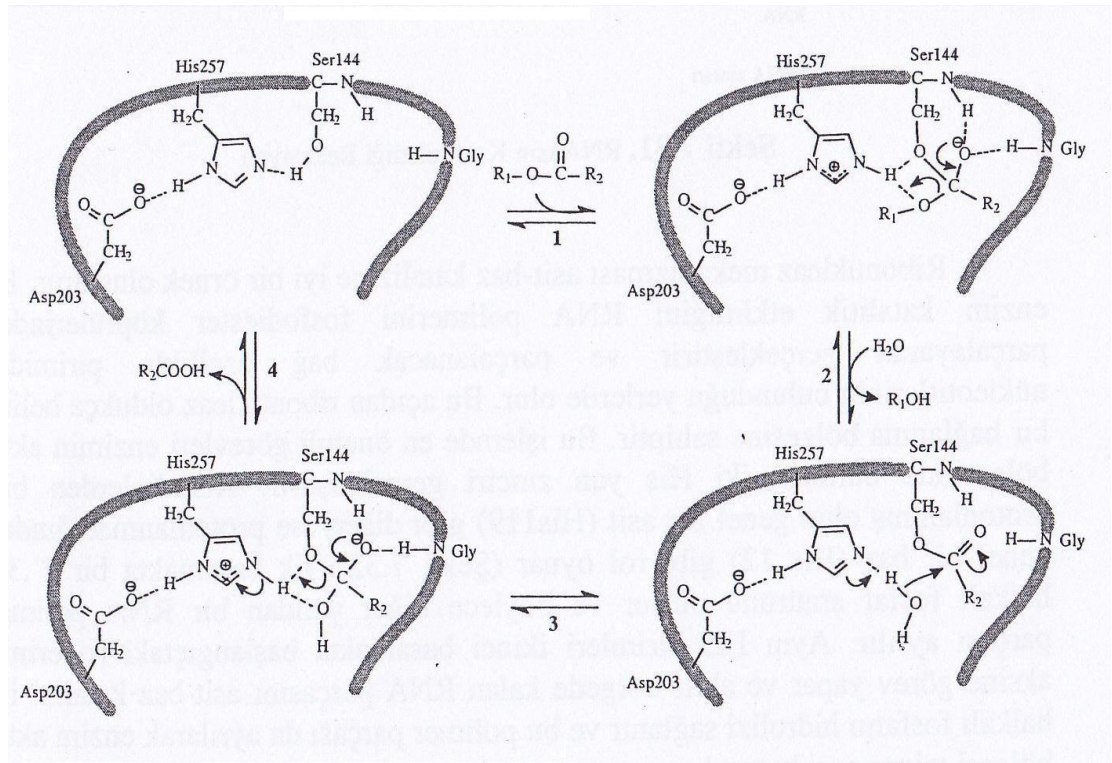
1990 yılında ilk kez insan pankreatik lipazı (HPL) ve *Rhizomucor miehei* lipazlarının yapıları, X-ışını kırınım yöntemi ile ortaya çıkarılmıştır. Bu lipazlarda, bir kapağın aktif bölgeyi kapladığı görülmüştür. Daha sonraki araştırmalar sonucunda, lipaz ve substrat analogları arasındaki ortak kristallerin X-ışını yapılarından aktif bölgede bulunan katalitik üçlünün (Ser-His-Asp/Glu) hidrofobik aminoasitlerce (Phe, Trp, Leu, Tyr gibi) zengin, 1 veya 2 α -sarmal yapıda polipeptit zincirinden ibaret bir kapakla kuşatıldığı anlaşılmıştır. Bu hidrofobik birimlerin çoğu lipazların lipid-su arayüzeyine tutunabilmesi için görev görürler ve böylece lipid yüzeyinin hidrofobik

kısmına enzimin nüfuz etmesini sağlarlar. 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 yarıklık oluşur. Bu yarıklık açıl gruplarının ulaşabilmesi için uzanmış bir cep şeklindedir. Birçok lipazda kapağın hareketiyle ayrıca bir oksianyon boşluğu oluşmaktadır. Bu boşluk substrata yapılan nükleofilik saldırı sırasında oluşan negatif yükleri kararlı kılan elektrofilik bir çevre sağlamaktadır [Jaeger ve Reetz, 1998].

2.1.5. Lipazların etki mekanizması

Hidrolitik enzimler etki mekanizmalarına göre serin hidrolazlar, sistein hidrolazlar, metaloproteazlar ve aspartil proteazlar olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Lipazlar serin hidrolazlar grubunda yer almaktadır. Serin hidrolazlar, enzimin aktif bölgesinde serin, histidin ve aspartik asit/glutamik asitten oluşan katalitik bir üçlü taşırlar.

İlk basamakta aktif bölgedeki serin biriminin substratın karbonil karbonuna nükleofilik saldırısıyla tetrahedral bir ara ürün oluşur. Bu ara ürün histidin ve aspartik asit aminoasitleri tarafından kararlı kılınır. İkinci adımda alkol salınır ve açıl-enzim kompleksi oluşur. Yine bir nükleofilin saldırısı ile (hidroliz reaksiyonlarında su molekülü iken, esterifikasyon/transesterifikasyon reaksiyonlarında bir alkol, asit, ester ya da amin grubu) açıl-enzim kompleksi hidrolizlenerek ikinci bir tetrahedral ara ürün oluşur. Son olarak bir asit ya da esterinin ayrılması ile enzim yeniden elde edilir (Şekil 2.3). Her iki tetrahedral ara ürün bir oksianyon boşluğuna sahiptir. Oksianyon boşlukları, içerisindeki protein atomlarının hidrojen bağı kapasitesi ile kararlı kılınmaktadır [Faiz, 2005].



Şekil 2.3. Bir lipaz reaksiyonunun basitleştirilmiş katalitik mekanizması [Güner, 2007].

2.1.6. Biyoetkileşme

Biyoetkileşme (bioimprinting), lipazların katalitik performansını arttıran uygun bir yöntemdir. Bu yöntem, lipazların susuz ortamlarda, özellikle de organik çözücüler ve çözücüsüz sistemlerdeki aktivite ve stabilitesini arttırmak için geliştirilmiştir. Biyoetkileşmenin tekniği; liyofilizasyon ve bir susuz çözücü kullanılarak bir ligandla sağlanan non-kovalent etkileşimlerle lipazın üç boyutlu yapısında tersinir değişikliklerin başlamasına dayanmaktadır. Lipazın iki konformasyonel konumu vardır: kapalı, inaktif form ve aktif, açık form. Kapalı formda katalitik bölge sarmal bir kapak ile kapalıyken, açık formda aktif bölge, substratlara veya indükleyici ajanlara cevap vererek yer değiştiren bir kapak ile ortaya çıkmaktadır [Mingarro ve ark., 1995]. Kapak hareketi aynı zamanda katalitik mekanizmayı bir oksianyon boşluğu haline getirmektedir [Yılmaz, 2003b]. Lipazın uyarılmış konformasyonu böylece onun kapak yapısının açılmasını ve katalitik mekanizmasının biçimlenmesini içermektedir. Biyoetkileşmede konformasyonel değişim; amfifiller, substratlar veya

substrat analogları olan ‘etkileşme’ molekülleri ile başlatılmaktadır. Hızlı liyofilizasyon lipazın açık ve aktif konformasyonunda yakalanması için yardım ederken, susuz çözücülerle muamele ‘etkileşme’ moleküllerini uzaklaştırmaktadır. Yaygın olarak kullanılan ‘etkileşme’ molekülleri, Tween 20, zeytinyağı [Yılmaz, 2002], yağ asitleri [Yan ve ark., 2010] ve tersinir bir lipaz inhibitörü olan orlistattır [Yılmaz, 2003b]. Sol-gel (ince asıltılı perde) kaplaması, biyoetkileşmenin öncülü olan ‘etkileşme’ moleküllerini ve silanı kullanan basit bir proses olarak bildirilmiştir [Cao ve ark., 2009].

2.1.7. İmmobilize ve nano lipazlar

Enzimlerin endüstriyel katalizör olarak kullanımı, ekonomik değeri olan tüm proseslere faydalı olmak için hizmet vermektedir. Aynı zamanda proseslerin maliyeti de biyokatalizörlerin üretimini gerekli kılmaktadır. Bundan dolayı, katalizörlerin geri kazanımı tekrarlanan kullanım için gerekli olmaktadır. Serbest enzimler, kullanılan enzimlerin geri kazanımı proseslerinde bozulmaya karşı değişken ve eğilimlidir. Bu dezavantajlar immobilize enzimlerin kullanımıyla ortadan kaldırılabilmektedir. İmmobilizasyon enzimlerin reaksiyon şartlarında kararlılığını arttırmakta, aktivitesini yükseltmekte ve böylece enzimlerin tekrar tekrar kullanımını mümkün kılmaktadır. Aynı zamanda, enzimlerin farklı uygulamalar için kullanımını sağlamak ve dolayısıyla üretim maliyetini de düşürmektedir [Guncheva ve ark., 2009; Liu ve ark., 2009]. İmmobilizasyon enzimin işlevini yerine getirmesi için daha iyi bir çevre ve aynı zamanda daha iyi bir ürün sağlamaktadır [Lee ve ark., 2009].

Lipaz farklı türdeki hidrofobik veya hidrofilik desteklerle immobilize olabilmektedir [Minovska ve ark., 2005]. Çeşitli destek materyalleri iyon-değiştirme reçineleri (Amberlite IRC-50), inorganik materyaller (kum, silika), sodyum aljinat gibi biyopolimerler [Cheirsilp ve ark., 2009], polipropilen, polietilen, polimetakrilat gibi sentetik polimerler [Salis ve ark., 2009], celite [Liu ve ark., 2009], seramik [Al-Zuhair ve ark., 2009], polipropilenimin-agaroz gibi kompleksler immobilize lipaz için kullanılmıştır. TMOS (tetrametil ortosilikat) ile propiltrimetoksisilan (PTMS) ve *n*-bütiltrimetoksisilan gibi alkiltrimetoksisilanların karışımından türetilen hidrofobik

silikatların lipazlar için en iyi destek olduğu belirlenmiştir [Furukawa ve ark., 2002]. İmmobilize lipaz için yüzey alanı büyük orta gözenekli silika materyaller ve düzgün gözenekli yapılar kullanılmış; immobilize enzim serbest enzime göre daha etkili ve kararlı bulunmuştur [Kato ve Seelan, 2010].

Orta gözenekli materyaller suda çözünmeyen mükemmel bir immobilizasyon desteği, geniş yüzey alanı, mekanik güç, kimyasal kararlılık, ısı toleransı ve toksik olmama gibi tüm kriterleri sağlamaktadır [Hartmann, 2005; Jaladi ve ark., 2009]. Ramani ve arkadaşları (2010), immobilize lipaz için taşıyıcı olarak (pirinç) çeltikten türetilen orta gözenekli aktif karbonun kullanımını bildirmiştir. Protein-Kaplı Mikro Kristaller (PCMC) son yıllarda enzim immobilizasyonu için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. PCMC, enzim ile bir yardımcı maddenin (eksipiyan) karışımından oluşmaktadır. Karışım suda çözünmeyen bir çözücüye eklendiğinde çökelekler oluşur ve yardımcı maddenin mikrokristallerinin üzerine (yüzey alanına) enzim immobilize edilmiş olmaktadır. Ruchi ve arkadaşları (2008a) *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde ettikleri lipazın etkili ve kararlı PCMC'sini hazırlamıştır. Devi ve arkadaşları ise (2009) çapraz bağlayıcılar ve presipitanlar kullanarak çapraz-bağlı enzim kümeleri şeklinde lipazları immobilize etmiştir. Bu enzim kümeleri önceden kullanılan taşıyıcılara ihtiyaç duymaz ve hem sulu hem de susuz şartlarda etkili katalizör görevini gerçekleştirir.

Manyetik nano tanecikler gözenekli desteklerle karşılaştırıldığında önemli avantajlara sahiptir; destek partiküllerinin nano büyüklüğü geniş bir yüzey alanı sağlamakta ve böylece maksimum enzim yüklenmesi, enzimin desteğe düşük difüzyonu ve immobilize enzimin manyetik alanda kontrol edilebilmesi ve geri kazanılması sağlanmaktadır [Hu ve ark., 2009]. Lee ve arkadaşları (2009) immobilize lipaz için nano-boyutlu manyetik partiküllerin kullanımını önermiştir. Lipazın nano partiküllerin yüzeyine adsorplanması için düşük molekül kütleli ligandlar kullanılmıştır. Karbon nano tüpleri, enzimler için immobilizasyon desteği olarak kullanımlarına göre biyosensörler ve nano-biyokatalizörler gibi geniş uygulama alanı bulmuştur; lipazın immobilizasyonu için mükemmel taşıyıcılar olduğu kanıtlanmıştır [Lee ve ark., 2010]. Elektrospun nanoliflerin üstün

immobilizasyon destekleri olduğu ispatlanmıştır ve lipaz elektrospun nanoliflerin üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir [Sakai ve ark., 2010].

2.1.8. Lipazların kullanım alanları

Bakteriyel lipazların keşfedilmesine kadar, ticari uygulamalarda mantarların lipazların eldesinde en uygun aday oldukları düşünülüyordu. Pek çok mikrobiyel lipaz, Novozyme (Danimarka), Amano Enzim Şirketi (Japonya), Biocatalysts (Ukrayna), Unilever (Hollanda) ve Genencor (ABD) gibi dünyadaki popüler enzim üreticileri tarafından ticarete dökülmektedir. Endüstride *Burkholderia* sp. ve *Pseudomonas* sp. türlerinden üretilen bakteriyel lipazlar mevcuttur. *Burkholderia cepacia*'dan izole edilen 'Lipaz PS' ve *Pseudomonas fluorescens*'den izole edilen 'Lipaz AK' Amano Enzim Şirketi'nden; *Burkholderia cepacia* ve *Pseudomonas stutzeri*'den izole edilen 'Lipaz SL' ve 'Lipaz TL' ise Meito Sangyo Şirketi'nden (Japonya) temin edilmektedir.

Lipazlar çeşitli uygulamaları olan önemli biyokatalizörlerdir. Lipazlar endüstriyel enzim pazarının sadece % 5'ini paylaşırsa da biyoteknolojide önemli enzimler olarak ilgi kazanmaktadır. Gıda, deterjan ve ilaç endüstrilerinde lipazlar yaşamsal roller oynamaktadır [Sangeetha ve ark., 2011].

I.Deterjan endüstrisinde lipaz

Yağları hidrolizleme yeteneklerinden dolayı lipazlar, endüstriyel çamaşırhane ve ev deterjanlarında katkı maddeleri olarak önemli bir kullanıma sahiptir. Deterjanlarda lipazlar özellikle aşağıdaki şartları sağladıkları için seçilmektedir: (1) düşük bir substrat spesifitesi yani yağları çeşitli bileşimlerinden hidroliz edebilme yetenekleri; (2) oldukça ağır yıkama şartlarına dayanabilmeleri (pH 10-11, 30–60 °C); (3) çoğu deterjan formülasyonunda önemli bileşenler olan bozucu yüzey aktif maddelerine ve enzimlere [örneğin, lineer alkil benzen sülfonatlar (LAS) ve proteazlar] dayanabilme yetenekleri. İstenilen özellikteki lipazlar sürekli bir inceleme [Yeoh ve ark., 1986; Wang ve ark., 1995; Cardenas ve ark., 2001] ve protein mühendisliğinin [Kazlauskas

ve Bornscheuer, 1998; Fischer ve Pleiss, 2003] bir kombinasyonu sayesinde elde edilmektedir.

1994 yılında, Novo Nordisk (Danimarka) ilk ticari rekombinant lipaz olan “Lipolaz”ı, *Thermomyces lanuginosus* mantarından izole ederek *Aspergillus oryzae* lipazı ile birleştirmiştir. 1995 yılında ise, Uluslararası Genencor şirketi tarafından iki bakteriyel lipaz—*Pseudomonas mendocina*’dan ‘Lumafast’ ve *Pseudomonas alcaligenes*’den ‘Lipomax’—üretimiştir [Jaeger ve Reetz, 1998]. Gerritse ve ark. (1998), *Pseudomonas alcaligenes* M-1 tarafından üretilen alkale lipazın modern bir yıkama makinesinin şartları altında yağlı lekeleri çıkarmada uygun olduğunu bildirmiştir. Patent literatürü birçok mikrobiyal lipazın deterjanlarda kullanıma uygun olduğunu söyleyen örnekler içermektedir [Sharma ve ark., 2001].

II. Gıda endüstrisinde lipaz

Katı ve sıvı yağlar gıdaların önemli bileşenleridir. Bir trigliseridin besinsel ve duyuşal değeri ile fiziksel özellikleri; yağ asidinin gliserol omurgasındaki pozisyonu, yağ asidinin zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi gibi faktörlerden oldukça etkilenmektedir. Lipazlar, gliseriddeki yağ asidi zincirlerinin konumunu değıştirerek ve bir veya daha fazla yağ asidinin yeni yağ asitleriyle yer değıştirmesini sağlayarak lipidlerin özelliklerinin değıştirilmesine izin vermektedir. Bu şekilde, daha ucuz ve daha az istenen bir lipid daha yüksek değerde bir yağa dönüştürülebilmektedir [Colman ve Macrae, 1980; Pabai ve ark., 1995a, b; Undurraga ve ark., 2001].

Kakao yağı, değeri yüksek bir yağ, palmitik ve stearik asitleri içerir; erime noktası yaklaşık 37 °C’dir. Kakao yağının ağızda erimesi çikolata gibi ürünlerde istenen bir özelliktir. Hidroliz ve sentez reaksiyonlarını içeren lipaza-dayalı teknoloji, daha az istenen bazı yağları kakao yağına geliştirmek için kullanılmaktadır [Colman ve Macrae, 1980; Undurraga ve ark., 2001]. Bu prosesin bir versiyonu, palmiye yağındaki palmitik asidin stearik asit ile yer değıştirmesini sağlayan transesterifikasyon reaksiyonunda immobilize *Rhizomucor miehei* lipazını kullanılmaktadır. Benzer şekilde, Pabai ve ark. (1995a) tereyağının lipaz-katalizli bir

interesterifikasyonunu tanımlamıştır. Buna göre, uzun zincirli doymuş yağ asitlerinde önemli bir azalma ve buna karşılık seçilen triaçilgliserolün ikinci pozisyonundaki C18:0 ve C18:1 asitlerinde bir artış görülmüştür.

Metabolik etkilerinden dolayı, PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri)'ların ilaç, nötrasötikal (hastalıkları önleyici ve tedavi edici özelliği olan gıda) ve gıda katkı maddesi olarak kullanımı giderek artmaktadır. PUFA'ların çoğu, lipid membranları ve prostaglandinlerin normal sentezi için elzemdir. Mikrobiyal lipazlar, ringa balığı yağı, ton balığı yağı ve hodan (bitki) yağı gibi hayvan ve bitki lipidlerinden PUFA'ları elde etmek için kullanılmaktadır. Serbest PUFA'lar ve onların mono- ve digliseridleri daha sonra antikolesterol, antiinflamatuvar ve trombolitikleri içeren ilaçların bir türünü üretmek için kullanılmıştır [Sharma ve ark., 2001]. Bunlara ilave olarak; lipazlar peynirin tatlandırılmasında, pastane ürünleri ve meşrubatlardaki aromaların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda, lipazlar et ve balık ürünlerinden yağların uzaklaştırılmasına katkı sağlarlar [Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998].

III. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde lipaz

'Katran' veya odunun hidrofobik bileşenleri (başlıca trigliseridler ve balmumu) kağıt hamuru ve kağıt üretiminde pek çok probleme sebep olmaktadır [Jaeger ve Reetz, 1998]. Lipazlar kağıt yapımı için üretilen kağıt hamurundan katranın çıkarılması için kullanılmaktadır. Nippon Kağıt Endüstrisi, Japonya, *Candida rugosa* lipazını kullanarak odun trigliseridlerinin % 90'ından fazlasını hidroliz eden bir katran kontrol metodu geliştirmiştir [Sharma ve ark., 2001].

IV. Organik sentezlerde lipaz

Lipazların organik kimyasal sentezlerde kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Lipazlar kemo-, bölge- ve stereoseçici transformasyonların geniş bir türünü katalizlemek için kullanılırlar [Rubin ve Dennis, 1997; Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998; Berglund ve Hutt, 2000]. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan

lipazların büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır. Bu enzimler, hidrofilik – lipofilik arayüzeyde çalışırlar ve reaksiyon karışımlarındaki organik çözücülere dayanıklıdır. Enantiyosaf bileşiklerin sentezinde lipazların kullanımı Berglund ve Hutt (2000) tarafından ele alınmıştır.

Enzimler suda çözünmeyen trigliseridlerin hidrolizlerini su-sıvı arayüzeyinde katalizlerler. Verilen şartlar altında, reaksiyon karışımındaki su miktarı lipaz-katalizli reaksiyonun yönünü belirleyecektir. Ortamda çok az su varsa veya hiç su yoksa, sadece esterifikasyon ve transesterifikasyon tercih edilmektedir. Ortamda fazla oranda su olduğunda ise, tercih edilen reaksiyon hidroliz olmaktadır [Klibanov, 1997]. Süperkritik çözücülerde de lipaz-katalizli reaksiyonlar bildirilmektedir [Sharma ve ark., 2001; Salgın ve ark., 2007].

V. Sulu ortamdaki biyodönüşümlerde lipaz

Esterlerin hidrolizi genellikle iki-fazlı sulu ortamda lipaz kullanılarak gerçekleştirilmektedir [Vaysse ve ark., 1997; Chatterjee ve ark., 2001]. Penreac'h ve Baratti (1996), *Pseudomonas cepacia*'dan elde ettikleri lipaz ile *p*-nitrofenil palmitatın *n*-heptan içindeki hidrolizini bildirmiştir. Jaeger ve Reetz (1998) ise, transformasyonun bir çeşidi için hidrofobik bir sol-jel matriksi içine hapsedilmiş lipaz kullanmıştır.

Mutajenez, lipazların enantioseçiciliklerini geliştirmek için geniş ölçüde kullanılmaktadır [Bornscheuer, 2000; Gaskin ve ark., 2001]. Örneğin, bir olguda, dört mutajenez aşamasında kiral bir esterlin lipaz-katalizli (*P. aeruginosa* lipaz) hidrolizinin enantioseçiciliği % 2'den % 81'e arttırılmıştır. *C. parapsilosis*'den elde edilen lipaz-açıl transferaz, bifazik sıvı/sulu bir ortamda hidroksamik asit biyosentezini katalizlemiştir. Reaksiyonun substratları açıl dönörleri (yağ asidi veya yağ asidi metil esteri) ve bir hidroksilamindir. Açıl grubunun dönör bir esterden hidroksilamine transferi (aminoliz), serbest yağ asitlerinin reaksiyonuna nazaran tercihen katalizlenmiştir. Bu özellik, *C. parapsilosis* enzimini sulu ortamdaki yağların direkt biyodönüşümü için katalizör olarak seçilmesini sağlar [Vaysse ve

ark., 1997]. Yeo ve ark. (1998), *Burkholderia* sp. türü tarafından üretilen yeni bir lipaz bildirmiştir ve bu lipaz hacimli bir ester olan *t*-bütil oktanoatı (TBO) hidrolizleyebilmiştir. Ayrıca, bu lipazın TBO-hidrolizleme aktivitesinin ticari lipazlara göre 100 kat daha üstün olduğu tespit edilmiştir [Sharma ve ark., 2001].

VI. Organik ortamdaki biyodönüşümlerde lipaz

Serbest bir sulu faz içermeyen organik ortamdaki enzimlerin olağanüstü yararlı özellikler gösterdiği bilinmektedir, bu yüzden susuz enzim sistemleri sentez ve biyotransformasyon reaksiyonlarında iyice yerleşmektedir. Lipazlar çeşitli susuz biyotransformasyonlar için geniş çapta araştırılmaktadır [Sharma ve ark., 2001].

VII. Rasemik asitlerin ve alkollerin ayrılmasında lipaz

Lipazların stereoseçiciliği, birbiriyle karışmayan bifazik sistemlerdeki çeşitli rasemik organik asit karışımlarını ayırmak için kullanılmaktadır [Klibanov, 1990]. Rasemik alkoller aynı zamanda lipaz-katalizli transesterifikasyon reaksiyonuyla enantiyomerik olarak saf formlarına ayrılabilirler. Arroyo ve Sinisterra (1995), *C. antarctica*'dan elde ettikleri lipaz-B'yi susuz ortamda esterifikasyon reaksiyonunda kullanarak izobütil metil keton ve (+*S*)-karvon gibi bir akiral çözücüde ketoprofenin *R*-izomerine karşı stereoseçici olduğunu bildirmiştir.

Bir çalışmada, *C. rugosa*'dan elde edilen lipazın ham örneği ile saflaştırılmış örneği, susuz ve kısmen sulu hidrofobik organik çözücülerde karşılaştırılmıştır. Kuru (susuz) *n*-heptan ile yapılan deneylerde; saflaştırılmış lipazın aktivitesi ham numunedeki lipaz aktivitesinden daha az çıkmıştır. Ancak, az miktardaki su varlığında saf enzimin aktivitesi önemli ölçüde artarken; ham enzimin *n*-bütanollü ortamda rasemik 2-(4-klorofenoksi) propanoik asidin esterifikasyonunda aktivite düşmüştür [Tsai ve Dordick, 1996].

Profenler (2-aril propinoik asitleri), önemli bir grup nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar, farmakolojik olarak başlıca (*S*)-enantiyomer formları aktiftir [Hutt ve

Caldwell, 1984]. Örneğin, (S)-ibuprofen [(S)-2-(4-izobütilfenil) propinoik asit] prostaglandin sentezinin inhibisyonunda ayna görüntüsü olan enantiyomerine göre 160 kat daha aktiftir. Sonuç olarak, asimetric kimyasal sentez, katalitik kinetik ayrılma [Van Dyck ve ark., 2001; Xin ve ark., 2001], kristallendirme ile rasemik karışımların ayrılması ve kiral kromatografik ayırma işlemlerinden optikçe saf profenler elde etmek için önemli çalışmalar yapılmaktadır. Mikroorganizmalar ve enzimlerin özellikle rasemik karışımların ayrılmasında yararlı oldukları ispatlanmıştır. Bu şekilde, saf (S)-ibuprofen hidroliz [Lee ve ark., 1995] veya esterifikasyon [Ducret ve ark., 1998; Xie ve ark., 1998] reaksiyonunda lipaz kullanılarak kinetik ayrılmayla elde edilmektedir. Benzer şekilde, 2-fenoksi-1-propanol enantiyoseçici transesterifikasyon reaksiyonunda *Pseudomonas* sp. türlerinden elde edilen lipaz kullanılarak enantiyomerlerine ayrılmıştır [Miyazawa ve ark., 1998]. Weber ve ark. (1999), *Candida antarctica* ve *Rhizomucor miehei*'den ürettikleri lipaz ile yağ asitlerinin uzun zincirli tiyollerle (çözücüsüz) tiyoesterifikasyon işlemini bildirmiştir. Aynı zamanda, yağ asidi metil esterlerinin alkan tiyollerle çözücüsüz trans-tiyoesterifikasyonu bildirilmiştir [Weber ve ark., 1999].

VIII. Bölgeşecici açilasyonlarda lipaz

Lipazlar belli steroidleri, şekerleri ve şeker türevlerini yüksek bölgesel seçicilik özellikleriyle açillemektedir. Bir kez açillenmiş şekerler trietil karboksilatlar ve çeşitli monosakkaritlerden susuz piridinli ortamda üretilmektedir [Therisod ve Klivanov, 1987]. Buna karşın, Chen ve ark. (1995) *Aspergillus niger*'den elde ettikleri lipazla açillenmiş metil β -D-glukopiranositin bölgeşecici deaçilasyonunu katalizlemişlerdir. Benzer şekilde, Kodera ve ark. (1998) polietilen glikol ile modifiye edilmiş lipaz kullanarak 1,1,1-trikloroetanda açillenmiş monosakkarit türevlerinin bölgeşecici deaçilasyonunu bildirmiştir.

IX. Tekstil endüstrisinde lipaz

Kot (kumaşı) kültürü bütün dünyayı sarmıştır ve Hindistan kot modasında cazip yeniliklere tanık olmaktadır. Giyim imalatı, hazır kumaşa has ve parlak bir bakışla umut vermektedir. Haşıl sökme prosesi, dokumacılıkta kumaş öncü maddesiyle ıslatılan haşıl malzemesinin (dokumacılıkta kullanılan unlu veya çirişli sıvı) giderilmesini içermektedir. Geleneksel haşıl sökme prosesi, kumaştaki selüloz maddesine zarar veren asitleri veya oksitleyici ajanları kullanmaktadır. Enzimatik haşıl sökme, klasik haşıl sökme prosesine göre çeşitli avantajlara sahip olup haşıl malzemesine bağlı olarak lipaz, proteaz, amilaz ve selülaz gibi enzimleri kullanmaktadır (www.expresstextile.com). Bakteriyel lipazlar, haşıl malzemesi poliester gibi sentetik bir malzemeyse kullanılabilir (www.wipo.int). Lund (2001) kot kumaşının yıkanması ve haşılının sökülmesinin yer aldığı kombine bir proses geliştirerek patentini almıştır. *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi* ve *Pseudomonas stutzeri*'den elde edilen lipolitik enzimler değerlendirilmiş ve *Pseudomonas cepacia*'dan elde edilen lipaz tercih edilmiştir.

Polietilen terftalat (PET) dokumaları, sağlam ve buruşmaya dayanıklı olmalarıyla bilinmektedir. Hidrofobik karakterlerinden dolayı boyanabilirliklerinin olmayışı istenmeyen özelliğidir. Islaklık toplama özelliğinin arttırılmasına yönelik yapılacak bir girişim PET dokumalarını daha popüler yapacaktır. Kim ve Song (2006), *Pseudomonas cepacia* ve *Pseudomonas fluorescens*'den elde ettikleri lipaz enzimlerini kullanarak PET dokumalarının ıslaklık toplama özelliğini geliştirdikleri çevre dostu bir yöntem bulmuşlardır [Sangeetha ve ark., 2011].

X. Biyosensörlerde lipaz

Doğada lipidlerin ve lipid-bağlayıcı proteinlerin kalitatif ve kantitatif ölçümleri, kimyasal veya biyokimyasal olabilen biyosensörler yardımıyla mümkündür. Bakteriyel (immobilize) lipazlar biyosensör olarak kullanılmaktadır. Bu tür biyosensörler, klinik örnekler ve gıdalardaki trigliseridleri belirlemek için, pestisit

kontaminasyonu gibi kirlilik analizlerinde ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır [Pandey ve ark., 1999]. Huang ve ark. (2001), cam-elektrotlu lipaz bağlı bir biyosensör üretmek için lipazı mikro-emülsiyon yapıları bir jele immobilize etmiştir. Setzu ve ark. (2007), orta gözenekli bir silika matrisin üzerine immobilize ettikleri lipazı kullanarak potansiyometrik bir biyosensör üretmiştir.

XI. Farmasötik uygulamalarda lipaz

Miyazaki ve Fujikawa (2009), proteaz, lipaz ve bir metalik tuz içeren bir bileşim kullanarak deri, kafatası hastalıkları ve saç kaybı gibi durumları tedavi etmek için bazı yöntemler geliştirmiş ve patentlerini almışlardır. Lipaz, mantar veya bir bakteriyel kaynaktan, tercihen *Pseudomonas* sp. türlerinden elde edilmiştir. Sani (2006), bakteriyel lipazların safra kesesi fibröz ve pankreas iltihaplanmalarını tedavi etmek için kullanılan pankreatik lipazların yerini almasını amaçlamıştır. Pankreatik lipazlar, lipidlerin sindirim kanalındaki absorpsiyon düzensizliklerini tedavi etmek için kullanılmaktadır ancak düşük pH'da ve proteaz varlığında etkinliğini kaybettiği için uygulaması sınırlıdır. Birçok bakteriyel lipaz bu yüzden pankreatik lipaza göre umut verici seçenekler sunmaktadır.

Fenolik bileşikler, dengeleyici yağlarda aktivitelerini kaybeden doğal antioksidanlardır. Bu dezavantajları hidrofilik yapılarından kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin yağlı bir ortamda faaliyet göstermesi için çözünmesi gereklidir bu yüzden lipofilik fenollerin üretimi olası fenollerin antioksidan özelliklerinin tamamen kullanımını mümkün kılacaktır [Choo ve Birch, 2009]. *Pseudomonas* sp. türünden elde edilen lipazın kullanımıyla sinamoil esterlerinin biyokatalitik sentezleri bildirilmiştir [Buisman ve ark., 1998] ve sinamoil esterleri sinamik asite göre daha yüksek serbest radikal temizleme aktivitesine sahiptir.

Acinetobacter sp. türünden elde edilen enantiyoseçici bir lipaz cis-(±)-2-(bromometil)-2-(2,4-diklorofenil)-1,3-dioksolan-4-metil asetat bileşiğini hidroliz etmiştir. Bu bileşik antifungal bir ilaç olan 'itrakonazol'un sentezinde rasemik bir ara üründür [Han ve ark., 2003]. 'Diltiazem' kalsiyum kanalı blokörü olup kalp spazmı,

yüksek tansiyon ve diğer damarsal düzensizliklerin tedavisinde kullanılmaktadır. Diltiazem hidrokloridin sentezi optik olarak saf bir trans-metoksifenil glisidik asit metil ester (MPGM) bileşimini gerektirir [Zhao ve ark., 2008]. *Serratia marescens* türünden elde edilen lipazın, (\pm) MPGM'nin biyorezolüsyonunu katalizlemede etkili olduğu tespit edilmiştir [Hu ve ark., 2009]. Anti-inflamatuar bir ilaç olan rasemik ketoprofenin biyorezolüsyonu da *Serratia marescens* bakterisinden elde edilen lipaz enzimiyle gerçekleştirilmiştir [Long ve ark., 2007]. Chen ve arkadaşlarının (2007) *B. cereus* C71'den saflaştırdıkları lipaz enzimi ise, etil 2-arilpropanoatın R-izomerine karşı daha yüksek enantiyoseçicilik göstermiş; böylelikle alzheimer ve kanser hastalıklarının tedavisi için yeni bir ilaç olan 'R-flurbiprofen'in hazırlanışında enzimatik bir yol sağlanmıştır.

Ağrı kesici, ateş düşürücü ve anti-inflamatuar olarak kullanılan 1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-asetik asit'in sentezinin öncü maddeleri hidrosinamet esterleridir. Bu esterler aynı zamanda HIV-proteaz'ın inhibitörleri olarak rol oynamaktadır. Priya ve Chadha (2003), *P. cepacia* bakterisinden elde ettikleri lipaz enzimini kullanarak bu esterleri sentezlemiştir.

XII. Kozmetikler ve kişisel bakım ürünlerinde lipaz

Kozmetik ve parfüm endüstrisinde; kokuların transesterifikasyon ile üretimi ve rasemik ara ürünlerin ayrıştırılmasında lipazlardan faydalanılmaktadır. *Pseudomonas cepacia* tarafından üretilen lipaz, sitronelolün bromometoksilasyonu sonucu elde edilen rasemik gül oksitlerinin ayrıştırılmasında kullanılmaktadır [Taneja ve ark., 2005].

Alifatik ve aromatik asitlerin esterleri, terpen içeren alkoller, aldehytler ve fenoller ortak olarak parfüm ve diğer kişisel bakım ürünlerinde kullanılan koku materyallerinde bulunmaktadır [Franssen ve ark., 2005]. Priya ve Chadha (2003), *Pseudomonas cepacia*'dan elde ettikleri lipazla hidrosinamik asit esterlerinin sentezini gerçekleştirmiştir. Hidrosinamik asit esterleri, parfüm ve güneş kremlerinde kullanılmaktadır. Gargara sıvıları ve tıraş kremleri, nane kokusu ve bir serinleme

hissi vermek için mentol içerirler. Doğal mentolün yetersiz olduğu durumlarda esterifikasyon işlemiyle mentol yapay olarak üretilebilmektedir. Chaplin ve ark. (2006), *Pseudomonas cepacia* ve *Pseudomonas fluorescens*'den elde ettikleri lipazdan yararlanarak mentol esterleri ve benzer bileşikler ürettikleri bir prosesin patentini almışlardır.

XIII. Biyodizel üretiminde lipaz

Biyodizel; biyolojik olarak parçalanabilen, yenilenebilen, yanmaz ve non-toksik (petrol-esaslı dizel için alternatif) bir yakıttır. Biyodizel uzun zincirli yağ asitlerinin monoalkil esterleri genellikle de yağ asidinin bir metil esteri olarak tanımlanmakta ve ortak olarak FAME (yağ asidi metil esteri) adıyla ifade edilmektedir. Biyodizel dizel motorları ve ısıtma sistemleri için kullanılmakta olup yükselen petrol fiyatlarına bağlı olarak biyodizele olan rağbet de artmaktadır. Biyodizel soya fasülyesi yağı, pirinç kepeği yağı, ayçiçek yağı, hurma yağı gibi sebze yağlarından, pamuk yağı, jatrofa (tropikal bir bitki) yağı, hayvan yağı, su yosunları, atık sıvıyağlar ve endüstriyel asit yağlarından üretilmektedir.

Biyodizel kemokatalitik, termokatalitik ve biyokatalitik yaklaşımlarla sentezlenmektedir. Biyokatalitik yaklaşımlar lipazları biyokatalizör olarak kullanmaktadır. Bir ester ve gliserol elde etmek için; bir lipid ve kısa zincirli bir alkol arasında lipaz tarafından katalizlenen bir transesterifikasyon reaksiyonu meydana gelmektedir [Chen ve ark., 2009; Dizge ve ark., 2009; Raita ve ark., 2010]. Biyodizel sentezi için en yaygın kullanılan bakteriyel lipaz *Pseudomonas cepacia*'dan elde edilmektedir [Li va Yan, 2008]. Biyodizel üretimi mikro-sulu bir çevreyi gerektirir çünkü suyun varlığı transesterifikasyonu değil yağların hidrolizini kolaylaştırır. Bu yüzden, immobilize lipazlar mikro-sulu bir çözücüsüz sistemde kullanılmaktadır [Xu ve ark., 2009]. Wang ve Zhang (2009) biyodizel üretiminde metanolizi geliştirmek için uygun (çözünen) maddelerle çalışmıştır. Metanol lipazı inhibe eder ve aynı zamanda denature olmasını sağlar dolayısıyla biyodizel üretimini azaltmaktadır. Ektoin (çözünen bir madde) lipazın metanole olan ilgisini azaltırken trigliseride olan ilgisini artırır ve bu strateji biyodizel verimini yükseltir.

Gliserol, biyodizel üretiminde ara ürün, polimetilen tereftalat gibi yeni polimerlerin sentezinde bir monomer olan 1,3-propandiole dönüştürülmektedir. *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Clostridium* sp., *Enterobacter* sp. ve *Lactobacillus* sp. gibi bakteri türleri gliserolü 1,3-propandiole dönüştürebilmektedir [Xu ve ark., 2009].

XIV. Kimyasal tarım maddeleri endüstrisinde lipaz

Lipazlar pestisitler, insektisitler ve kimyasal tarım ürünlerinde yararlı diğer bileşiklerin üretimindeki ara ürünlerin sentezinde kullanılmaktadır. *Pseudomonas* sp. türlerinden elde edilen lipazlar, insektisit ve fungusitlerin [Pandey ve ark., 1999] ve (R, S)-HMPC [(R, S)-4-hidroksi-3-metil-2-(2'-propenil)-2-siklopenten-1-on] gibi ikincil alkollerin üretimi için transesterifikasyon ve ayrışma reaksiyonları üzerinde çalışılmıştır [Xu ve ark., 2005].

XV. Polimerlerin sentezinde lipaz

Polilaktat (PLA) lifleri doğal şekerlerin fermantasyonu sonucu elde edilen laktik asitten elde edilmektedir. Bu lifler düşük enerji tüketen ve biyolojik olarak kolay parçalanabilen çevre dostu malzemeler olup tekstil dokumalarında, paketleme maddelerinde, ilaçlarda ve biyoplastiklerde kullanılmaktadır [Drumright ve ark., 2000]. PLA lifi hidrofobik olduğu için, boya ve kimyasalların bu life ilgisi daha azdır. Bu durum, liflerin daha fazla su-çeker olması için yüzeylerinde küçük değişikliklerin yapılmasını gerekli kılmaktadır. Ester bağlarının polilaktatlarda bulunmasından beri, liflerin yüzeyleri lipaz kullanılarak (enzimatik olarak) değiştirilebilmektedir [Wang ve ark., 2002].

PLA'nın mekanik özellikleri polistiren ve polietilen tereftalata benzerdir ve laktik asidin farklı izomerlerinden elde edilebilmektedir [Garcia-Arrazola ve ark., 2009]. Poli-L-Laktik Asit (PLLA) yarı-kristal yapılıdır ve amorf PLA'ya göre potansiyeli daha yüksektir [Lim ve ark., 2008]. PLLA'nın enzimatik sentezinin *Pseudomonas cepacia*'dan elde edilen lipaz kullanılarak gerçekleştirildiği bilinmektedir [Matsumura ve ark., 1997].

Bütün bunlardan başka lipazlar; deri endüstrisi, atık su arıtımı, petrolün eldesi ve damıtılması esnasında toprağa ve suya yayılan petrol sızıntılarının giderilmesi, otomobil endüstrisi ve lokanta atıklarının temizlenmesi gibi çevresel çalışmalarda da kullanılmaktadır.

Mantar kökenli lipazların global pazarda büyük bir pay tutmasına rağmen, bakteriyel lipazlar da geniş ölçüde çalışılmakta ve ticari uygulamaları geliştirilmektedir. Bakteriyel lipazların potansiyelinin giderek anlaşılmasıyla, bu enzimler çeşitli endüstriyel sektörler tarafından başarıyla kullanılmaktadır. Lipazlar, immobilizasyon ve biyoetkileşme ile etkinlikleri geliştirilen etkili biyokatalizörlerdir. Ayrıca, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üyarlılmakta ve verimleri arttırılmaktadır. Bakteriyel lipazların gıda, tekstil, deterjan, ilaç ve deri endüstrilerindeki uygulamaları kapsamlı olarak araştırılmaya devam edilmektedir [Sangeetha ve ark., 2011].

2.2. Saflaştırma Basamakları

Fermantasyondan sonraki işlem basamakları önemli olup saf ve homojen bir ürün elde etmek için izolasyon ve bir saflaştırma sıralamasını içermektedir [Nandini ve Rastogi, 2009]. Ticari lipazların çoğu hücre dışı lipazlar olduğu için, saflaştırma prosesleri kapsamlı olmasına rağmen basittir. Ham enzim kaynağı olarak kabul edilen hücresiz süpernatant; ultrafiltrasyon [Quyen ve ark., 2003; Castro-Ochoa ve ark., 2005], süt tozu veya arap sakızı kullanılarak yapılan sprey-kurutması [Fickers ve ark., 2006], amonyum sülfat fraksiyonasyonu [Kim ve ark., 2002; Lima ve ark., 2004; Sangeetha ve ark., 2010a...] ve/veya soğutulmuş etanol, eter ve aseton gibi organik çözücüler kullanılarak yapılan çöktürme [Chakraborty ve Raj, 2008a; Riaz ve ark., 2010; Ghori ve ark., 2011] gibi ön saflaştırma basamaklarına maruz bırakılmaktadır. Bu ön hazırlık saflaştırmayı kromatografik tekniklerin bir kombinasyonunun kullanıldığı saflaştırma takip etmektedir. Yüksek saflıkta bir enzim elde etmek için genellikle tek bir kromatografik teknik yeterli olmamaktadır [Saxena ve ark., 2003]. Lipaz saflaştırmak için çoğunlukla bildirilen kromatografik yöntemler İyon Değişirme (IEC), Jel Filtrasyon (GFC) ve Hidrofobik Etkileşim

Kromatografisi (HIC)'dir. İyon değiştirme kromatografisi en yaygın kullanılan kromatografik yöntem olup çoğunlukla kullanılan iyon değiştiriciler; Q-sefaroza [Nawani ve ark., 2006], Amberlite IRA 410 (Cl^{-1} formu) [Chakraborty ve Raj, 2008b], DEAE-selüloz [Kambourova ve ark., 2003; Kanwar ve ark., 2006; Ghori ve ark., 2011], DEAE-sefaroza [Kumar ve ark., 2005], CM-sefaroza [Lianghua ve Liming, 2005] ve CM-selüloz [Vujaklija ve ark., 2003]dur. Diğer en iyi benimsenen yöntem olan Jel Filtrasyon Kromatografisi, sefakril [Sharma ve ark., 2002; Lianghua ve Liming, 2005], sefadeks [Lee ve ark., 2001; Ghori ve ark., 2011], sefaroza [Nawani ve ark., 2006], süperdeks [Kojima ve Shimizu, 2003; Kim ve ark., 2005] gibi matrisleri kullanmaktadır. Lipaz saflaştırmada uygulanan Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ise oktil veya fenil adsorbanlarını kullanmaktadır [Saxena ve ark., 2003; Kanwar ve ark., 2006; Ahmed ve ark., 2010]. Nawani ve Kaur (2007), bir *Bacillus* sp. türünden iki lipaz izoenzimini saflaştırmak için İyon Değiştirme, Jel Filtrasyon ve Hidrofobik Etkileşim Kromatografisini kullanmıştır. Ni^{2+} -şelatlı nitriloasetik asit (Ni-NTA) agaroz kolonu kullanılarak afinite kromatografisi de aynı zamanda pek çok araştırmacı tarafından uygulanmıştır [Zhang ve ark., 2009a, b; Akbari ve ark., 2010; Kanjanavas ve ark., 2010].

Çizelge 2.2. Proteinlerin özelliklerine göre saflaştırılmalarında kullanılan kromatografik teknikler [Nelson ve Cox, 2005].

Özellik	Teknik
Büyükölük	Jel filtrasyon kromatografisi
Yük	İyon-değiştirme kromatografisi
Hidrofobisite	Hidrofobik etkileşim kromatografisi Ters faz kromatografisi
Ligand spesifitesi	Afinite kromatografisi

Pauwels ve Gelder (2008) lipaz saflaştırmak için yeni bir strateji geliştirmiştir ve bu metot lipaz salgı mekanizması prensibinden yararlanmaktadır. Bakteriyel lipazlar,

özellikle Aile I'e ait olan türler katlanmamış bir formda periplazmaya salgılanırlar ve burada lipaz-spesifik foldaz (Lif) adı verilen bir (iç) membran bağlı protein tarafından katlanırlar ve doğal konformasyonlarına çevrilirler. Lif lipaza karşı yüksek bir afiniteye sahiptir ve yüksek spesifite göstermektedir [Rosenau ve ark., 2004; Pauwels ve Gelder, 2008]. Lipazın saflaştırılması, immobilize edilmiş His-işaretli Lif kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış lipaz-Lif kompleksi homojen olup klasik saflaştırma prosedürleriyle elde edilen lipaz preparatlarında genellikle kontaminant olarak bulunan lipopolisakkaritlerden yoksundur. Padilha ve ark., 'Amberlit' iyon-değiştirme reçinesi üzerinde 'Genişletilmiş Tabaka Absorpsiyonu' (Expanded Bed Absorption, EBA) kullanarak *Pseudomonas cepacia*'dan alkalin bir lipaz saflaştırmıştır [Padilha ve ark., 2009]. EBA, ham enzim numunesini ön hazırlık saflaştırma proseslerine maruz bırakılmadan saflaştırabilen yeni bir tekniktir. Sulu iki-fazlı sistem (ATPS) özütlemesi, lipazın saflaştırılmasını diğer klasik yöntemlere göre daha kısa sürede gerçekleşmesini temin eden diğer önemli bir yöntemdir. ATPS belirli bir konsantrasyondan sonra birbiriyle karışmayan iki fazlı sistemlerde kullanılır; bu sistemler polimer/polimer, polimer/tuz veya organik çözücü/tuz sistemleri olabilir [Ooi ve ark., 2009]. Lipazın saflaştırılmasında bir diğer modern yaklaşım ise ters miseller yöntemidir [Gupta ve ark., 2004; Lima ve ark., 2004].

2.2.1. Üretim ortamı

Bakteriyel lipazlar hem su içinde [Chakraborty ve Raj, 2008a] hem de katı-faz fermantasyonu [Baysal ve ark. 2005; Alkan ve ark., 2007] ile üretilebilmektedir. Bir fermantasyon prosesinde lipaz üretimi için karbon ve azot kaynakları gerekmektedir. Çoğu lipaz üretiminde; karbon kaynağı olarak basit yapıları şekerler kullanılmamakta onun yerine sadece lipid substratlarının kullanımı çalışılmaktadır [Zhang ve ark., 2009a, b]. Bununla birlikte, lipaz üretiminde lipid substratlarını başlatıcı (uyarıcı) olarak kabul eden ve glukoz gibi şekerleri karbon kaynağı olarak kullanan birkaç çalışma bulunmaktadır [Hun ve ark., 2003]. Lipaz üretimi nadiren belirleyici faktör olmakta ve hücre dışı lipaz üretiminin miktarı az olabilmektedir [Lee ve ark., 2001]. Bu sebeple, sebze yağları [Kumar ve ark., 2005], Tween 20/80 [Li ve ark., 2004], heksadekan [Boekema ve ark., 2007] ve tributirin ve tripalmitin gibi sentetik

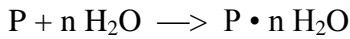
trigliseridler [Rahman ve ark., 2006] uyarıcı olarak kullanılmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki serbest yağ asitleri veya sebze yağları lipaz sentezini baskılayabilmektedir. Bu nedenle, çoğu lipaz üretiminde tek bir karbon kaynağı olarak Tween 80 kullanımı çalışılmaktadır. Tween 80'den oleik asidin ılımlı ve yavaş salınımı baskılamaya sebep olmamaktadır [Li ve ark., 2004]. Azot kaynakları lipaz üretiminde değişken etkiye sahiptir ve pepton gibi kaynakların lipaz üretimini arttırdığı bildirilmektedir [Gunasekaran ve ark., 2006]. Karbon kaynaklarının aksine, azot kaynaklarının lipaz üretimini baskıladığı bildirilmemiştir.

Yüzey aktif maddelerinin varlığı maksimum lipaz üretimi için önemli bir ön koşuldur. Lipazların katalitik aktivitesi arayüzey aktivasyonu ile yönetilmektedir. Arayüzey aktivasyonu, lipid substratının bir emülsiyon halini almasıyla başlayan ve böylece enzimin işlev görmesi için bir arayüzey sunan bir özelliktir. Yüzey aktif maddesinin ilavesi, reaksiyon ortamında bulunan organik ve sulu faz arasındaki yüzey gerilimini azaltmakta ve emülsifikasyon oranını arttırmaktadır [Wu ve Tsai, 2004]. Yaygın olarak kullanılan yüzey aktif maddeleri Tween ve Triton X-100'dür [Pogaku ve ark., 2010].

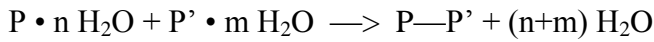
2.2.2. Amonyum sülfat çöktürmesi

Saflaştırma prosesleri genel olarak ikiye ayrılmaktadır; basit teknikler olan ön saflaştırma işlemleri ve ileri derecede saflaştırma sağlayan kromatografik teknikler. Hücre izolatları uzaklaştırılarak elde edilen ham ekstrakt örneği üzerinden saflaştırma işlemleri başlamaktadır. Saflaştırma işlemlerinin ilk basamağı genellikle çöktürme işlemidir. Nötral tuzların ilavesiyle yapılan çöktürme proteinlerin fraksiyonlanarak çökeltmelerinde en çok kullanılan yöntemdir. Amonyum sülfat çöktürmesi, iyonik kudretin artırılması ile oluşan presipitasyondur. Bu şekilde çöktürülen protein genellikle denatürasyona uğramadığı için aktivite proteinlerin çözülmesiyle elde edilmektedir. Buna ek olarak, bu çeşit tuzlar proteinleri denatürasyon, proteoliz ve bakteriyel kontaminasyona karşı stabilize etmektedir. Dolayısıyla iyonik kudretin artırılması ile oluşan çöktürme adımı proteinin santrifüjlenmeden önce veya sonra bir gece bekletileceği ideal bir adımdır. Bu

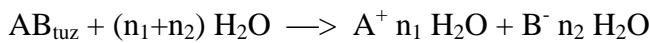
çöktürme şekli, proteinin yüzeyindeki hidrofobik tabiatına bağlıdır. Hidrofobik gruplar proteinin genellikle iç kısımlarında yer almaktadır, bazıları da yüzeyde yerleşmektedir. Su molekülleri bu gruplarla temas kurmaya zorlandığı için bu grupların üzerinde su moleküllerinin dizilmesi söz konusudur. Proteinin çözünmesini aşağıdaki denklemlerle gösterirsek:



Buradaki $n H_2O$ hidrofobik bölge üzerinde dizilmiş su moleküllerini temsil etmektedir. Örneğin, iki protein molekülünün bir araya gelerek hidrofobik bölge üzerinden etkileştiklerini düşünelim. Bu etkileşme sonucunda şu denkleme göre su açığa çıkar:



Protein moleküllerindeki hidrofobik bölgeler birbirleriyle etkileştikleri zaman agregasyon oluşmaktadır. Proteinler çözünür halde iken agregasyon olayı anlamlı bir sürece kadar oluşmaz. Eğer yukarıdaki reaksiyon ile açığa çıkan su molekülleri bir şekilde tutulursa protein agregasyonu oluşur. Tuz iyonları su ile birleştiklerinde su moleküllerini aşağıdaki reaksiyona göre tutarlar:



Protein çözeltisine çok miktarda tuz ilavesiyle yeterli miktarda su molekülü protein yüzeyinden uzaklaştırılırsa protein agregasyona uğrayarak çöker. Böylelikle daha büyük ve daha fazla hidrofobik alanları olan proteinler, daha az ve daha küçük hidrofobik alanları olan proteinlere göre daha çabuk agregasyona uğrayarak çöker. Bu şekilde proteinlerin çöktürülmesine 'proteinlerin fraksiyonlanması' denmektedir.

Proteinlerin agregasyon ile çökmesi için, protein içeren çözeltinin içinde tuzun çözünmesi gerekmektedir. Bu prosesdeki en önemli özellik tuzun yapısıdır. Tuzun çözünürlük gibi fiziksel özellikleri ile birlikte onun çöktürmeye neden olan etkinliği

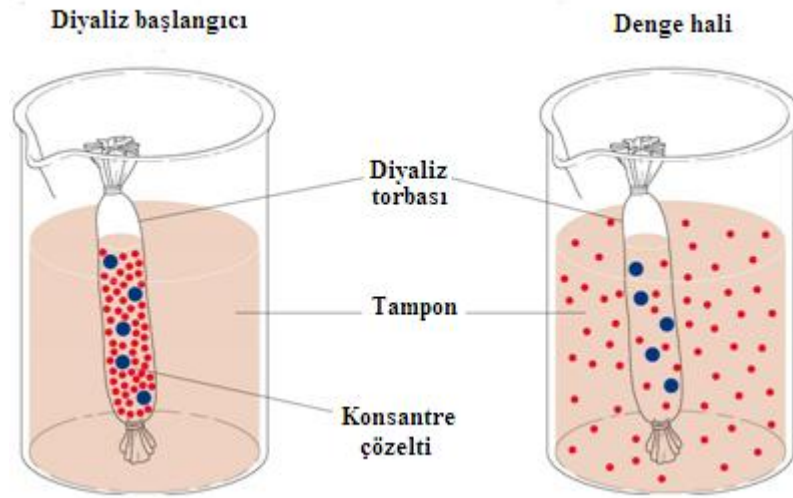
göz önünde bulundurulmalıdır. En etkin tuzlar sülfat, fosfat ve sitrat gibi çok yüklü anyonları içeren tuzlardır. Katyon kısmen daha önemsizdir fakat kompleks oluşturmamalı ve protein ile etkileşmemelidir. Katyon ve anyonların etkinlik sıralarına bakıldığında çöktürmeye neden olan en etkili tuzlar sodyum, potasyum ve amonyum sülfatlar, fosfatlar ve sitratlardır. Bu tuzların hepsinin farklı etkiler (sıcaklık, çözünürlük vb.) sebebiyle optimum pH aralıkları farklıdır. Yüksek pH'da çalışılması gereken koşullar hariç 'amonyum sülfat' bütün avantajlara sahip bir tuzdur. Göz önüne alınacak diğer hususlar yeterli saflıktaki tuzun maliyeti, çözünürlüğü ve çözünme ısıdır. Tuzun çözünmesi sırasında çözeltinin ısınması istenmeyen bir durumdur. Genellikle + 4 °C tercih edilmektedir. Bunun sebebi bazı inaktivasyon risklerini azaltmaktır. Protein çözeltisi içine tuz ilavesi çözelti karıştırılarak yapılmalıdır. Katı amonyum sülfat toz halinde yavaş yavaş ilave edilmelidir. Çünkü, hızlı karıştırmanın sebep olduğu köpürme proteinlerin denatürasyonuna neden olabilmektedir. İlave edilen son tuz miktarı da çözündükten sonra çözünen ve agrege olan proteinler arasında denge oluşana kadar 10-30 dakika daha karıştırmaya devam edilmelidir. Son olarak konsantre çözeltinin yoğunluğu dikkate alınmalıdır, zira bir çökeltinin santrifüjlenerek ayrılabilmesi agregat ve çözücü arasındaki yoğunluk farkına bağlıdır.

Oluşan protein agregatları birçok proteinin karışımıdır. Çökeltme işlemi uygulanacak ekstraktın yapısı, ilgi duyulan proteini çöktürmede gerekli olan tuz konsantrasyonunu etkileyecektir. Hangi konsantrasyon aralığının kullanılacağı yapılan deneysel çalışmalarla belirlenmektedir. Sadece çalışılan proteinlerin çökeceği spesifik aralıkta tuz konsantrasyonu kullanmak idealdir. Çalışılan proteinin seçilen tuz konsantrasyonu aralığında hepsinin çökmesi istenir. Fraksiyonlama işlemi, proteinin aktivite ve saflaştırma derecesi arasında daima bir uyum olacak şekilde yapılmalıdır [Erarslan ve ark., 2005].

2.2.3. Diyaliz

Ham ekstrakt örneğinin tuz ile muamelesi sonucu oluşan konsantre çözeltinin santrifüj edilmesiyle elde edilen protein agregatları çalışmada kullanılan uygun (mümkün olan en az hacimde) tampon ile çözülerek alınır. Uygun tamponla çözülmeyen proteinler denatüre olmuş proteinlerdir.

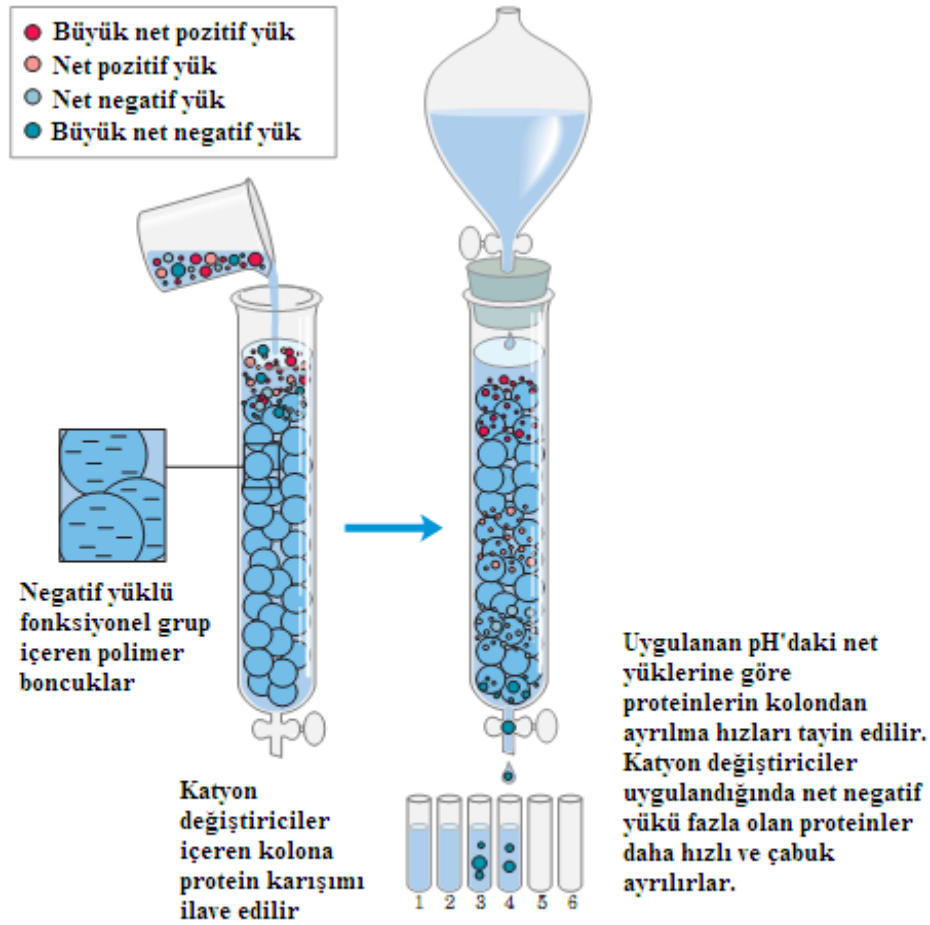
Elde edilen protein çözeltisinden tuzların giderimi veya bir sonraki saflaştırma işleminin verimli çalışması için çözeltinin tamponunun değiştirilmesi sıkça başvurulan durumlardandır. Bu amaçla, genellikle diyaliz işlemi uygulanmaktadır. Protein çözeltisi küçük molekülleri geçiren fakat büyük molekülleri alıkoyan yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbasına konur ve torba çalışılan (uygun iyonik güçteki) tampon içine bırakılır. Böylece membrandan tuz ve diğer küçük moleküller tampon ile yer değiştirirken, protein molekülleri içeride kalır. Moleküllerin bu şekilde geçişi, diyaliz torbasının içi ve tamponun konsantrasyonu eşit oluncaya kadar yani ortam dengeleninceye kadar devam eder (Şekil 2.4). Kullanılan membranın özelliği ve numune hacmine göre, ortamın dengelenmesi genellikle 4-6 saat sürmektedir. Diyaliz işleminde önemli olan nokta, diyaliz torbasına konan protein çözeltisinin yaklaşık 100 kat hacmi kadar büyük hacimde tampon kullanmaktır. Ayrıca, diyaliz işleminin en verimli şekilde gerçekleşmesi için diyaliz tamponunun birkaç kez değiştirilmesi gerekmektedir. Bunlara ilave olarak, diyaliz aktivite kayıplarını en aza indirmek için + 4 °C'de yapılmalıdır. Genellikle diyaliz gece boyu sürecek şekilde bekletilirken, istenilen ayırım sağlanıncaya kadar 1-2 gün sürdürülebilmektedir. Yarı geçirgen diyaliz torbası genellikle selüloz asetatından yapılmaktadır ve gözenekleri 1-20 nm çapındadır. Küçük moleküller ile tuzların uzaklaştırılması ve proteinlerin konsantre edilmesi için uygulanan diğer bir yöntem ise, ultrafiltrasyon tekniğidir [Erarslan ve ark., 2005; Güngör, 2008].



Şekil 2.4. Diyaliz işleminin şematik gösterimi [Güney Illinois Üniversitesi, 2011].

2.2.4. İyon-değiştirme kromatografisi

Proteinler yapılarındaki asidik ya da bazik aminoasitlerin yan zincirlerinde bulunan ve yüzeylerine doğru yer alan pozitif ya da negatif yüklü gruplar taşırlar. Bir proteinin net elektrik yükü üzerindeki negatif ve pozitif yüklü grupların bağlı sayısına bağlı olup pH ile değişir. Pozitif ve negatif yüklerin eşit sayıda olduğu pH değerine izoelektrik nokta (pI) denmektedir. Proteinlerin büyük çoğunluğu pH'ı 5 ile 9 arasında değişen bir pI değerine sahiptir. pI değerlerinin üzerinde proteinler negatif elektrik yüküne, altında ise pozitif elektrik yüküne sahiptirler.



Şekil 2.5. Kasyon değiştiricili iyon-değiştirme kromatografisi

İyon-değiştirme kromatografisi, proteinleri elektrik yüküne bağlı olarak ayırmayı esas alır ve sadece elektrik yüklü gruplarındaki değişikliklerle tekrar çözünmelerini hedefler. Proteinlerin ayrılması onların tamponlu hareketli faz ve inorganik elektrik yüklü grupların iliştirildiği bir matriksden ibaret olan durgun faz arasındaki denge dağılımlarında olan farklılıktan yararlanılarak başarılıdır. İyon-değiştirme kromatografisi proteinlerin katı bir matriksin elektrik yüklü gruplarına adsorpsiyonunu takiben iyonik kudreti yüksek sulu bir tamponda fraksiyonasyonu ve/veya konsantrasyonu için elüsyonu işlemlerini içermektedir. İyon değiştirmenin protein saflaştırmasında etkin olarak kullanılabilmesi için durgun faz pozitif yüklü ya da negatif yüklü proteinleri bağlamaya muktedir olmalıdır [Erarslan ve ark., 2005]. Kolon matriksi yani durgun faz, yüklü bağlı gruplar içeren sentetik bir polimerdir.

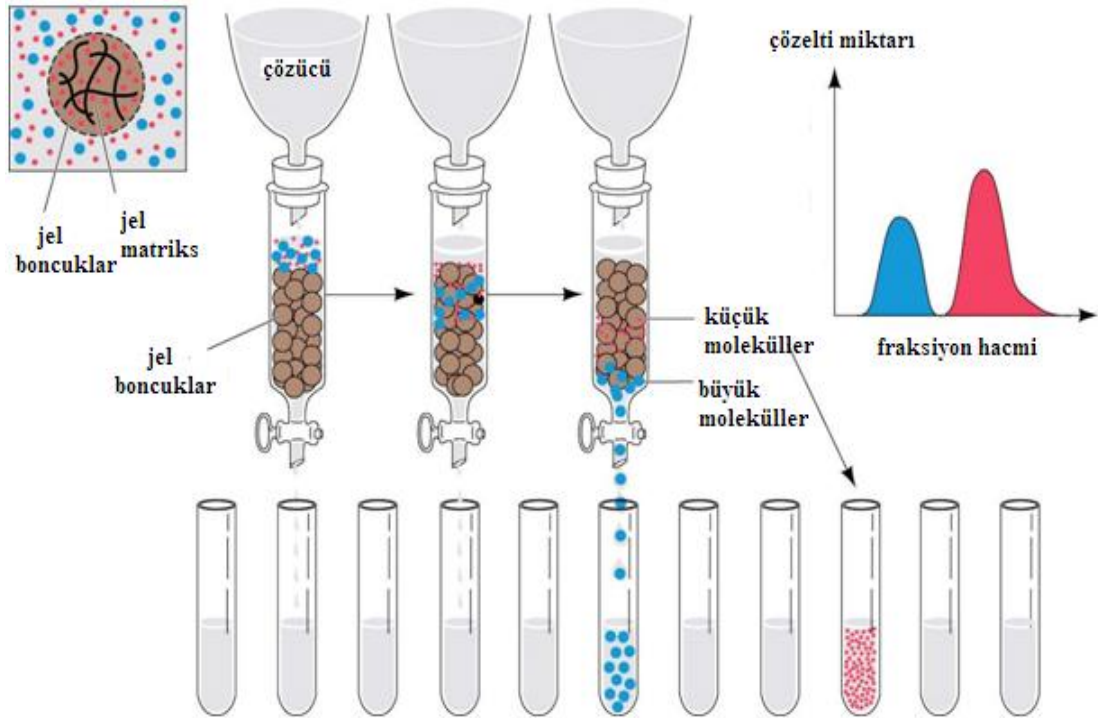
Kolon matriksi için başlıca üç tip iyon değişim malzemesi vardır; iyon değişim reçineleri, iyon değişim jelleri ve iyon değişim selülozları [Küfrevioğlu, 2010]. Bağlı anyonik gruplar katyon değiştiriciler, bağlı katyonik gruplar da anyon değiştiriciler olarak adlandırılmaktadır. Katyon değiştiricili iyon değiştirme kromatografisi Şekil 2.5'de gösterilmiştir. Kolonda bulunan yüklü gruplarda her bir proteinin afinitesi, molekülün iyonizasyon durumunu belirleyen pH ve çözelti içinde birbiriyle yarış halinde bulunan serbest tuz iyonlarının derişimleriyle belirlenir. Ayrılma kademeli olarak değişen pH ve/veya hareketli fazın tuz derişimiyle pH veya tuz gradyanı oluşturmak üzere optimize edilmektedir [Nelson ve Cox, 2005].

İyon-değişirme kromatografisi üzerinde en fazla pratik yapılmış olan protein saflaştırma yöntemidir. Bu onun kolay kullanımından, ölçek büyötmeye uygun olmasından ve diğer ayırma yöntemleri ile kıyaslandığında daha düşük maliyette olmasından kaynaklanmaktadır [Erarslan ve ark., 2005]. Bunlara ek olarak, bu yöntemle basit inorganik ve organik iyonlar birbirlerinden ayrılabilceği gibi enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan polielektrolitler de ayrılabilir [Küfrevioğlu, 2010].

2.2.5. Jel filtrasyon kromatografisi

Molekül büyüklüklerine göre proteinleri ayırmada kullanılan en uygun ve en etkili yöntem, jel filtrasyon kromatografisidir. Jel filtrasyon kromatografisi; farklı molekül büyüklüklerindeki proteinlerin ayırımını esas alan bir partitasyon kromatografisi şekli olup jel geçirgenlik kromatografisi, jel eksklüzyon (molekül seçme) kromatografisi, molekül eleme kromatografisi, boyut ayırma kromatografisi ve daha basit olarak jel kromatografisi gibi isimler de almaktadır. Jel filtrasyon kromatografisinin temeli, moleküllerin çözücü ve belirli bir gözenek çapına sahip olan durgun faz arasında ayrılmasına dayanmaktadır. Ayırma işlemi kürecik şeklinde olan gözenekli matriksin çözücü ile çevrelenmiş olarak bir kolona doldurulması ve üzerinden örneklerin geçirilmesi ile sağlanmaktadır. Kolon matriks malzemesi 'sefadeks', 'sefaroZ' gibi bir polisakkarit veya 'Biogel' gibi bir poliakrilamid türevi olabilir. Durgun fazdaki matriksin gözeneklerinden daha küçük ve daha büyük moleküller içeren bir numune

düşünüldüğünde; gözenek büyüklüğünden daha küçük olan moleküller matriksin gözenekleri içine girerler ve kolon boyunca daha yavaş hareket ederler. Gözenek büyüklüğünden daha büyük olan moleküller ise durgun faz (matriks) tarafından dışarıda bırakılırlar ve böylelikle kolonu daha önce terk ederler. Ara büyüklükteki moleküller matriks gözenekleri içine girebilirler fakat kolon içinde küçük moleküllere göre daha kısa süre kalırlar. Sonuç olarak, moleküllerin hepsi kolondan azalan büyüklük sırasına göre ayrılmaktadır.

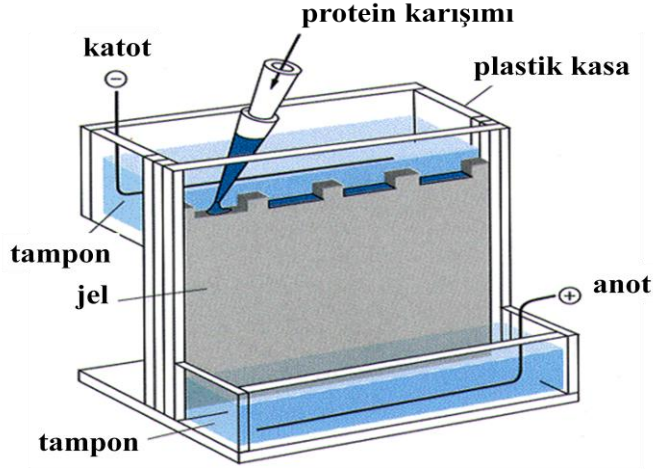


Şekil 2.6. Jel filtrasyon kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi diğer makromoleküller, virüsler, ribozomlar, hücre çekirdekleri ve hatta bakteriler gibi çok daha büyük yapıların karışımlarının ayrılmasında da kullanılabilir. Bu durumlarda sadece uygun gözenek çapında partiküller seçilmelidir. Bu yöntemde ayırma gücü o kadar kuvvetlidir ki, bu basit yöntem proteinlerin molekül kütlelerinin tayininde de kullanılmaktadır [Erarslan ve ark., 2005; Küfrevioğlu, 2010].

2.2.6. Elektroforez

En genel anlamı ile elektroforez, yüklü moleküllerin elektrik alanda göçüdür. Bu tanım açıldığında; sulu bir çözelti içinde, süspansiyon ya da çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine ‘elektroforez’ denmektedir. Bu küçük parçacıklar; hücre organelleri, bakteri hücreleri, virüsler, protein molekülleri veya sentetik parçacıklar olabilir.



Şekil 2.7. Jel elektroforez tankı

Bir jel matrisi üzerinde gerçekleşen elektroforetik ayırım tekniklerinin proteinlerin analizinde önemli avantajları bulunmaktadır:

- Jel elektroforez teknikleri kontaminantlar göz önüne alındığında oldukça sağlam tekniklerdir. Örnekler ön bir saflaştırma adımına ihtiyaç duyulmadan kolayca uygulanabilmektedir.
- Proteinler bu tekniklerle ayrıştırılırken aynı zamanda da görüntülenebilmektedir. Araştırmacı karışımdaki farklı protein sayısını veya özgün bir proteinin saflık derecesini gözlemleyebilir.

- Ayırım tekniği olarak elektroforez oldukça yüksek bir çözünürlük göstermektedir.
- Ayırım sonunda proteinlerin izoelektrik noktaları ve yaklaşık moleköl kütleleri gibi çok önemli fizikokimyasal özellikleri de tanımlanmış olur.
- Uygun boyama metodu ile fraksiyonlara ileri analiz teknikleri uygulanabilmektedir [Kaya, 2002; Erarlan ve ark., 2005; Nelson ve Cox, 2005].

Bir molekölün jeldeki elektroforetik hareketi, yine o molekölün büyüklüğüne, yapısına, yoğunluğuna, jelin gözenek aralığına, tamponun pH'sına, iyonik gücüne ve ortamın sıcaklığına bağlıdır.

SDS-PAGE Tekniği

SDS

Ayrılmak istenen proteinler çeşitli şekil ve büyüklükte olduğu için yapılması gereken, bu proteinlerin herhangi bir sekonder, tersiyer veya kuarterner yapı göstermemesini sağlamak ve onları lineer bir forma sokmaktır. Bu görevi ise, sodyumdodesil sülfat (SDS) başarılı bir şekilde yerine getirmektedir. SDS bir çeşit deterjan olup yapısında bulunan sülfat grupları sayesinde negatif yük taşımaktadır. SDS'nin hidrofobik molekülleri çözebilme yeteneği vardır.

Proteinlerin yapısında, kendilerini oluşturan aminoasitlerin yüklü –R gruplarından dolayı, negatif ve pozitif yüklü bölgeler vardır. Polar olmayan –R grupları proteinlerde hidrofobik bölgeler oluşturur. Proteinler SDS ile muamele edildiğinde; SDS bu hidrofobik bölgeleri kırarak tüm protein molekölünü negatif yükle çevreler. Sonuç olarak, protein SDS tarafından denatüre edilmiş (primer yapısına indirgenmiş) ve lineer forma gelmiştir.

PAGE

Proteinler denatüre edilip bir elektrik alana konulduklarında herhangi bir ayırım olmadan hepsi pozitif yüklü kutuba doğru hareket eder. Bu nedenle ayırım sağlamak için proteinlerin büyüklüklerine göre farklı hızlarda hareket etmelerini sağlayacak bir ortamın oluşturulması gerekmektedir. Bu ortam poliakrilamid ile sağlanmaktadır. Poliakrilamid, akrilamid monomerlerinin polimerize formudur. Polimerleşme sonucunda bir jel oluşur ki proteinler bu jel içerisinde elektrik alan etkisiyle hareket eder. İşte bu tekniğe, ‘poliakrilamid jel elektroforezi’ adı verilmektedir. Jeldeki kuyucuklara uygulanan proteinler sadece büyüklüklerinin etkisi ile jelde daha hızlı veya yavaş yürüyeceklerdir. Büyük moleküller jel kanallarının arasından daha zor geçecekleri için küçük moleküller jelden daha çabuk çıkmaktadır. Bu şekilde; molekül kütleleri bilinen proteinlerle analiz yapılacak proteinler beraber uygulanarak molekül kütleleri bilinmeyen proteinlerin yaklaşık molekül kütleleri ve saflık dereceleri tayin edilmektedir [Erarslan ve ark., 2005].

2.3. Kaynak Araştırması

Sekhon ve ark. (2005), *Bacillus megaterium* AKG-1’den hücre dışı bir lipaz saflaştırmışlar ve bu enzimin 55 °C/pH 7’de optimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Enzim, 50 °C’de yarım saat bekletilince aktivitesini (% 100 aktivite) tamamen korurken, 70 °C’de yarım saat tutulunca aktivitesinin yarısını kaybetmiştir. Aseton (% 20 v/v), DMSO (% 20 v/v) ve izopropanol (% 10 v/v) varlığında lipaz aktivitesinde % 20-70’lik bir artış gözlenmiştir. Enzim aktivitesi, sırasıyla aseton (% 10 v/v), benzen ve izopropanol ile muamelesi sonucu 24 saat sonra % 92, 98 ve 107’dir. Deoksikolik asit, sodyum deoksikolat, lithokolik asit, rhamnolipid, Brij 52 ve kolik asit lipaz aktivitesini sırasıyla 76, 36, 24, 24, 23.6 ve % 13 uyarılmıştır. 10mM konsantrasyonda sodyum sülfid, sodyum metabisülfid ve L-sistein-HCl gibi indirgen maddelerin eklenmesiyle lipaz aktivitesi sırasıyla % 127, 146 ve 150 ile uyarılmıştır. Lipaz sadece (+) enantiyomerine hidroliz olabilen rasemik 3-asetoksi-β-laktam’ın hidrolizinde enantiyoseçicilik göstermiştir.

Lima ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 tarafından üretilen lipazın organik çözücülerin biyokatalizindeki kullanım potansiyelini değerlendirmiştir. 72 saat fermantasyondan sonra enzim, direkt olarak kültür ortamından % 80 doygun olacak şekilde amonyum sülfat ilavesiyle çöktürülmüştür. Çöken enzim molekülleri tamponda çözülerek diyaliz edilmiştir. Triaçilgliseridlerin hidrolizi; p-nitrofenil palmitat (pNPP)'in 37 °C'de hidrolizini içeren sulu sistemlerdeki daha ileri lipolitik tayinler yapılmıştır. Maksimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık, reaksiyonun ilk dakikasındaki ürün oluşumuna bağlı olarak 55 °C'dir. 40-70 °C sıcaklıklardaki inkübasyon sonucunda lipolitik aktivite oldukça kararlı olup; 60 °C, 10 dakika inkübasyondan sonra aktivitenin % 77'si korunmuştur. Enzimin bütanol, toluen, heksan, izooktan, heptan ve sudaki aseton, etanol ve izopropanolün çeşitli karışımlarındaki [% 25, 50, 80 ve 100 (v/v)] stabilitesi 29 °C'de inkübasyon edilerek çalışılmıştır. Sadece bütanol, toluen ve heksanda stabil olmayıp; lipazlar için nadir kullanılan aseton, etanol ve izopropanolün yüzdeleri artırılarak inkübe edildiğinde de aktivasyon gösterdiği görülmüştür. pNPP'in 37 °C'de AOT (dioktil sodyum sülfosüksinat)/heptan ters misellerindeki hidrolizinde, 5 ve 10 W0 [H₂O]/[AOT] değerleriyle, en yüksek spesifik aktivite değerleri sırasıyla 111 ve 104 U mg⁻¹ elde edilmiştir. pNPP'nin hidrolizinde R_{O/A} (aynı reaksiyonlar için organik ve sulu ortamdaki reaksiyon hızlarının oranı) 1,91 olup bu değer dikkate değerdir çünkü lipazlar için bu değer genellikle 1,0'dan daha azdır. *B. megaterium*'dan saflaştırılan lipaz; yüksek sıcaklıklarda, hidrofobik ve hidrofilik organik çözücülerde iyi stabilitesine bağlı olarak biyokataliz uygulamalarında umut verici sonuçlar göstermektedir.

Chakraborty ve ark. (2010), deniz yosunundan izole ettikleri *Bacillus circulans* bakterisinden lipaz enzimini saflaştırmış ve bu enzimi sardalye (ateş balığı) yağı trigliseridlerinden çoklu doymamış yağ asiti (PUFA) konsantreleri elde etmek için kullanmıştır. Enzim, 386 LU/mg spesifik aktivite ile 132-kat saflaştırılmıştır.

Chakraborty ve Raj (2008a), *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 tarafından üretilen hücre-dışı lipaz enzimini amonyum sülfat fraksiyonasyonu, etanol/eter çöktürmesi, diyaliz, Amberlite IRA 410 (Cl⁻ formu) ile anyon değiştirme kromatografisi ve Tris-

HCl tamponu (pH 8,0) kullanarak Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile homojen olarak saflaştırmıştır. Bakteri 37 °C’de 48 saat ve karbon kaynağı olarak sardalye yağı ile desteklenmiş nutrient broth (pH 8,0) kültür ortamından sonra ham ekstrakt aktivitesi 41,7 LU/ml olarak ölçülmüştür. Jel filtrasyon kromatografisinden sonra enzim % 8,36 verim ile 208-kat saflaştırılmış ve 520 LU/mg spesifik aktivite elde edilmiştir. Saf enzimin monomerik yapılı bir protein olduğu ve yaklaşık 74,8 kDa molekül kütlesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Lineweaver–Burk kuralına göre; 4-nitro fenilpalmitat substrat olarak kullanıldığında V_{maks} 0,64 mM/mg/min ve K_m 29 mM olarak bulunmuştur. Lipaz enzimi 45 °C ve pH 8’de optimum aktivite göstermiştir. 45 °C’deki yarı-ömrü ($T_{1/2}$) 82 dakika iken, 55 °C’de ise 48 dakikadır. Katalitik aktivite, 30 mM Ca^{2+} (% 18) ve Mg^{2+} (% 12) ile artmıştır. Ancak, düşük konsantrasyonda (10 mM) bile Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Fe^{2+} iyonları lipazı inhibe etmiştir. 70 mM konsantrasyondaki EDTA, lipaz aktivitesini büyük ölçüde inhibe etmiştir. Fenil metil sülfonil florür (PMSF, 70 mM) ise orijinal lipazı tamamen inaktif hale getirmiştir. Ca^{2+} ve sorbitolün bir kombinasyonu, önemli ölçüde yüksek kalan bir aktivite (% 100) ile lipaz aktivitesini sinerjik bir etkiyle uyarmıştır. Hatta sadece Ca^{2+} ile inkübe edildiğinde, 45 dakika sonra % 91,5 aktivitesini korumuştur. Bunlara ek olarak, lipaz enzimi daha fazla sayıda çift bağ içeren triaçilgliserollere karşı hidrolitik olarak dayanıklı bulunmuştur.

Baysal ve ark. (2005), *Bacillus coagulans* bakterisinden lipaz enzimini katı-faz fermantasyon tekniği ile üretmiştir. Substrat olarak kavun kabuğunu kullanmışlar ve çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapmışlardır. % 2 oranında zeytinyağı, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum nitrat, nişasta ve maltozun enzim üretimini arttırdığını tespit etmişlerdir. Metal iyonlarından Mn^{2+} , Ni^{2+} , nin enzimi sırasıyla % 32 ve % 26 oranında inhibe ettiğini, Ca^{2+} , nin ise enzim aktivitesini % 105 oranında arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Kanjanavas ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, ısıya dayanıklı *Bacillus* sp. türü RN2 (Lip-SBRN2) bakterisinden rekombinant lipaz enzimini izole ederek organik çözücüler ve deterjanlara karşı dayanıklılık özelliklerini karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi, SDS-PAGE ve jel filtrasyon

kromatografisi sonucu 19 kDa olarak tespit edilmiştir. Lip-SBRN2 enziminin 9–11 pH değerlerinde ve 45–60 °C sıcaklıklarda kararlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, metalo olmayan monomerik bir protein yapısına sahip olduğu; *p*NP-kaprilat (C8), *p*NP-laurat (C12) ve hindistan cevizi yağına karşı aktif olduğu gözlenmiştir. Bunlara ek olarak; % 108 benzen, % 102,4 dietileter ve % 112 SDS varlığında Lip-SBRN2 yüksek aktivite değerleri göstermiştir. *Bacillus* sp. türü RN2 tarafından salgılanan organik çözücü ve deterjanlara dayanıklı enzimin, organik çözücüler ve deterjanlar varlığında gerçekleşen reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılabileceği beklenmektedir.

Ahmed ve ark. (2010), yağca zengin toprak numunesinden izole ettikleri *Bacillus subtilis* EH 37 bakterisinden mezofilik bir kültür ortamıyla ısıya-dayanıklı yeni bir alkalin lipaz üretmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesiyle kısmen saflaştırılan enzim, fenil-sefaroze hidrofobik etkileşim kromatografisi ile 17,8-kat saflaşarak 41,9 U/ml spesifik aktivite göstermiştir. Kısmen saflaşan enzim, pH 8 ve 60 °C’de maksimum aktiviteye sahip olup 50 °C ve 60 °C’de 60 dakika boyunca aktivitesini korumuştur. Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Zn^{2+} iyonları lipaz aktivitesinde uyarıcı bir etki gösterirken, Fe^{3+} ve Co^{2+} iyonları aktivitede azalmaya neden olmuştur. Bunlara ek olarak, enzim organik çözücülere maruz bırakıldığında başlangıç aktivitesinin % 80’inden fazlasını korumuştur. % 15 izopropil alkol ve % 30 n-hekzan varlığında sırasıyla % 107 ve % 115 aktivite elde edilmiştir. EH 37 lipazı ayrıca, organik çözücü varlığında etil kaprilatın sentezinde etkili bir katalizör olduğunu kanıtlamış; böylece susuz ortamdaki kataliz işlemlerinde *B. subtilis*’den elde edilen lipazın kullanımı görüşünü uyandırmıştır.

Chen ve ark. (2007), *Bacillus cereus* C71’den lipaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, fenil-sefaroze kromatografisi, DEAE iyon değiştirme kromatografisi ve CIM1 QA kromatografisi ile saflaştırmıştır. Sonuç olarak, lipaz enzimi % 18 verim ile 1092-kat saflaştırmıştır. Saflaşan enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ve kütle spektrometresiyle yaklaşık 42 kDa olarak bulunmuştur. Optimum pH 9,0 olmak üzere, lipaz pH 8,5–10,0 arası değerlerde kararlıdır. Maksimum aktivite 33 °C’de gözlenirken 35 °C 3 saat inkübasyondan sonra aktivite % 92 korunmuştur. Lipaz, açıl

zincir uzunluğu C4 ve C12 arasındaki p-nitrofenil esterlerini hidroliz etmiştir. Cu^{2+} ve Zn^{2+} varlığında enzim güçlü bir şekilde inhibe olurken, non-iyonik yüzey-aktif maddelerle aktivite artmıştır. Saflaştırılan lipaz, ticari lipazlara göre etil 2-arilpropanoatın R-izomerine karşı daha yüksek enantioseçicilik göstermiştir; optik olarak saf ilaçların hazırlanmasında katalizör olarak da kullanılabilir.

Kanwar ve ark. (2006), *Bacillus coagulans* MTCC-6375 türünden yeni bir hücre-dışı lipaz enzimini, DEAE-selüloz anyon değiştirme ve oktil-sefroz hidrofobik kolon kromatografilerini kullanarak 76,4-kat saflaştırmıştır. Saflaştırılan enzim, denatüre edici jel elektroforezinde elektroforetik olarak saf bulunmuş ve yaklaşık molekül kütlesi 103 kDa olarak tespit edilmiştir. Lipaz enzimi 45 °C'de optimum aktivite göstermiş; 55 °C'de 20 dakika inkübasyon sonunda aktivitesi yaklaşık % 50 oranında korunmuştur. Enzimin optimum pH'sı ise 8,5 olarak belirlenmiştir. Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Al^{3+} ve Fe^{3+} (1 mM) lipazın hidrolitik aktivitesini arttırmıştır. İlginç olarak, Hg^{2+} iyonları lipaz aktivitesinde maksimum bir artış gösterirken, Zn^{2+} ve Co^{2+} iyonları bu enzime zıt bir etki göstermiştir. EDTA (150 mM) lipaz aktivitesini inhibe ederken, Hg^{2+} veya Al^{3+} (10mM) EDTA-baskılanmış lipaz aktivitesini büyük oranda yenilemiştir. 15 mM PMSF lipaz aktivitesini % 98 azaltmıştır. Lipazın, 8 (*p*NPC) ve 16 (*p*NPP) karbon zincir uzunluğundaki *p*-nitrofenil esterlerine karşı daha fazla spesifik olduğu tespit edilmiştir. *p*NPP'nin hidrolizinde lipazın V_{maks} değeri 0,44 mmol $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, K_m değeri 28 mM iken; *p*NPC'nin hidrolizinde ise V_{maks} 0,7 mmol $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, K_m değeri de 32 mM olarak bulunmuştur.

Yapaşan (2008), topraktan izole ettiği *Pseudomonas* sp. türünden hücre-içi lipaz enzimini farklı analitik yöntemler kullanarak varlığını kanıtlamış, kısmen saflaştırmış ve karakterizasyonunu yapmıştır. Saflaştırma işlemi için boyut dışlamalı kromatografi kullanılmıştır. Kısmen saflaştırılan enzim, p-nitrofenil lauratın substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesini göstermiştir. Lipaz enziminin çalışması için en uygun pH aralığının pH 8,0-9,0 civarında, alkali pH aralığında olduğu tespit edilmiştir. Uygun sıcaklık değeri ise 25 °C olarak belirlenmiştir. Metal tuzları ve organik çözücüler varlığında; enzim aktivitesi kimi katkı bileşikleri varlığında hızlı bir şekilde düşerken, kimi katkı bileşikleri varlığında

etkilenmeden sabit kalmıştır. Kısmi olarak saflaştırılmış lipaz enziminin, poliakrilamid jel elektroforezinde yaklaşık molekül kütlesi 23 kDa ve 49 kDa arasında bulunmuştur.

Gunalakshmi ve ark. (2008), karides havuzu çöküntüsünden izole ettikleri 20 *Actinomycetes* sp. türünün lipaz aktivitelerini incelemiştir. LE-11 türü, kesin olmamakla birlikte *Streptomyces griseochromogenes* olarak tanımlanmış; daha yüksek bir lipaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiş ve ileri çalışmaları yapılmıştır. pH, sıcaklık, sodyum klorür konsantrasyonu, karbon ve azot bileşenleri gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin, *Streptomyces griseochromogenes* türünden elde edilen lipazın aktivitesi üzerindeki etkileri çalışılmıştır. pH 7,0, sıcaklık 55 °C, % 0,05 NaCl konsantrasyonu, karbon bileşeni olarak mannitol ve azot bileşeni olarak L-fenilalanin olduğunda enzim aktivitesi maksimum gözlenmiştir. Ham ekstraktın protein miktarı 2,057 µl ml⁻¹ olarak tayin edilmiştir. Ham protein ve kısmen saflaştırılmış protein SDS-PAGE'de yürütüldüklerinde eşit pozisyonda bir bant göstermiştir; ancak proteinin molekül kütlesi tespit edilememiştir. *Streptomyces griseochromogenes*'in geniş fermantasyon ortamlarındaki çoğalma yeteneği tam manasıyla tanımlandıktan sonra, bu mikroorganizmanın lipazın ticari amaçlar için üretiminde etkili olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Longo ve ark. (2010), Galiçya bölgesindeki bir sıcak su kaynağından izole ettikleri termofilik bir *Bacillus thermoamylovorans* türünden termofilik, lipolitik bir enzimi saflaştırmayı ve deneme niteliğinde karakterizasyonunu amaçlamışlardır. Bu bakteri, yüksek hücre-dışı enzim aktivitesi göstermiştir. Hücre-dışı ekstrakt, amonyum sülfat ve organik çözücülerini içeren çeşitli protein çöktürme protokolleri ile konsantre edilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) ile ileri saflaştırma tekniği uygulanmıştır. Aynı zamanda, kütle spektrometre teknikleriyle enzimin tanımlanması üzerinde çalışılmıştır.

Nawani ve ark. (2006), termofilik bir *Bacillus* sp. türünden hücre-dışı, ısıya-dayanıklı bir lipolitik enzim saflaştırmıştır. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi, fenil-sefaroze (jel filtrasyon) kromatografisi ve Q-sefaroze kromatografisi sonucu % 10

verim ve 9730 ünite/mg protein spesifik aktivite ile 58 kat saflaştırılmıştır. Proteinin bağıl molekül kütlesi SDS-PAGE’de 61 kDa, jel filtrasyon kromatografisinde ise yaklaşık 60 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzim, 60–65 °C’de optimum aktivite göstermiş; 60 °C, pH 8,0 ve 1 saat inkübasyon sonunda aktivite % 100 korunmuştur. Optimum pH 8,5 olarak belirlenmiştir. 70 °C’de 65 dakika ve 80 °C’de 23 dakika inkübasyon sonucunda % 50 aktivite göstermiştir. Lipazın katalitik fonksiyonu Mg²⁺ (10 mM) ile aktive olurken, civa (10 mM) ile tamamen inaktif olmuştur. Tripsin ve kimotripsin muamelesiyle enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etki gözlenmezken, termolizinin enzimi % 50 inhibe ettiği görülmüştür. PMSF, SDS, DTT, EDTA, DEPC, βME (her biri 100 mM) ve eserinin (10 mM) lipolitik enzimin aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Substrat olarak p-nitrofenil laurat kullanıldığında; enzimin Km değeri 0,5 mM, Vmaks değeri ise 0,139 μM/min/ml olarak bulunmuştur. Enzimin kısa zincirli triaçilgliserollere öncelik gösterdiği ve trioleini tüm pozisyonlarından hidrolizlediği gözlenmiştir. Diğer ısıya-dayanıklı *Bacillus* sp. lipazlarından farklı olarak, bu enzimin çok düşük oranda hidrofobik aminoasit içerdiği (% 22,58) belirlenmiştir. İmmünolojik çalışmalar ise, enzimin aktif bölgesiyle antijen-bağlama bölgesinin örtüşmediğini göstermiştir.

Ramani ve ark. (2010), 16S rDNA gen dizilim analizi ile *Pseudomonas gessardii* olarak tanımlanan türün yüksek bir hücre-dışı lipolitik aktivite gösterdiğini tespit etmiştir. *P. gessardii* tarafından asidik lipazın üretimi için lipid substratı olarak kesimhane çöplüğü ve keçi iç yağı kullanılmıştır. Maksimum lipaz aktivitesi (156 U/ml), asidik bir pH’da (3,5) ve 0,31 g substrat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Saflaştırma basamakları sonunda, asidik lipazın spesifik aktivitesi 1,473 U/mg, molekül kütlesi ise 94 kDa olarak tespit edilmiştir. Saflaştırılan bu lipazın ilginç bir özelliği, yüksek bir molekül kütlesi ile pH 2,0 ila 5,5 arasında yani yüksek asidik bir pH aralığındaki stabilitesi olmuştur. Aminoasit bileşimi HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Bu asidik lipaz, medisinal (enzim tedavisinde pankreatik lipaza alternatif olarak), oleokimyasal ve biyoteknolojik sektörlerde potansiyel uygulamalara sahiptir.

Madan ve Mishra (2009), termofilik bir tür olan *Bacillus licheniformis* RSP-09'dan lipaz genini (543 bp), *Escherichia coli* BL21 (DE3)'nin genlerine ekspresyonunu gerçekleştirmiştir. 181 kalıntının kodlanmasıyla oluşan bu polipeptid; *Bacillus pumilus* B26 lipaz geni ile % 96 oranında benzerlik göstermiştir. Rekombinant lipaz, elektroforetik homojenlik ile His-işaretli kromatografide 19-kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan rekombinant *Bacillus licheniformis* RSP-09 lipazının molekül kütlesi 24 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu enzim, pH 10 ve 40 °C'de optimum aktivite göstermiş; pNPP varlığında Km değeri $453 \pm 118 \mu\text{M}$, Vmaks değeri ise $288,5 \pm 33,67 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Saflaştırılmış bu rekombinant lipazın geniş oranda bir substrat spesifitesine sahip olduğu, ayrıca deterjan ve organik çözücülere dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple, enzimin biyokatalizör olarak susuz çözücülerde ve deterjanlarda kullanılma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir.

Ertuğrul ve ark. (2007), zeytin fabrikasının atıksuyundan izole ettikleri bakteri türlerinin lipaz üretme kapasitelerini araştırmıştır. Tribütirin agar ortamında çoğaltılan 17 tür arasında en yüksek lipaz aktivitesi gösteren tür, *Bacillus* sp. türü olarak tanımlanmıştır. Tribütirin ortamındaki pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış, pH 6'da optimum aktivite gözlenmiştir. Bu sıvı ortam bileşeni, tribütirin yerine çeşitli karbon kaynakları konularak geliştirilmiştir. Triolein, trimyristin, trilaurin, trikaprin, trikapriline, tribütirin, triasetin, Tween 80, zeytin fabrikası atıksuyu, glukoz ve kesilmiş süt suyunun farklı bileşimlerini içeren ortamlar arasında, % 20 kesilmiş süt suyu ve % 1 triolein içeren ortam en yüksek lipaz aktivitesini vermiştir. *Bacillus* sp. türünün optimum kültür ortamı pH 6 / 30 °C'de 64 saat sonunda hücre-dışı lipaz aktivitesi 15 U/ml, hücre-içi lipaz aktivitesi ise 168 U/ml olarak tespit edilmiştir.

Ooi ve ark. (2009), *Burkholderia pseudomallei*'den elde edilen lipazı geliştirmek için alkol/tuz-esaslı sulu iki-fazlı sistemler (ATPSs) kullanmıştır. Alkol-bazlı üst faz (etanol, 2-propanol ve 1-propanol) ve tuz-bazlı bir alt fazdan (amonyum sülfat, potasyum fosfat ve sodyum sitrat) oluşan dokuz bifazik sistem, lipaz eldesindeki etkinlikleri bakımından değerlendirilmiştir. Lipazın her bir çözeltideki stabilitesi test

edilerek her sistem için faz diyagramları çizilmiştir. Lipazın saflaştırılmasında optimum dağılıma etkinliği, % 4,5 (w/v) NaCl varlığında % 16 (w/w) 2-propanol ve % 16 (w/w) fosfattan oluşan bir sulu iki-fazlı sistemde elde edilmiştir. Saflaştırılan lipazın verimi % 99, saflaştırma faktörü ise 13,5 olarak bulunmuştur.

Dutta ve Ray (2009), bozulmuş hindistan cevizinden izole ettikleri bakteriyel türü *Bacillus cereus* olarak tanımlamış ve bu türün ısıya-dayanıklı alkalen hücre dışı lipaz üretmede yeterli olduğunu tespit etmiştir. Enzim substrat reaksiyonu için optimum sıcaklık, zaman ve pH; 60 °C, 10 dakika ve 8,0 olarak bulunmuştur. Triton X-100 ve setiltrimetilamonyum bromür hariç diğer yüzey aktif maddeleri, enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etki göstermemiş ya da çok az bir inhibitör etkisi göstermiştir. Enzimin, oksitleyici maddeler ve proteaz enzimine karşı stabil olduğu gözlenmiştir. Maksimum lipaz üretimi 30-33 °C, pH 8,0, 24 saat fermantasyon süresi ve 250 ml'lik erlenlerde 50 ml'lik örneklerle elde edilmiştir. Lipaz üretimi için daha etkili karbon ve azot kaynakları; % 2 nişasta, amonyum sülfat (azot miktarı 21,2 mg/100 ml), pepton (azot miktarı 297 mg/100 ml) ve üre (azot miktarı 46,62 mg/100 ml)den oluşan bir kombinasyon ile sağlanmıştır. Maksimum enzim aktivitesi ise $33 \pm 0,567$ IU/ml olarak belirlenmiştir.

Sangeetha ve ark. (2010), tabakhane atıklarından izole ettikleri *Bacillus licheniformis* VSG1 türünden ortak bir ortamda aynı anda proteaz ve lipaz üretmeyi amaçlamıştır. Protein kaynağı, lipid kaynağı ve emülsifiye edici maddeleri içeren ortam bileşenlerinin proteaz ve lipaz üretimine etkisi incelenmiştir. Her iki enzim de optimize edilmiş şartlarda (pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi) üretilmiştir. Proteaz ve lipazı içeren enzim karışımı; amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılarak 20-kat saf enzimler elde edilmiştir. Proteaz ve lipazın optimum pH ve sıcaklığı ile inhibitör, katkı maddeleri ve çözücülere karşı cevabını belirlemek için, saflaştırılan enzim karışımının karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. SDS-PAGE ile her iki enzimin de molekül kütlesi 40 kDa olarak tespit edilmiştir. Proteaz ve lipazın birlikte üretimi ve her iki enzimin tek bir karışımdan saflaştırılması; bu enzimleri birlikte kullanan pek çok endüstriyel proses olduğu için endüstriyel öneme sahiptir.

Castro-Ochoa ve ark. (2005), Meksika’da bulunan Veracruz bölgesindeki “El Carrizal” sıcak su kaynaklarından izole ettikleri 11 aerobik, termofilik *Bacillus* sp. türü arasından; yüksek lipaz aktivitesine sahip olmasından ötürü *Bacillus thermoleovorans* CCR11 (EMBL # AJ536599)’i lipazın karakterizasyonu için seçmiştir. Lipaz enzimi, diafiltrasyon (polietersülfon ultrafiltrasyon membranı co500,000) ve preparatif izoelektrik odaklama yöntemleriyle saflaştırılmıştır. PAGE’de daha yüksek bir molekül kütlesi göstermesiyle birlikte, SDS-PAGE’de lipazın relatif molekül kütlesi 11 kDa (bildirilen en küçük molekül kütlesi) olarak tespit edilmiştir. *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazı için optimum katalitik şartlar, 60 °C ve pH 9-10 olarak gözlenmiştir. Hg²⁺, PMSF, SDS, Tween 80 ve Tween 20 lipaz aktivitesini inhibe ederken; Ca²⁺ tuzları ve Triton X-100 lipaz aktivitesini arttırmıştır. Lipaz aktivitesi, bütanol hariç organik çözücüler varlığında stabil kalmıştır. *p*-nitrofenil kaproata (C10) karşı en yüksek aktivite ile lipaz, C6–C10 *p*-nitrofenil esterlerine belirgin bir ilgi göstermiştir. Hem asidik ve alkalin pH’lar ile yüksek sıcaklıklardaki hem de organik çözücülerdeki kararlılığı ile lipaz, susuz biyokataliz uygulamaları için iyi bir aday olarak gösterilmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan çeşitli kimyasallar MERCK A. G. (Darmstadt, Almanya), SIGMA Chem. Co. (St. Louis, ABD), Riedel-de Haën (Hannover, Almanya), Bio-Rad (Kaliforniya, ABD) ve BDH (Ukrayna) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

- Hassas terazi (Denver instrument)
- Manyetik karıştırıcı (Chiltern hotplate magnetic stirrer HS31)
- İnkübatör (Salvis Lab Incucenter)
- Çalkalamalı inkübatör (Shel Lab Shaking Incubator)
- UV/ VIS Spektrofotometre (Shimadzu UV-1700 UV/VIS)
- pH-metre (HANNA pH300)
- Santrifüj (Sigma 8K10 ve Sigma 3K30)
- Otoklav (ALP)
- Çalkalamalı su banyosu (Clifton)
- Vorteks (Fisons WhirliMixer™)
- Otomatik mikropipet (Eppendorf Research)
- Diyaliz membranı (Spectra / Por 4 Membrane)
- Jel filtrasyon ve iyon değiştirme kromatografisi (Pharmacia Biopilot FPLC)
- Ultrafiltrasyon (Ultracel-3K Membrane-Amicon Ultra Centrifugal Filters)
- Elektroforez sistemi (Bio-Rad Protean IIXI Cell)
- Etüv (Memmert)
- Buzdolabı (Vestel No-frost)

3.3. *Bacillus megaterium* M22'den Lipaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması

3.3.1. *Bacillus megaterium* M22

Yapılan bu tez çalışmasında, Miraç Yılmaz'ın doktora çalışması kapsamında topraktan izole ettiği *Bacillus megaterium* M22 kullanılmıştır. Yılmaz, *Bacillus megaterium* M22'yi, pH değerini 7,96 olarak tespit ettiği Ankara-Ostim bölgesindeki topraktan izole etmiştir. Lipolitik aktivitesini ise, tribütirin agar besiyortamında $7,5 \pm 0,5$ (zon çapı, mm) olarak tayin etmiştir [Yılmaz, 2003a; Yılmaz ve ark., 2006].

3.3.2. *Bacillus megaterium* M22'nin çoğaltılması ve lipaz üretimi

Bacillus megaterium M22, 100 ml nutrient broth besiyeri (pH 7.0) içeren 500 ml'lik erlenlerde 37 °C, 24 saat ve 140 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde çoğaltılarak lipaz üretimi gerçekleştirilmiştir [Sekhon ve ark., 2005; Dutta ve Ray, 2009].

3.3.3. *Bacillus megaterium* M22'den lipaz enziminin saflaştırılması

Fermantasyon işleminden sonra hücre izolatları 5 000 x g'de yarım saat + 4 °C santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Çeşitli proteinler içeren ham ekstrakt örneği, % 70 konsantrasyondaki amonyum sülfat ile muamele edilerek proteinler agrege edilmiştir. Amonyum sülfat, ham ekstrakt örneğine yavaş yavaş karıştırılarak + 4 °C'de ilave edilmiştir [Ahmed ve ark., 2010]. Tuz tamamen çözüldükten sonra, dengelenmesi için konsantre çözelti + 4 °C'de gece boyu bekletilmiştir. Oluşan protein agregatları 20 000 x g, + 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Çöken proteinler, minimum hacimdeki pH 8,0, 50 mM Tris-HCl tamponu ile çözülerek alınmıştır. Tuzların ve diğer küçük iyonların uzaklaştırılması için, protein çözeltisi aynı tampon kullanılarak diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi, fazla miktardaki tampon içerisinde ve + 4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Diyaliz ortamı dengelendikten sonra, tampon değiştirilerek protein çözeltisi + 4 °C'de gece boyu diyalize bırakılmıştır. Diyaliz sonrası protein çözeltisi kromatografik teknikler için hazırdır. Ön saflaştırma işlemleri bu şekilde tamamlanan protein çözeltisi, DEAE-

selüloz anyon değiştirme kromatografisine (Resim 3.1) uygulanmıştır. pH 8,0, 50 mM Tris-HCl tamponu ile dengelenen (1,6 x 10 cm) ebatındaki DEAE-selüloz kolonuna 8 ml diyaliz örneği verilmiştir. Kolona bağlanan proteinler, 1 M NaCl ile elüe edilmiştir. Fraksiyonlar 3 ml/dak akış hızıyla, 4,5 ml'lik hacimlerde toplanmıştır. Tüm fraksiyonların 260 ve 280 nm'deki absorbands değerleri ölçülerek protein miktarları hesaplanmıştır. Fraksiyonların aktiviteleri ise, bölüm 3.4.2'de verilen yönteme göre bulunmuştur. Lipaz aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirilerek karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır [Chakraborty ve Raj, 2008b].



Resim 3.1. İyon-değiştirme ve jel filtrasyon kromatografilerinin kullanıldığı Pharmacia BioPilot FPLC

3.4. *Bacillus megaterium* M22'den Üretilen Lipaz Enziminin Protein Miktarının ve Aktivitesinin Belirlenmesi

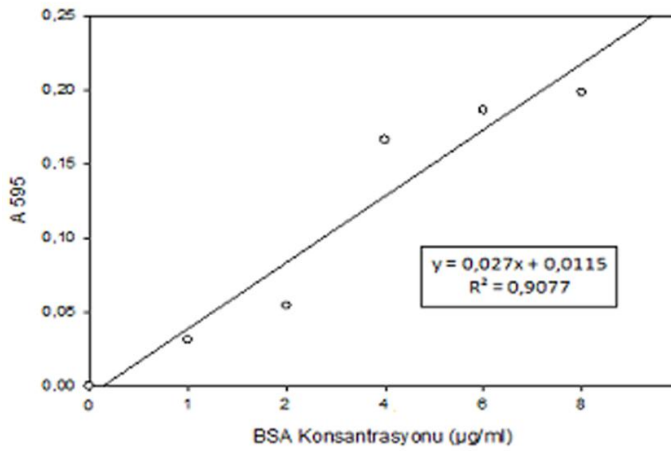
3.4.1. Protein miktar tayini

Lipaz enziminin saflaştırılmasında; ham ekstraktan kolondan çıkan örneklere kadar tüm basamaklarda protein miktar tayini 'Bradford' yöntemine göre yapılmıştır. 'Coomassie Brilliant Blue' boyar maddesinin proteinleri bağlaması temeline dayanan

[Bradford, 1976] bu yöntemde, standart olarak BSA kullanılmıştır. 0,2 mg/ml stok çözeltisi hazırlanan BSA çözeltisinden; 5, 10, 20, 30 ve 40 µl hacimler alınarak, saf su ve Coomassie reaktifi ile toplam hacim 1 ml'ye tamamlanmıştır (Çizelge 3.1). Oda sıcaklığında 2-30 dakika beklendikten sonra, 595 nm'de absorbans değerleri ölçülerek BSA standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.1). Protein miktarı tayin edilecek enzim örneği, Çizelge 3.1'de gösterilen hacimlerde saf su ve Coomassie reaktifi ile hazırlanarak aynı şekilde 595 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür [Yapaşan, 2008].

Çizelge 3.1. BSA standartları ve protein örneğinin hazırlanışı

Test Örneği	0,2 mg/ml BSA Stok Çözeltisi	Su Hacmi, µl	Coomassie Reaktifi Hacmi, µl
Kör	0	800	200
BSA Standart- 1µg/ml	5	795	200
BSA Standart- 2 µg/ml	10	790	200
BSA Standart- 4µg/ml	20	780	200
BSA Standart- 6 µg/ml	30	770	200
BSA Standart- 8 µg/ml	40	760	200
Protein Örneği	50	750	200



Şekil 3.1. BSA standart grafiği

Protein miktarı bilinmeyen enzim örneğinin, anlatıldığı şekilde 595 nm’de absorbans değeri ölçülmüş ve aşağıdaki eşitlik yardımıyla protein miktarı belirlenmiştir. Eşitlikteki eğim yerine, BSA standart grafiğinden elde edilen eğim kullanılmıştır.

$$\text{Protein miktarı (mg/ml)} = \frac{A_{595} / \text{eğim} \times \text{toplam hacim (ml)}}{\text{Protein örneğinin hacmi (ml)} \times 1000}$$

3.4.2. Lipaz enziminin aktivite tayini

Lipaz aktivite tayininde; substrat olarak p-nitrofenil laurat kullanılmış olup aktivite testi (modifiye edilmiş) ‘Winkler ve Stuckmann’ yöntemine göre yapılmıştır [Winkler ve Stuckmann, 1979]. Tampon ve substrat çözeltileri ayrı ayrı hazırlanıp birleştirilerek, enzim örneği ile reaksiyona girecek substrat karışımını oluşturmaktadır.

A çözeltisi: 90 ml pH 8,0, 50 mM Tris-HCl tamponu + 0,1 g Arap Sakızı + 0,5 ml Triton X-100

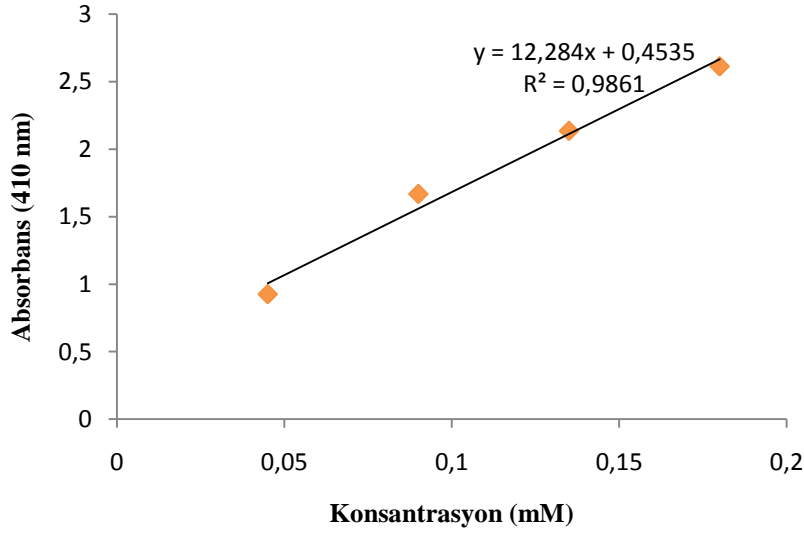
B çözeltisi: 10 mg p-nitrofenil laurat + 10 ml izopropil alkol

Ayrı ayrı karıştırılarak hazırlanan A ve B çözeltileri (9:1) birbirine eklenerek substrat çözeltisini oluşturmaktadır. 300 µl enzim örneğinin üzerine 2700 µl substrat çözeltisi ilave edilerek 37 °C’de, yarım saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için 750 µl 0,1 M Na₂CO₃ eklenmiştir. 410 nm’de absorbans değerleri ölçülerek aktivite hesabı yapılmıştır. Bir ünite lipaz birimi; 37 °C ve pH 8,0’da dakikada 1 µmol p-nitrofenol oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = \frac{A_{410} / \text{eğim} \times \text{toplam hacim (ml)}}{\text{Enzim hacmi (ml)} \times \text{inkübasyon süresi}}$$

p-nitrofenol standart grafiği

Lipaz katalizli reaksiyon sonucu oluşan p-nitrofenolün standart grafiği için; 50 mM, pH 8,0 Tris-HCl tamponu kullanılarak p-nitrofenolün 10 µmol/ml stok çözeltilisi hazırlanmıştır. Stok çözeltiliden 15, 30, 45 ve 60 µl alınarak aynı tamponla 3'er ml'ye tamamlanmıştır. Konsantrasyonu giderek artan örneklerin 410 nm'de absorbands değerleri ölçülerek p-nitrofenol standart grafiği çizilmiştir. Grafikten elde edilen eğim, absorpsiyon katsayısı olup lipazın aktivite hesabında kullanılmıştır.



şekil 3.2. p-nitrofenol standart grafiği

3.5. *Bacillus megaterium* M22'den Saflaştırılan Lipaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları

3.5.1. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin jel elektroforezi ile molekül kütesinin tayini

Bacillus megaterium M22'den, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütesinin tespiti ve saflık kontrolünün yapılması için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır.

Ayırma için % 10'luk poliakrilamid jeli uygun görülmüş olup hazırlanışı Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. % 10'luk poliakrilamid jelinin hazırlanışı (50 ml)

dH ₂ O	19,8 ml
% 30 poliakrilamid karışımı	16,7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	12,5 ml
% 10 SDS	0,5 ml
% 10 amonyum persülfat (APS)	0,5 ml
TEMED	0,02 ml

Hazırlanan jelde yürümesi istenen ham ekstrakt, diyaliz ve DEAE-selüloz kromatografisinden alınan örneklerin her birinden 500 µl alınarak, ultrafiltrasyon ile hepsi 50 µl'ye konsantre edilmiştir. Konsantre edilen örnekler, 25 µl denatürasyon çözeltisi (5 ml % 25 gliserol, 5 ml % 10 SDS, 5 ml merkaptoetanol, 2,5 ml pH 6,8 Tris-HCl tamponu, 12 ml H₂O, bromofenol mavisini) ile karıştırılıp kaynayan suda 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, örnekler ve 'marker'lar jeldeki kuyucuklara uygulanarak 350 volt, 200 miliamperde yürütülmüştür. Yürütme (running) tamponu ise 14,4 g glisin, 3 g tris ve 1 g SDS'nin 1 litre suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Örnekler yaklaşık 4 saat yürütüldükten sonra, jel elektroforez tankından çıkarılarak fiksasyon işlemine geçilmiştir (Bkz. Resim 3.2). Fiksasyon işlemi, Çizelge 3.3'de gösterilen şekilde yapılmıştır [Laemmli, 1970].

Çizelge 3.3. SDS-PAGE’de örneklerin gümüş boyama tekniği ile boyanma prosedürü

İşlemin Adı	Hazırlanışı	Süre
Fiksasyon	75 ml etanol + 18 ml asetik asit + 75 µl formaldehit dH ₂ O ile 150 ml’ye tamamlanmıştır.	Gece boyu çalkalayıcıda fikse edilmiştir.
Etanolle muamele	450 ml %50’lik etanol çözeltisi	20 dakika × 3 kere tekrarlanmıştır.
Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O muamelesi	30 mg Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O 150 ml suda çözünmüştür.	Jel 1 dakika çalkalanmıştır.
dH ₂ O	Damıtık su	2×20 saniye yıkanmıştır.
Gümüş boyama	300 mg AgNO ₃ + 112,5 µl formaldehit + 150 ml dH ₂ O	20 dakika
dH ₂ O	Damıtık su	2×20 saniye yıkanmıştır.
Geliştirme Fazı	9 g Na ₂ CO ₃ + tek kristal Na ₂ S ₂ O ₃ + 75 µl formaldehit dH ₂ O ile 150 ml’ye tamamlanmıştır.	Bantlar görülene dek çalkalanmıştır.
dH ₂ O	Damıtık su	2×2 dakika yıkanmıştır.
Durdurma Fazı	75 ml metanol + 18 ml asetik asit dH ₂ O ile 150 ml’ye tamamlanmıştır.	10 dakika.



Resim 3.2. SDS-PAGE'in basamakları

3.5.2. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin jel filtrasyon kromatografisine uygulanması

Amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz iyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılan lipaz enzimi, Süperdeks 75 (2,6 x 60 cm) jel filtrasyon kromatografisine uygulanmıştır. 50 mM, pH 8,0 Tris-HCl tamponuyla dengelenen kolonun akış hızı 3 ml/dak'dır. 4,5 ml'lik hacimlerde toplanan fraksiyonların lipaz aktiviteleri değerlendirilmiştir.

3.5.3. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 20, 30, 37, 40, 45, 50, 60 ve 70 °C'de enzim aktivitesine bakılmıştır. Sıcaklık stabilitesi için ise enzim örnekleri 50 mM, pH 8,0 Tris-HCl

tamponu ile (1:1) oranda 40 °C'de; 30, 60, 90 ve 120 dakika, 50 °C'de; 5, 10, 15 ve 20 dakika, 60 °C'de ise 5 ve 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kısım 3.4.2'de verilen yönteme göre enzim aktiviteleri ölçülerek kontrol numunesine göre kalan aktiviteler hesaplanmıştır.

3.5.4. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH'sının ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için, pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ve 10,0 değerlerinde enzim aktiviteleri incelenmiştir. 50 mM pH 4,0 ve 5,0 için sodyum asetat, pH 6,0 için potasyum fosfat, pH 7,0 ve 8,0 için Tris-HCl, pH 9,0 ve 10,0 için ise glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. pH stabilitesinin belirlenmesi için ise, enzim örnekleri (50 mM) pH 4,0-8,0 değerlerindeki farklı tamponlarla (1:1) oranda 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kısım 3.4.2'de verilen yönteme göre enzim aktiviteleri ölçülerek kontrol numunelerine göre kalan aktiviteler hesaplanmıştır.

3.5.5. Metal iyonlarının *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi

Metal iyonlarının lipaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için Sn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} ve Co^{2+} iyonlarının klorür tuzları ile ZnSO_4 'ın pH 8,0, 50 mM Tris-HCl tamponu ile 1 mM'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ve metal iyonları (1:1) oranda alınarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kısım 3.4.2'de verilen yönteme göre enzim aktiviteleri ölçülerek, kontrol numunesine göre bağıl aktiviteler hesaplanmıştır.

3.5.6. Organik çözücülerin *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi

Organik çözücülerin lipaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için etanol, aseton, DMSO, izopropil alkol, n-heptan, asetonitril, metanol, toluen, benzen ve klorobenzenin % 5 (v/v)'lik çözeltileri hazırlanarak (1:1) oranda enzim örneği ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kısım 3.4.2'de verilen yönteme göre enzim aktiviteleri ölçülerek kontrol numunesinin aktivitesine göre bağıl aktiviteler hesaplanmıştır.

3.5.7. Çeşitli reaktiflerin *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi

% 1 (w/v) SDS, % 1 (w/v) EDTA, % 1 (v/v) H₂O₂, % 1 (w/v) DTT, % 1 (w/v) PMSF, % 1 (v/v) Triton X-100 ve % 1 (v/v) Tween 80'nin 50 mM, pH 8,0 Tris-HCl tamponu ile belirtilen şekillerde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerle (1:1) oranda alınan enzim örnekleri 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kısım 3.4.2'de verilen yönteme göre lipaz aktiviteleri ölçülerek, kontrol numunesine göre bağıl aktiviteler hesaplanmıştır.

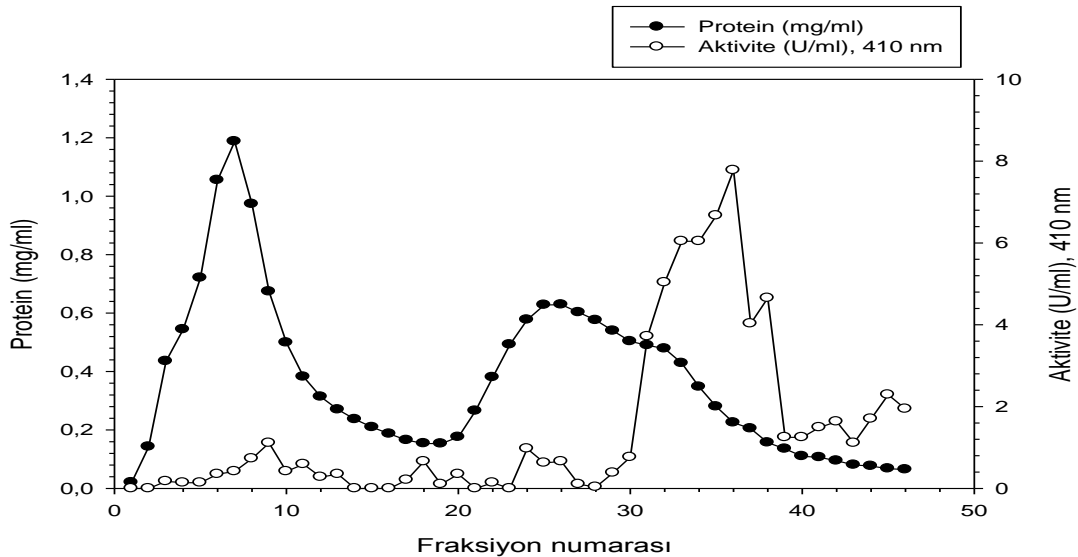
3.5.8. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin Michaelis-Menten kinetik sabitlerinin belirlenmesi

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin Michaelis-Menten kinetik sabitlerinin belirlenmesi için; substrat olarak kullanılan p-nitrofenil lauratın 0,0005, 0,001, 0,002 ve 0,004 g/ml hazırlanan çözeltileri, kısım 3.4.2'de belirtilen şekilde enzim örneği ile 10 dakika 37 °C çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda aktiviteler ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Çizilen grafikten Michaelis-Menten kinetik sabitleri olan Km ve Vmaks tespit edilmiştir.

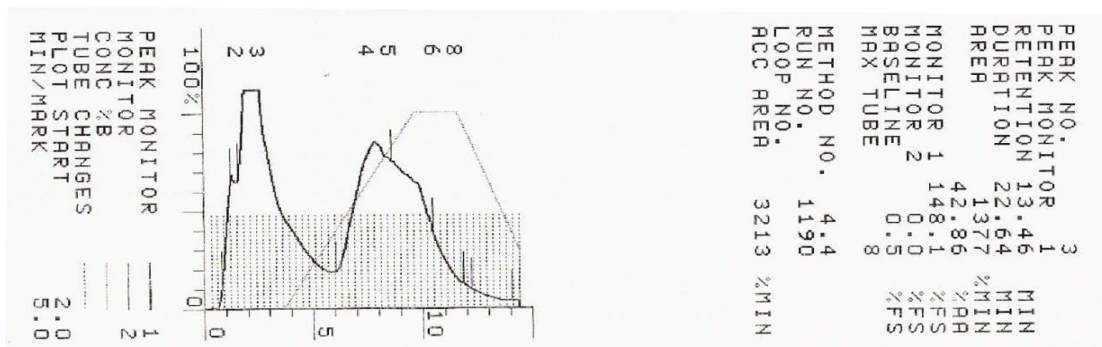
4. BULGULAR

4.1. *Bacillus megaterium* M22'den Saflaştırılan Lipaz Enzimi

DEAE-selüloz zayıf anyon değiştirme kromatografisinden toplanan fraksiyonların kısım 3.4.2'de gösterildiği gibi lipaz aktiviteleri ile; 280 ve 260 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek (*Warburg-Christian yöntemi*) protein miktarları hesaplanmıştır. Değerler Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Kolondan elde edilen kromatogram ise Resim 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. DEAE-selüloz kromatografisinden elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein miktarları



Resim 4.1. DEAE-selüloz kolonundan elde edilen kromatogram

Bacillus megaterium M22'den üretilen lipaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz zayıf anyon değiştirme kromatografisiyle % 34,42 verim ile 4 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Bacillus megaterium* M22'den üretilen lipaz enziminin saflaştırılma tablosu

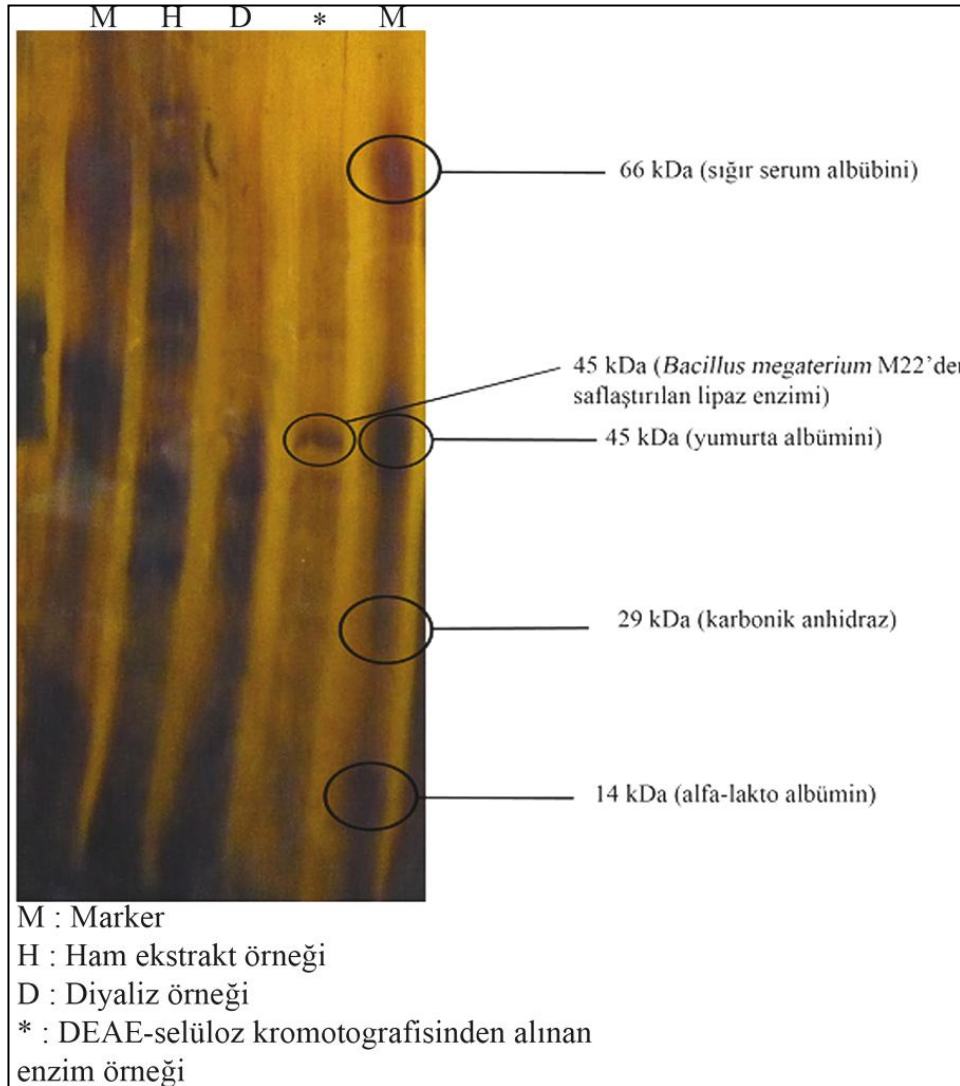
	Toplam Aktivite(U)	Toplam Protein(mg)	Spesifik Aktivite(U/mg)	Verim(%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	580,5	34,02	17,06	100	1
*DEAE-selüloz kromatografisi	199,8	2,92	68,42	34,42	4,01

*: Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen örnek sonrası

4.2. *Bacillus megaterium* M22'den Saflaştırılan Lipaz Enziminin Karakterizasyonu

4.2.1. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE ile tayin edilen molekül kütlesi

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesinin tespiti ve saflık kontrolü için bölüm 3.5.1'de gösterilen şekilde SDS-PAGE yapılmıştır. Literatür çalışmaları incelendiğinde lipaz için % 10'luk poliakrilamid jeli uygun görülmüştür. Resim 4.2'de görüldüğü gibi, SDS-PAGE'de *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesi 45 kDa olarak tespit edilmiştir.

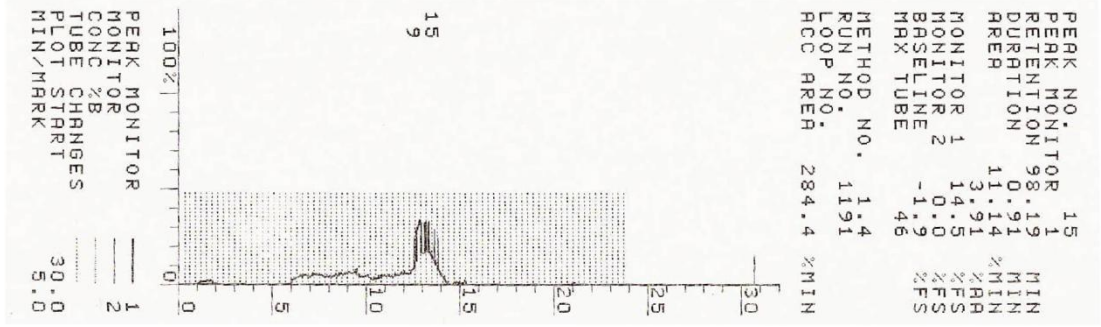


Resim 4.2. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE'de molekül kütlesinin tespiti

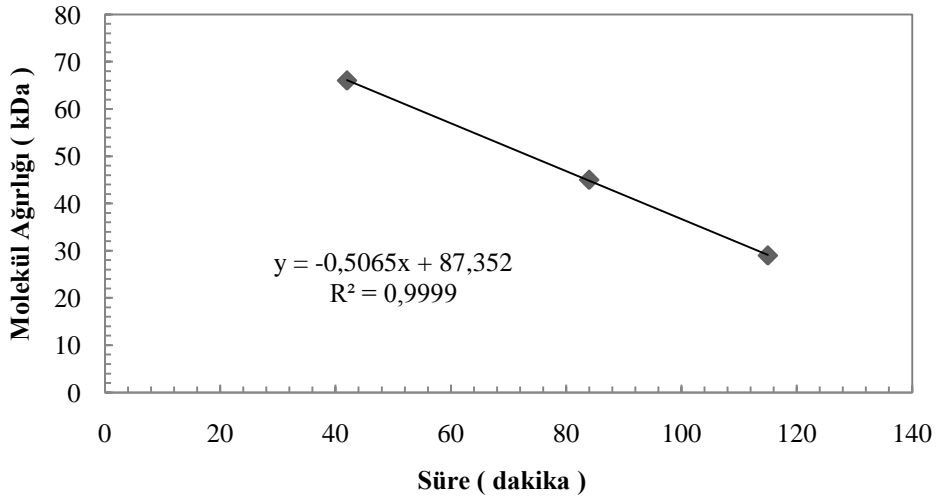
4.2.2. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesinin tespiti

DEAE-selüloz kolonundan toplanan aktif fraksiyonlar, 50 mM, pH 8,0 Tris-HCl tamponu ile dengelenen Süperdeks 75 (2,6 x 60 cm) jel filtrasyon kromatografisine uygulanmıştır. 3 ml/dak akış hızıyla, 4,5 ml'lik hacimlerde ayrılan fraksiyonların lipaz aktivitesine bakıldığında; aktivitenin birkaç tüpte dağıldığı gözlenmiştir. Bu sebeple, jel filtrasyon kromatografisi için hazırlanan standart grafikten (en yüksek

lipaz aktivitesinin gözlemlendiği fraksiyonların kolonda alıkonma sürelerine göre) lipaz enziminin molekül kütlesi 42 – 45 kDa arasında tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



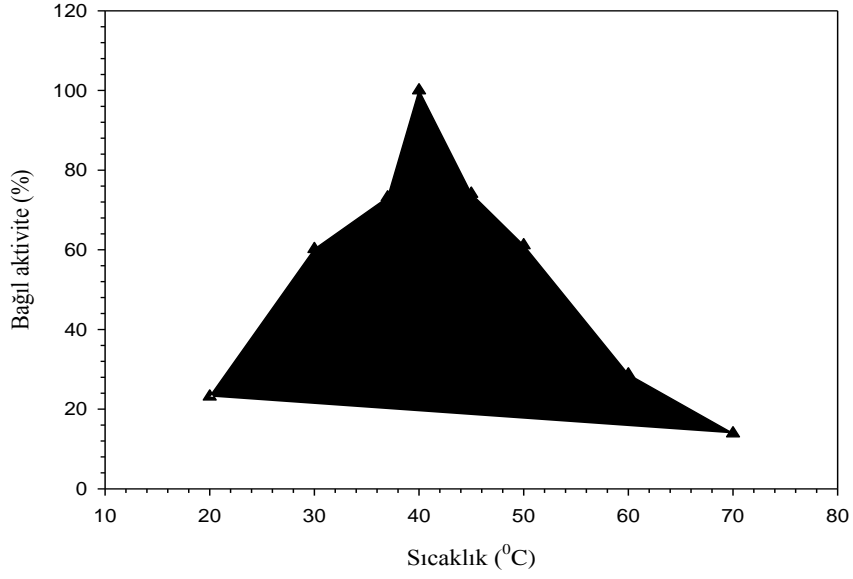
Resim 4.3. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin jel filtrasyon kromatogramı



Şekil 4.2. Süperdeks 75 kolonu için hazırlanan standart grafik

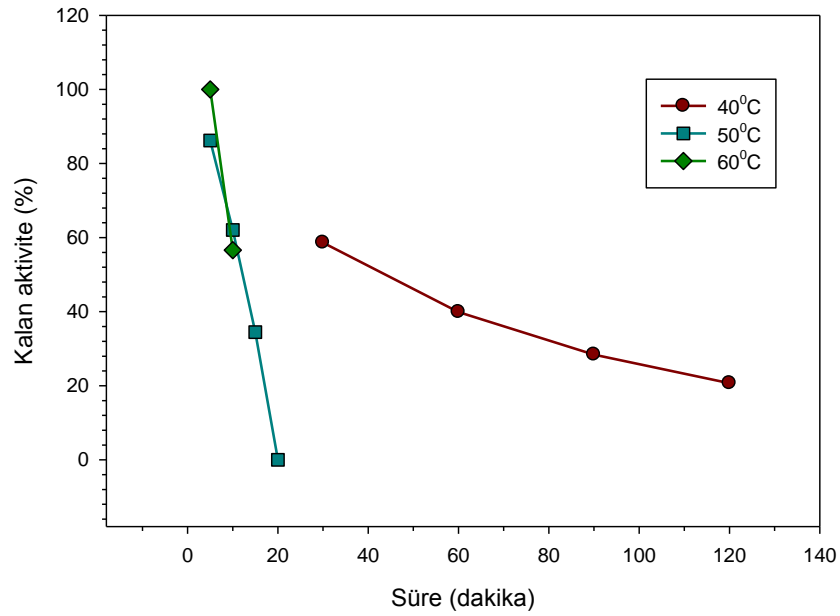
4.2.3. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığı ve sıcaklık stabilitesi

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığı 40 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin sıcaklık profili

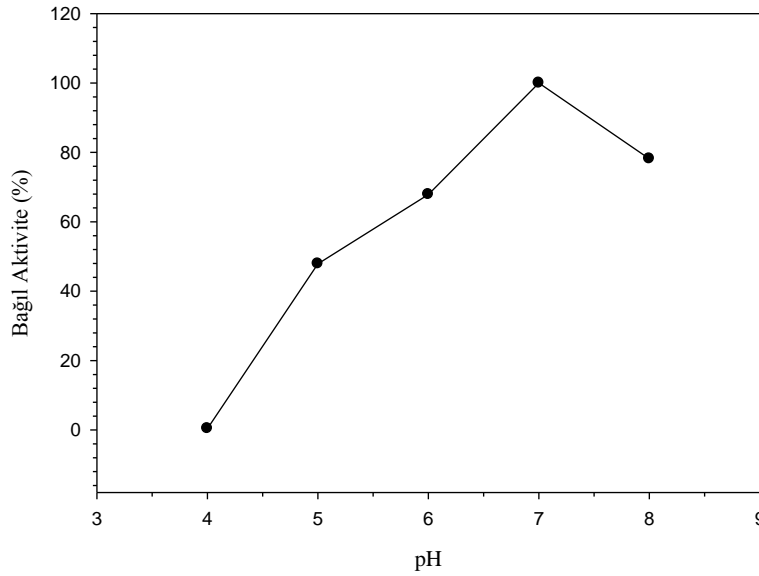
Lipaz enziminin sıcaklık stabilitesi için; 40 °C'de 30, 60, 90 ve 120 dakika inkübasyon, 50 °C'de 5, 10, 15 ve 20 dakika inkübasyon ve 60 °C'de ise 5 ve 10 dakika inkübasyondan sonra kalan aktivite sonuçları Şekil 4.4'deki gibidir.



Şekil 4.4. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin 40, 50 ve 60 °C'deki sıcaklık stabilitesi

4.2.4. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH'sı ve pH stabilitesi

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH'sı ve pH stabilitesinin belirlenmesi için 50 mM pH 4,0 ve 5,0 için sodyum asetat, pH 6,0 için potasyum fosfat, pH 7,0 ve 8,0 için Tris-HCl, pH 9,0 ve 10,0 için ise glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. Lipaz enziminin optimum pH'sı 7,0 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5). pH 4,0'da lipaz aktivitesi ihmal edilecek kadar düşük gözlenmiştir. pH 9,0 ve 10,0'da ise p-nitrofenil lauratın bozulması nedeniyle lipaz aktivitesi ölçülememiştir. pH stabilitesi için; 50 mM pH 5,0, 6,0, 7,0 ve 8,0 tamponları ve enzim örnekleri (1:1) oranda alınarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, kısım 3.4.2'de verilen yönteme göre lipaz aktivitelerine bakıldığında kontrol numunelerine göre aktivite kaybı gözlenmemiştir.

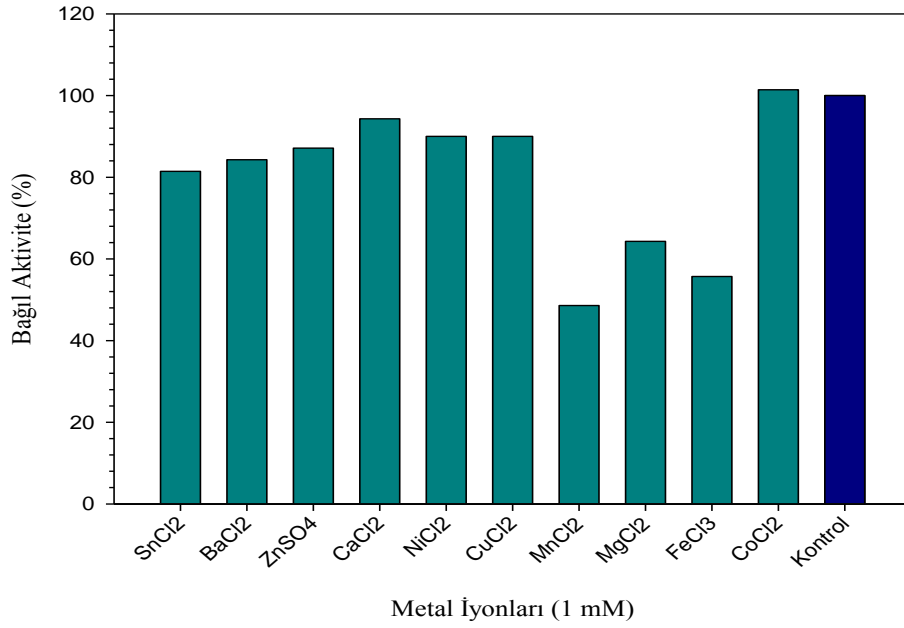


Şekil 4.5. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin pH profili

4.2.5. Metal iyonlarının *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi

Sn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} ve Zn^{2+} , yi içeren çeşitli metal iyonları pH 8,0 Tris-HCl tamponu ile 1 mM konsantrasyonda hazırlanarak (1:1)

oranda enzim örneği ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kısım 3.4.2'deki yonteme göre lipaz aktiviteleri ölçülmüştür. Kontrol numunesine göre aktiviteler değerlendirildiğinde; Co^{2+} hariç kullanılan metallerin lipaz aktivitesini düşürdüğü gözlenmiştir. Sn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} lipaz aktivitesini kısmen azaltırken; Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Fe^{3+} daha fazla oranda azaltmıştır (Şekil 4.6).

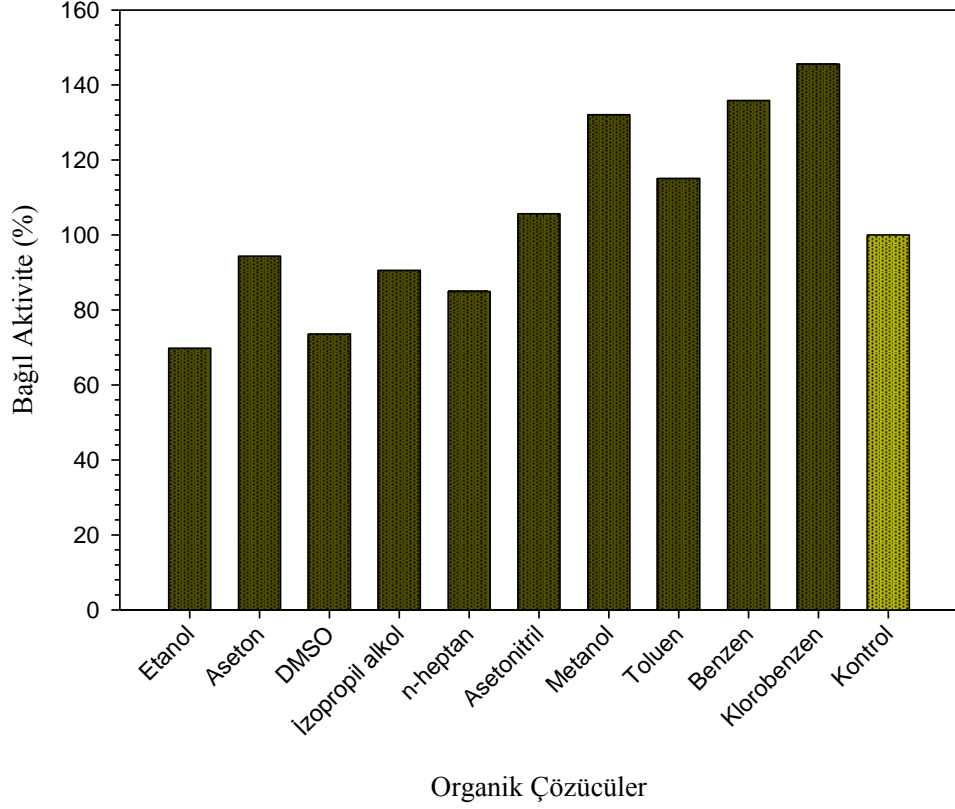


Şekil 4.6. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi

4.2.6. Organik çözücülerin *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi

% 5 (v/v)'lik hazırlanan çeşitli organik çözücüler (etanol, aseton, DMSO, izopropil alkol, n-heptan, asetonitril, metanol, toluen, benzen ve klorobenzen) enzim örneği ile (1:1) oranda alınarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra kısım 3.4.2'deki yonteme göre lipaz aktiviteleri ölçülmüştür. Kontrol numunesine göre aktiviteler incelendiğinde; başta klorobenzen, benzen ve metanol olmak üzere toluen ve

asetonitrilin lipaz aktivitesini arttırdığı, n-heptan, izopropil alkol, aseton, DMSO ve etanolün ise lipaz aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine organik çözücülerin etkisi

4.2.7. Çeşitli reaktiflerin *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi

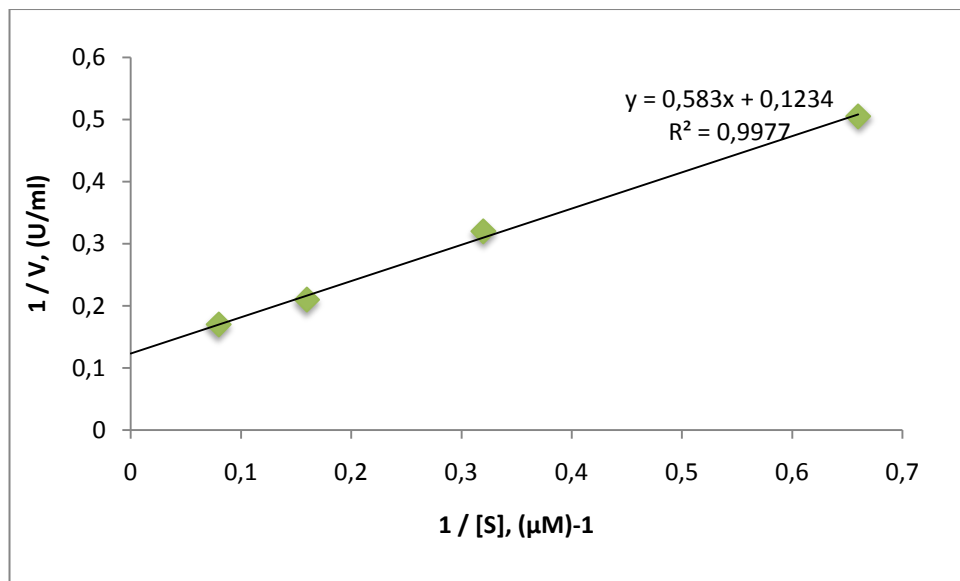
% 1 (w/v) SDS, % 1 (w/v) EDTA, % 1 (v/v) H₂O₂, % 1 (w/v) DTT, % 1 (w/v) PMSF, % 1 (v/v) Triton X-100 ve % 1 (v/v) Tween 80 çözeltilerinin enzim örnekleri ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmesinden sonra kısım 3.4.2'deki yöntemle göre lipaz aktiviteleri ölçüldüğünde kontrol numunesine göre bağıl aktiviteler Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. % 1 (v/v) H₂O₂ lipaz aktivitesini belirsiz bir şekilde arttırdığı için çizelgede yazılmamıştır.

Çizelge 4.2. Çeşitli reaktiflerin lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Reaktif	Bağıl aktivite (%)
Kontrol	100
SDS	71,7
EDTA	64,1
DTT	115,1
Triton X-100	75,5
Tween 80	83
PMSF	71,7

4.2.8. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin Michaelis-Menten kinetik sabitleri

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin Michaelis-Menten kinetik sabitleri olan K_m ve V_{maks} değerlerinin belirlenmesi için, kısım 3.5.8'de anlatılan şekilde Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Çizilen grafikten V_{maks} değeri 8,13 U/ml bulunurken, K_m değeri ise 4,74 μM olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin p-nitrofenil laurat kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Enzim saflaştırılmasının pek çok sebebi bulunmaktadır. Saflaştırılan enzim daha sonraki çalışmalar için gereklidir. Bu çalışmalar enzim aktivitesi, yapısı ya da yapı-işlev ilişkileri üzerinde olabilir. Bu çalışmaların gereksinimleri; ne kadar saflaştırılmış protein gerektiği, nasıl bir saflıkta olabilirliği, aktivite kaybının ne derece tolere edilebilirliği ve de enzim saflaştırma zamanı ve maliyeti üzerinde belirleyici olmaktadır. Örneğin, aktivite kaybı ile ilgili çalışmalar için az miktarda aktif enzime gereksinim varken, yüksek derecede bir saflık daha arka plandadır. Buna karşılık, yapısal çalışmalarda çok miktarda ileri derecede saflaştırılmış enzime ihtiyaç vardır, maliyet ve zaman ikincil öneme sahiptir. Yapı-işlev ilişkileri çalışmalarında ise yüksek aktivite daha önemlidir. Enzimlerin endüstrideki seri üretiminde de maliyet ve zaman, ekonomik nedenlerden dolayı çok daha önemli etkenler olabilmektedir. Özet olarak; saflaştırmanın amacı kullanılacak tekniklerin seçimini, sayısını ve sırasını belirlemektedir. Enzim, saflaştırma işlemleri boyunca her bir adımda bir miktar kayba uğrar. Bu nedenle, saflaştırma verimini arttırmak için en az sayıda saflaştırma adımı kullanılmalıdır. Buna karşılık, saflaştırma adımları en aza indirildiğinde ise enzimin saflaştırma derecesi azalacaktır [Eraslan ve ark., 2005].

Enzim saflaştırma çalışmalarında literatür kapsamlı olarak taranmalı, saflaştırılan kaynak ve enzim hakkında geniş bilgiye sahip olunmalıdır. Literatürde özellikle aynı kaynak ve enzim ile yapılan çalışmalarda uygulanan tekniklerin sonuçlarına göre bir yol izlenmelidir. Enzimlerin yapısını ve fonksiyonunu etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu yüzden doğru tekniklerle çalışmanın oturması, deneyerek öğrenilen uzun bir süreci gerektirmektedir. Enzim çalışmaları yüksek hassasiyet ve sabır gerektiren çalışmalardır. Beklenmedik durumlarla, yapılan çalışma baştan alınabilir; zaman, maliyet ve ürün kaybına sebep olabilmektedir.

Mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan enzimler için, mikroorganizmanın ilgilenilen enzimi en fazla ürettiği optimum koşullar (optimum sıcaklık, pH ve süre gibi) belirlenmelidir. Mikroorganizma, yeterli oranda çoğalmış olabilir ancak yeterli

miktarda enzim üretmeyebilir. Dolayısıyla, mikroorganizmanın çoğaltılmasında farklı besi ortamları denenmeli, gerekirse karbon, azot kaynakları gibi ilave kaynaklar kullanılmalıdır.

Enzimler, çeşitli faktörlerle denatürasyon, proteoliz ve bakteriyel kontaminasyona uğrayabilirler. Bu faktörlerin önlenmesi, saflaştırma işlemlerinin en önemli noktasıdır. Ekstrem pH, sıcaklık ve organik çözücüler denatürasyonun başlıca nedenleridir. Enzim için en uygun pH'daki tampon kullanılmalıdır. Kullanılacak tampon ve konsantrasyonu, yapılan deneyler sonucu belirlenmektedir. Yanlış tampon seçimi, saf olmayan herhangi bir reaktif ya da analizdeki herhangi bir yanlışlık, denatürasyon ve/veya inaktivasyona neden olmaktadır. Proteoliz, çalışmanın her aşamasında sorun oluşturabilecek bir etken olup aktivite kaybına sebep olmaktadır. Bunun için proteaz analizleri yapılarak, kullanılan tamponlara proteaz inhibitörleri karışımı ya da proteazın cinsi belirlenerek spesifik inhibitör ilave edilebilmektedir. Ayrıca, başlangıç basamaklarının hızlı ve düşük sıcaklıklarda (+ 4 °C gibi) yapılması proteolizi en aza indirmektedir. Deneylerde, beklenmedik bir yerde oluşan çökelti aktivite kaybına sebep olabilir. Bir çözelti içinde olağan bir çökelti olabilir, ancak çökelti kolon içinde oluşuyorsa bu olağan olarak karşılanmamaktadır. Çökelti, düşük pH veya düşük iyonik güçte bir tampon kullanılmasından kaynaklanabilir. Bu çökelti içinde kalan proteinler, kolaylıkla denatüre olur ve geri kazanılamamaktadır. Kullanılan tampon içinde enzimin bir inhibitörü mevcutsa, bu da aktivitede ani kayba neden olur. Eğer, aktivite kayıpları tüm bu nedenlerle açıklanamıyorsa, neden aktivatör ya da kofaktör kaybı olabilir. Kofaktör ve aktivatörler, saflaştırma sırasında diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisiyle enzimden ayrılabilirler. Bu durumda, fraksiyonların tekrar birleştirilmesiyle ya da örneğe kofaktör veya aktivatörü içeren çözelti ilavesiyle enzim aktivitesi geri kazanılmaktadır [Erarslan ve ark., 2005]. Ortamın ve kullanılan ekipmanların steril olması, özellikle başlangıç adımlarının + 4 °C'de gerçekleştirilmesi ve çalışmanın mümkün olduğunca hızlı ilerlemesi tüm bu etkenleri en aza indirecektir.

Yapılan bu tez çalışmasında; deneylerde farklı tekniklerin denenmesi, çeşitli faktörlerin enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için, maksimum verim ve

saflıkta enzim eldesi için ve bazen de aktivite kaybı gibi olumsuz etkiler sebebiyle tekrar tekrar bakteri ekimi yapılmıştır. Bir süre sonra bakterinin, aynı oranda aktif protein üretmediği gözlenmiştir. Önemli olan bakterinin ilgilenilen enzimi ne oranda ürettiği ve enzimin yeterli aktivite göstermesidir. İlk basamaklarda dikkat edilmesi gereken bu husus, sonradan oluşabilecek ürün, zaman ve maliyet kaybını önleyecektir.

Bacillus megaterium M22'den elde edilen lipaz enzimi; amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz zayıf anyon değiştirme kromatografisi, Q-sefaroze kuvvetli anyon değiştirme kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisine uygulanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi, iyonik gücün artırılması sonucu, protein moleküllerinin bir araya gelip kümeler oluşturarak çökmesi ilkesine dayanmaktadır. Amonyum sülfat gibi nötral tuzların ilavesiyle presipitasyon, proteinlerin fraksiyonlanarak çöktürülmesinde en çok kullanılan tekniktir. Bu çeşit tuzların, proteinleri denatürasyon, proteoliz ve bakteriyel kontaminasyona karşı kararlı kılması da önemli bir özelliktir. Dikkat edilmesi gereken nokta, amonyum sülfatın + 4 °C'de, yavaş yavaş sabit bir hızda karıştırılarak ve tuzun çözündükçe ilave edilmesidir. Hızlı karıştırmanın etkisiyle oluşan köpükler, proteinlerin denatürasyonuna sebep olmaktadır. Tuz tamamen çözündükten sonra çözeltinin dengelenmesi için 30-60 dakika daha düşük hızda karıştırmaya devam edilmelidir. Tuzlanan örnek, maksimum verim için gece boyu (+ 4 °C'de) bekletilmektedir. Çalışmada; amonyum sülfat ilavesinden hemen sonra, ilavenin ardından bir süre daha karıştırıldıktan sonra ve gece boyu bekletildikten sonra proteinler çöktürülerek enzim aktiviteleri değerlendirilmiş; gece boyu bekletilerek maksimum aktivite elde edildiği tespit edilmiştir. Amonyum sülfat konsantrasyonu ise; literatürdeki çalışmalar denenerek aktivite sonuçları incelendiğinde ve fazla tuz konsantrasyonunun bozucu etki yapabileceği göz önüne alındığında % 0 - 70 aralığı uygulanmıştır. Ayrıca, proteinlerin çöktürülmesiyle elde edilen süpernatantın (% 70 – 100 konsantrasyon aralığında kalan kısım) aktivitesi de kontrol edilmiş, çok az miktarda aktif enzim gözlenmiştir. Amonyum sülfat muamelesinden sonra diyaliz işlemi, tuzların ve diğer küçük moleküllerin uzaklaştırılması ve de proteinlerin konsantre edilmesi için gereklidir. Bu amaçla, ultrafiltrasyon teknikleri de uygulanabilmektedir. Diyaliz

işleminde moleküllerin geçişi, ortam dengelenene kadar devam eder. Kullanılan hacme ve membranın yapısına bağlı olarak genellikle 4-6 saatte dengeye ulaşılır. Bu süreden sonra tamponun değiştirilmesi diyaliz işleminin verimini arttırmaktadır. İstenilen ayırım sağlanıncaya kadar, tampon birkaç kez değiştirilerek diyaliz 1-2 gün sürdürülebilir [Güngör, 2008]. Kullanılan tampon hacmi ise, diyaliz örneğinin hacminin yaklaşık 100 katı gibi büyük hacimlerde alınmalıdır. Literatürde, amonyum sülfat çöktürmesinde % 50 – 60 [Sharma ve ark., 2002; Kumar ve ark., 2005] gibi orta verimler varken, % 80 – 90 [Chen ve ark., 2007; Nawani ve Kaur, 2007; Ahmed ve ark., 2010] gibi yüksek verimli çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmada, çöktürme işleminde yukarıda belirtilen hususlara dikkat edilmiştir. Ancak tuz ilavesiyle değişen pH, ortamın sıcaklığı, karıştırmadan dolayı az miktarda oluşan köpük, amonyum sülfatın az da olsa bozucu etkisi ya da herhangi bir faktörle proteinlerin denatüre olması bir miktar protein kaybının muhtemel nedenleridir. Çalışılan protein moleküllerinin % 0 – 70 aralığında ihmal edilecek düzeyde çok az bir kısmı çökmemiştir. Bu aralıkta istenmeyen diğer proteinlerin çökme durumu ise, verimi azaltan bir durumdur.

Amonyum sülfat çöktürmesiyle ön saflaştırma basamağı tamamlanan enzim örneği kromatografik bir ayırım için hazır hale gelmiştir. Enzim örneği, zayıf anyon değiştirme kromatografisi olan DEAE-selüloz kolonuna uygulanmıştır. Kolondan çıkan fraksiyonların protein miktarları ve aktiviteleri değerlendirilmiş, lipaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilmiştir. Lipaz enzimi, kolondan bağlanan kısımda geldiği için katyonik yapıdadır. *Bacillus megaterium* M22'den elde edilen lipaz enziminin DEAE-selüloz kromatografisiyle saflaştırılması sonucu; % 34,42 verim ile lipaz enzimi 4 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1). Literatürde yer alan benzer çalışmalar incelendiğinde; Kambourova ve ark. (2003), termofilik *Bacillus stearothermophilus* MC 7'den elde ettikleri ısıya-dayanımlı lipaz enzimini önce sefades jel filtrasyon kromatografisine uygulamış, sonra DEAE-selüloz iyon değiştirme kromatografisine uyguladığında, % 10,2 verim elde ederken lipazı 19,25 kat saflaştırmıştır. Kanwar ve ark. (2006), *Bacillus coagulans* MTCC-6375'den izole ettikleri metalolipazı, DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisiyle 75,3 kat saflaştırmıştır. Ghorri ve ark. (2011), tabakhane çöplüğünden izole ettikleri *Bacillus*

sp. türünden yeni bir lipaz enzimini, jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE-selüloz kromatografisiyle saflaştırarak karakterizasyon çalışmaları yapmıştır. Cai ve ark. (2009) ise, mezofilik bir *Geotrichum* sp. mantarından lipaz-A ve lipaz-B olmak üzere iki yeni soğuk-uyumlu lipaz enzimini, DEAE-selüloz ve jel filtrasyon kromatografileriyle % 20,4 verim ile saflaştırmıştır. Joseph (2006), *Bacillus sphaericus* MTCC 7526'dan ürettiği soğuk-uyumlu lipaz enzimini, DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisi ile 17,74 kat saflaştırarak % 4,7 verimle elde etmiştir. Joseph (2006), bir başka çalışmasında ise *Microbacterium phyllosphaerae* MTCC 7530'dan izole ettiği soğuk-uyumlu lipaz enzimini, DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisi kullanarak % 7,5 verim ile 22,03 kat saflaştırmıştır. Kumar ve ark. (2005), termofilik ve alkalifilik *Bacillus coagulans* BTS-3'den izole ettikleri lipaz enzimini DEAE-sefaroz kromatografisiyle % 2,5 verim ile 40 kat saflaştırmıştır. Chen ve ark. (2007), yeni izole edilen *Bacillus cereus* C71'den elde ettikleri enantiyoseçici lipazı, jel filtrasyon kromatografisinden sonra iki kez DEAE-sefaroz anyon değiştirme kromatografisine vermiş; % 36 verim ile 149,5 kat saflaştırmıştır. Lipazın saflaştırılmasında Amberlite IRA-410 (Cl⁻ formu) [Chakraborty ve Raj, 2009], Q-sefaroz [Sharma ve ark., 2002; Nawani ve ark., 2006], Mono Q HR [Hong ve Chang, 1998] gibi pek çok kuvvetli anyon değiştirme kromatografisi de kullanılmıştır. Bunlara ek olarak, CM-sefaroz [Kim ve ark., 2002; Lianghua ve Liming, 2005] ve CM-selüloz [Vujaklija ve ark., 2003] gibi katyonik iyon değiştirme kromatografisi uygulanan çalışmalar da bulunmaktadır. *Bacillus megaterium* M22'den üretilen lipaz enzimi, Q-sefaroz kuvvetli anyon değiştirme kromatografisine de uygulanmış, ancak büyük oranda aktivite kaybı gözlenmiştir. Bu durum, Q-sefaroz dolgu maddesinin *Bacillus megaterium* M22'den üretilen lipaz enzimi için uygun olmadığı veya kullanılan tamponun (pH 8,0, 50 mM Tris-HCl) bu dolgu maddesiyle bozucu bir etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.

DEAE-selüloz kromatografisiyle saflaştırılan lipaz enzimi, Süperdeks 75 (26 x 60) jel filtrasyon kromatografisine verilmiştir. DEAE-selüloz kromatografisinde lipaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilmiş; bir kısmı jel filtrasyon kromatografisine uygulanmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi, proteinlerin saflaştırılmaları ile birlikte molekül kütlelerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.

Yapılan bu çalışmada, jel filtrasyon kromatografisi sonucu aktivite kaybının fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple, karakterizasyon çalışmaları DEAE-selüloz kromatografisinden alınan örneklerle yapılmıştır.

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 45 kDa olarak tespit edilmiştir. DEAE-selüloz kromatografisinden alınan lipaz örneği Süperdeks 75 (2,6 x 60 cm) jel filtrasyon kromatografisine de uygulanmış; lipaz aktivitesinin birkaç fraksiyonda gözlenmesi sonucu lipaz enziminin molekül kütlesi 42 – 45 kDa arasında (çizilen standart grafik yardımıyla) bulunmuştur. Lipaz enziminin uygulanan jel filtrasyon kromatografisinde herhangi bir etki nedeniyle aktivitesi dağılmıştır. Ancak, SDS-PAGE'de uygulanan 'marker'ı oluşturan yumurta albümini (45 kDa) ile (DEAE-selüloz kromatografisinden alınan) lipaz enziminin jeldeki yerlerinin birebir örtüşmesi (Resim 4.2), lipaz enziminin molekül kütlesinin 45 kDa olduğunu göstermiştir. Bu sebeple, SDS-PAGE'in daha kesin bir sonuç verdiği gözlenmiştir. Sekhon ve ark. (2005), topraktan izole ettikleri *Bacillus megaterium* AKG-1'den saflaştırdıkları ısıya-dayanıklı lipazın molekül kütlesini yaklaşık 35 kDa olarak tespit etmişlerdir. Lima ve ark. (2004) ise, bozulmuş bir mantar kültüründen izole ettikleri *Bacillus megaterium* CCOC-P2637'den saflaştırdıkları lipazın molekül kütlesini 40 kDa olarak tespit etmiştir. *Bacillus* sp. türüyle yapılan diğer çalışmalara bakılırsa; termofilik bir *Bacillus* sp. J33 türünden saflaştırılan ısıya-dayanıklı lipazın molekül kütlesi 45 kDa [Nawani ve Kaur, 2000], yeni izole edilmiş *Bacillus cereus* C71'den saflaştırılan enantiyoseçici lipazın molekül kütlesi 42 kDa [Chen ve ark., 2007], termofilik *Bacillus thermoleovorans* ID-1'den saflaştırılan ısıya-dayanıklı lipazın molekül kütlesi 43 kDa [Lee ve ark., 2001], deniz yosunundan izole edilen *Bacillus circulans*'dan saflaştırılan lipazın molekül kütlesi 39,8 kDa [Chakraborty ve ark., 2010] olarak bildirilmiştir. *Bacillus* sp. türlerinden elde edilen lipazlardan; bildirilen en küçük molekül kütleli lipaz (*Bacillus thermoleovorans* CCR11) 11 kDa ('native' elektroforezde daha yüksek bir molekül kütlesi gözlense de) iken [Castro-Ochoa ve ark. 2005], bu sayı 103 kDa (*Bacillus coagulans* MTCC-6375)'a kadar çıkabilmektedir [Kanwar ve ark., 2006]. Diğer bakteri türlerinden saflaştırılan lipazlar düşünüldüğünde bu sayı daha da artabilmektedir. Diğer bakteri türlerinden

saflaştırılan lipazlar incelendiğinde; *Acinetobacter radioresistens* CMC-1'den izole edilen alkalen lipazın molekül kütlesi 45 kDa [Hong ve Chang, 1998], *Staphylococcus haemolyticus*'dan izole edilen lipazın molekül kütlesi 45 kDa [Oh ve ark., 1999] ve *Staphylococcus warneri*'den izole edilen lipaz 45 kDa molekül kütlesinde [Van Kampen ve ark., 2001] tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bakteriyel lipazların molekül kütleleri çeşitli büyüklüklerde olabilmektedir.

Lipazların aktivite tayinlerinde substrat olarak kullanılan uzun zincirli p-nitrofenil esterleri ($C \geq 12$) suda çözünmediği için, bu substratları çözmek için çeşitli organik çözücüler kullanılmaktadır. Genellikle izopropil alkol [Winkler ve Stuckmann, 1979; Kordel ve ark., 1991; Kumar ve ark., 2005; Chakraborty ve Raj, 2009; Madan ve Mishra, 2010; Riaz ve ark., 2010], etanol [Castro-Ochoa ve ark., 2005; Sekhon ve ark., 2005; Ooi ve ark., 2009] ve DMSO [Amara ve Salem, 2009] başta olmak üzere çeşitli organik çözücüler kullanılmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında; daha yüksek aktivite elde edildiği için lipazın aktivite tayininde izopropil alkol tercih edilmiştir.

Özellikle uzun zincirli p-nitrofenil esterlerinin suda çözünmemesi, lipazın spektrofotometrik tayininde bazı sorunlar oluşturmaktadır. Aktivite tayininde genellikle spektrofotometrik ölçümü engelleyen bir bulanık çözelti meydana gelmektedir. Bu bulanıklık, uzun zincirli p-nitrofenil esterlerinin suda çözünmemesi ve/veya reaksiyon sonunda açığa çıkan yağ asitlerinin suda çözünmemesinden kaynaklanmaktadır [Gupta ve ark., 2002]. Reaksiyon çözeltisinden bu bulanıklığın kaldırılması mecburi olup, bu amaçla genellikle CaCl_2 [Chakraborty ve Raj, 2008a; Chakraborty ve Raj, 2009; Dutta ve Ray, 2009], sodyum deoksikolat [Rajmohan ve ark., 2002], arap sakızı [Lee ve ark., 2001], Triton-X [Gupta ve ark., 2002; Ooi ve ark., 2009], Tween 20 [Amara ve Salem, 2009] vb. maddelerinden biri veya Triton X-100 ve arap sakızı [Kordel ve ark., 1991; Lianghua ve Liming, 2005; Ertuğrul ve ark., 2007; Saraç ve ark., 2008; Madan ve Mishra, 2010], sodyum deoksikolat ve arap sakızı [Winkler ve Stuckmann, 1979; Gupta ve ark. 2002; Zhang ve ark., 2008], CaCl_2 ve arap sakızı [Kim ve ark., 2002; Ahmed ve ark., 2010], CaCl_2 ve Triton X-100 [Chakraborty ve Raj, 2008b], sodyum deoksikolat ve CaCl_2 [Bouaziz ve ark., 2011] vb. birlikte kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışmada, Triton X-100 ve arap

sakızı tercih edilmiştir. Belirtilen bu maddeler, aktivite tayininde kullanılan tamponla karıştırılmaktadır. Ancak, bazı çalışmalarda inkübasyon sonunda reaksiyon çözeltisine de konulabilmektedir.

Bakteriyel lipazlar, (daha düşük veya daha yüksek sıcaklık aralığı da bildirilmekle beraber) genellikle 30 – 60 °C arasında optimum sıcaklığa sahiptir [Gupta ve ark., 2004]. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığı 40 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde; *Bacillus licheniformis* RSP-09'dan elde edilen rekombinant lipazın optimum sıcaklığı 40 °C [Madan ve Mishra, 2009], *Acinetobacter radioresistens* CMC-1'den saflaştırılan alkalin lipazın optimum sıcaklığı 40 °C [Hong ve Chang, 1998], *Bacillus licheniformis* MTCC 6824'den izole edilen alkalin metalolipazın optimum sıcaklığı 45 °C [Chakraborty ve Raj, 2008a], *Bacillus coagulans* MTCC-6375'den üretilen ısıya-dayanıklı metalolipazın optimum sıcaklığı 45 °C [Kanwar ve ark., 2006] olarak tespit edilmiştir. Başta *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerinden olmak üzere çok sayıda ısıya-dayanıklı lipaz izole edilmekte ve çalışılmaktadır [Sangeetha ve ark., 2011]. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin 40, 50 ve 60 °C'deki stabilitelere bakılmıştır. 40 °C'de bir saat sonunda aktivitenin % 40'ı, iki saat sonunda ise yaklaşık % 21'i korunmuştur. 50 °C'de 10 dakika sonunda aktivitenin % 62'si korunurken, 20 dakika sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. 60 °C'de ise 5 dakika sonunda aktivite tamamen korunurken, 10 dakika sonunda % 56,6'sı korunmuştur (Şekil 4.4). Diğer çalışmalar incelendiğinde; saflaştırılan lipaz enziminin ısıl dayanıklılığı çok iyi gözükmemektedir, ancak *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi ısıya-dayanıklı olmadığı için aktivite kayıpları normal görülmektedir.

Bakteriyel lipazlar, birkaç asidik lipaz dışında genellikle nötral veya alkali pH değerlerinde optimum aktivite göstermektedir [Gupta ve ark., 2004; Lima ve ark., 2004]. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH'sı 7,0 olarak tespit edilmiştir. pH 4,0'da lipaz aktivitesi ihmal edilecek kadar düşük gözlenmiştir. pH 9,0 ve 10,0'da ise substrat olarak kullanılan p-nitrofenil lauratın bozulması nedeniyle lipaz aktivitesi ölçülemediği için. Bu pH değerlerinde substratın

bozulması, ürün oluşumunun önüne geçmiştir. Dolayısıyla, pH 5,0 – 8,0 aralığında lipaz enziminin pH stabilitesine bakılmış; 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon sonunda aktivite kaybı gözlenmemiştir. Sonuç olarak, saflaştırılan enzimin nötral bir lipaz olduğu tespit edilmiştir.

Organik çözücüler, substratların çözünürlüğünün artmasına, ürünlerin kolayca geri kazanılmasına ve sentetik reaksiyonlarda değişken dengeyi ileri yönde gitmesine yardımcı olmaktadır [Zhang ve ark., 2009a, b]. Organik çözücülerde stabilite, lipazların düşük su oranı içeren sistemlerde gerçekleştirilen sentez reaksiyonlarında kullanımında istenen önemli bir özelliktir [Lima ve ark., 2004]. Organik çözücülere dayanıklı-lipazlar biyopolimerlerin sentezinde, transesterifikasyon reaksiyonlarında ve biyodizel üretiminde etkili katalizörler olarak rol oynamaktadır [Dizge ve ark., 2009; Singh ve ark., 2010]. Hidrofilik çözücüler; genellikle enzimatik aktivite ile uyumsuzdur, bunun nedeni enzimlerin yüzey alanından su tabakasına olan çözünmeyi zorlaştırmalarıdır. Bu durum, proteinlerin kararlılığının bozulmasına ve yüksek denatürasyon oranlarına sebep olabilmektedir [Lima ve ark., 2004]. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi % 5 (v/v)'lik hazırlanan çeşitli organik çözücülerle oda sıcaklığında bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Hidrofilik çözücülerle lipaz enziminin aktivitesi kısmen azalmıştır. Ancak, ilginç olarak hidrofilik çözücüler olan asetonitril ile aktivite % 5,6, metanol ile ise % 32 oranında artmıştır. Hidrofobik çözücü molekülleri; inkübasyon sonrasında reaksiyona girerek enzimin katalitik bölgesini kaplayan kapakta bulunan hidrofobik aminoasit kalıntılarıyla etkileşir. Böylece, lipaz enziminin aktif olduğu açık konformasyonunda kalması sağlanarak aktivite artmaktadır [Lima ve ark., 2004]. Hidrofobik çözücüler olan klorobenzen ile lipaz aktivitesi % 45, benzen ile % 36, toluen ile % 15 oranında artmıştır (Şekil 4.7). n-heptan hidrofobik bir çözücü olmasına rağmen lipaz aktivitesini % 15 azaltmıştır. Sonuç olarak; lipaz enzimi klorobenzen, benzen, toluen, metanol ve asetonitril ile daha uzun sürelerde veya bu çözücülerle daha yüksek yüzdelerde inkübasyona bırakılarak aktiviteleri değerlendirilebilir ve özellikle sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği incelenebilir.

Lipaz aktivitesi için genellikle kofaktörler gerekmemektedir, fakat kalsiyum gibi divalent katyonlar çoğu kez enzim aktivitesini uyarmaktadır. Bu etki, bu metallerin enzime bağlanmasıyla yüklenen yapısal değişikliklerle (Bkz. sayfa 11) ve uzun zincirli yağ asitlerinin metal tuzlarıyla olan konumuyla ilişkilendirilmektedir [Gupta ve ark., 2004; Sangeetha ve ark., 2011]. Bununla birlikte, kalsiyum gibi metallerle inhibe olan mikrobiyal lipazlar da bildirilmiştir. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin çeşitli metallerle (1 mM) inkübasyonu sonucu, Co^{2+} metali hariç diğer metallerle aktivitesi azalmıştır (Şekil 4.6). Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Fe^{3+} , lipaz enzimini diğer metallere göre daha fazla inhibe etmiştir. Bu sonuçlardan; saflaştırılan lipaz enziminin metallere karşı stabil olmadığı ve metal-bağımlı bir enzim olmadığı söylenebilir.

Yüzey aktif maddeleri, su-yağ arayüzeyini genişleterek lipoliz oranını arttırmaktadır. Bununla birlikte; bu durum tüm yüzey aktif maddeleri için geçerli olmayıp, konsantrasyonlarına bağlı olarak etkileri değişmektedir. Non-iyonik yüzey aktif maddeleri olan % 1 (v/v) Triton X-100 ve Tween 80 ile anyonik yüzey aktif maddesi % 1 (w/v) SDS, *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimini kısmen inhibe etmiştir (Çizelge 4.2). Mikrobiyal lipazlar genellikle sülfidril proteinler değildir; dolayısıyla çoğu lipazın katalitik aktivitesi için ne serbest -SH ne de S-S köprüleri önemlidir [Gupta ve ark., 2004]. Disülfür bağlarını parçalayan DTT'nin, *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesini azaltmaması, lipazın katalitik bölgesinde disülfür bağı içermediğini göstermiştir. % 1 (w/v)'lik kullanılan (metal şelatörü) EDTA lipaz enzimini kısmen inhibe etmiştir. Bu durum, metallerle yapılan deney sonuçlarını da destekleyerek lipazın metal-bağımlı bir enzim olmadığını göstermesi bakımından önemlidir. Lipazlar, Ser-His-Asp/Glu katalitik üçlüsü ile serin hidrolazlar sınıfına aittir. Dolayısıyla, serin inhibitörleri lipazlar için potansiyel tersinmez aktif-bölge inhibitörleridir. Bununla birlikte, serin inhibitörüyle inhibe olmayan lipazlar da bildirilmiştir [Gupta ve ark., 2004]. *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enzimi, serin inhibitörü olan PMSF (% 1 (w/v)'lik) ile kısmen inhibe olmuştur (Çizelge 4.2). PMSF, serin proteaz enziminin spesifik inhibitörü olup, lipazlara karşı konsantrasyonuna bağlı olarak etkisi

değişebilmektedir. Yükseltgen bir reaktif olan H_2O_2 [% 1 (v/v)]'nin ise, değişken bir şekilde lipaz enziminin aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir.

Bacillus megaterium M22'den saflaştırılan lipaz enziminin Michaelis-Menten kinetik sabitleri olan K_m ve V_{maks} değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmıştır. Çizilen grafikten V_{maks} değeri 8,13 U/ml bulunurken, K_m değeri ise 4,74 μM olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Substrat olarak p-nitrofenil lauratın 0,0005, 0,001, 0,002 ve 0,004 g/ml hazırlanan çözeltileri kullanılmıştır. K_m ve V_{maks} , enzimin substrata olan ilgisini gösteren spesifik parametrelerdir. K_m , V_{maks} 'ın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonudur; değerinin küçük olması enzimin substrata olan ilgisinin fazla olduğunu gösterir. p-nitrofenil laurat ile yapılan çalışmalar incelendiğinde; *Bacillus* türünden saflaştırılmış ısıya-dayanımlı lipazın K_m değeri 0,5 mM [Nawani ve ark., 2006], termofilik bir *Bacillus* türünden saflaştırılmış lipazın K_m 'si 0,19 mM [Nawani ve Kaur, 2007] ve yine bir *Bacillus* türünden saflaştırılmış lipazın K_m 'si 0,31 mM [Ghori ve ark., 2011] olarak bildirilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında; *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin K_m değeri 0,004 mM olduğu için p-nitrofenil laurata olan ilgisinin daha fazla olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

Aguilar, C. N., Torres, E. F., Gonzalez, G. V., Augur, C., “Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 102: 407-414 (2002).

Ahmed, E. T., Raghavendra, T., Madamwar, A. D., “Thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: Characterization, partial purification and application in organic synthesis”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 2102-2113 (2009).

Ahmed, E. T., Raghavendra, T., Madamwar, A. D., “An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis”, *Bioresource Technology*, 101: 3628–3634 (2010).

Akbari, N., Khajeh, K., Rezaie, S., Mirdamadi, S., Shavandi, M., Ghaemi, N., “High-level expression of lipase in *Escherichia coli* and recovery of active recombinant enzyme through in vitro refolding”, *Protein Expr. Purif.*, 70: 75-80 (2010).

Al-Zuhair, S., Dowaidar, A., Kamal, H., “Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase”, *Biochemical Engineering Journal*, 44 (2-3): 256-262 (2009).

Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F., Dogru, M., “Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 136: 183-92 (2007).

Amara, A. A., Salem, S. R., “Degradation of Castor Oil and Lipase Production by *Pseudomonas aeruginosa*”, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5 (4): 556-563 (2009).

Angkawidjaja, C., Kanaya, S., “Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 2804–2817 (2006).

Anonim, “Enzyme Nomenclature, Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB)”, California (1992).

Arpigny, J. L., Jaeger, K. E., “Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties” *Biochem. J.*, 343: 177-183 (1999).

Arroyo, M., Sinisterra, J. V., “Influence of chiral corvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*”, *Biotechnol. Lett.*, 17: 525–30 (1995).

Babu, I. S., Rao, G. H., “Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589”, *Res. J. Microbiol.*, 2: 88-93 (2007).

Baysal, Z., Alkan, M. H., Uyar, F., Doğru, M., “Kavun kabuğu kullanarak katı-faz fermantasyon tekniği ile termotoleran *Bacillus coagulans*'dan lipaz enzimi üretimi”, **XIX. Kimya Kongresi**, Kuşadası, Aydın, 501 (2005).

Bayşu Sözbilir, N., Bayşu, N., “Biyokimya”, **Öncü Basımevi**, Ankara, 284 (2008).

Berglund, P., Hutt, K., “Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases”, In: Patel, R. N., **Stereoselective biocatalysis**, New York: Marcel Dekker (2000).

Boekema, B. K. H. L., Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., Rosenau, F., Jaeger, K. E., Tommassen, J., “Hexadecane and Tween 80 Stimulate Lipase Production in *Burkholderia glumae* by Different Mechanisms”, **Applied and environmental microbiology**, 73 (12): 3838–3844 (2007).

Bornscheuer, U. T., “Enzymes in lipid modification”, **Weinheim: Wiley-VCH** (2000).

Bouaziz, A., Horchani, H., Salem, N. B., Gargouri, Y., Sayari, A., “Expression, purification of a novel alkaline *Staphylococcus xylosus* lipase acting at high temperature”, **Biochemical Engineering Journal**, 54 (2): 93-102 (2011).

Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, **Analytical Biochemistry**, 72(1-2), 248-254 (1976).

Brocher H., Holf, F., “Lipases”, **Biochim. Biophys. Acta**, 212-92 (1979).

Buisman, G. J. H., Helteren, van C. T. W., Kramer, G. F. H., Veldsink, J. W., Derksen, J. T. P., Cuperus, F. P., “Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants”, **Biotechnol. Lett.**, 20: 131-136 (1998).

Buist, G., Ridder, A. N. J. A., Kok, J., Kuipers, O. P., “Different subcellular locations of secretome components of Gram-positive bacteria”, **Microbiology**, 152: 2867–2874 (2006).

Cai, Y., Wang, L., Liao, X., Ding, Y., Sun, J., “Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3”, **Process Biochemistry**, 44: 786–790 (2009).

Cao, X., Yang, J., Shu, L., Yu, B., Yan, Y., “A improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues”, **Process Biochem.**, 44: 177-182 (2009).

Cardenas, J., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Valmaseda, M., Elson, S. W., Sinisterra, J. V., “Screening and catalytic activity in

organic synthesis of novel fungal and yeast lipases”, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 14: 111–23 (2001).

Castro-Ochoa, L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R. O.,” Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11”, *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (6): 648-654 (2005).

Chakraborty, K., Raj, R. P., “An extra-cellular alkaline metallo-lipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization”, *Food Chemistry*, 109: 727–736 (2008a).

Chakraborty, K., Raj, R. P., “Enrichment of Eicosapentaenoic Acid from Sardine Oil with Δ 5-Olefinic Bond Specific Lipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824”, *J. Agric. Food Chem.*, 56: 1428–1433 (2008b).

Chakraborty, K., Raj, R. P., “Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MTCC 2421”, *J. Agric. Food Chem.*, 57: 3859–3866 (2009).

Chakraborty, K., Vijayagopal, P., Chakraborty, R. D., Vijayan, K. K., “Preparation of eicosapentaenoic acid concentrates from sardine oil by *Bacillus circulans* lipase”, *Food Chemistry*, 120 (2): 433-442 (2010).

Chaplin, J. A., Gardiner, N., Mitra, R. K., Parkinson, C. J., Portwig, M., Mboniswa, B. A., Evans-Dickson, M. D., Brady, D., Marais, S. F., Reddy, S., “Process for preparing (-) menthol and similar compounds”, *United States Patent 7026144*, <http://www.freepatentsonline.com> (2006).

Chatterjee, T., Chatterjee, B. K., Bhattacharyya, D. K., “Study of lipase-catalyzed hydrolysis of some monoterpene esters”, *Can. J. Microbiol.*, 47: 397–403 (2001).

Cheirsilp, B., Jeamjounkhaw, P., H-Kittikun, A., “Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (1-3): 206-211 (2009).

Chen, H. P., Hsiao, K. F., Wu, S. H., Wang, K. T., “Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*”, *Biotechnol. Lett.*, 17: 305–8 (1995).

Chen, S., Qian, L., Shi, B., “Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71”, *Process Biochemistry*, 42: 988–994 (2007).

Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., Wang, X., “Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor”, *Energy Convers. Manage.*, 50: 668-673 (2009).

Choo, D. W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., Esaki, N., “A Cold-Adapted Lipase of an Alaskan Psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization”, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2): 486–491 (1998).

Choo, W. S., Birch, E. J., “Radical scavenging activity of lipophilized products from lipase-catalyzed transesterification of triolein with cinnamic and ferulic acids”, *Lipids*, 44: 145-152 (2009).

Colman, M. H., Macrae, A. R., “Fat process and composition”, *UK Patent No. 1577933* (1980).

Çadırcı, B. H., Yasa, İ., “An organic solvent tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21”, *J. Mol. Catal. B. Enz.*, 64: 155-167 (2009).

David, F., Berger, A., Hänsch, R., Rohde, M., Franco-Lara, E., “Single cell analysis applied to antibody fragment production with *Bacillus megaterium*: development of advanced physiology and bioprocess state estimation tools”, *Microbial Cell Factories*, 10 (23): 1-15 (2011).

De Pascale, D., Cusano, A. M., Autore, F., Parrilli, E., Prisco, Di G., Marino, G., Tutino, M. L., “The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family”, *Extremophiles*, 12: 311–323 (2008).

Devi, B. L. A. P., Guo, Z., Xu, X., “Characterization of Cross-Linked Lipase Aggregates”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86 (7): 637-642 (2009).

Divakar, S., Manohar, B., “Use of Lipases in Industrial Production of Esters”, *Industrial Enzymes ‘Structure Function and Applications’*, Julio Polaina ve Andrew P. MacCabe, *Springer*, Spain, 283-300 (2007).

Dizge, N., Aydın, C., İmer, D. Y., Bayramoğlu, M., Tanrıseven, A., Keskinler, B., “Biodiesel production from sunflower, soybean and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer”, *Bioresource Technology*, 100 (6): 1983-1991 (2009).

Drumright, R. E., Gruber, P. R., Henton, D. E., “Polylactic acid technology”, *Adv. Mater.*, 12: 1841-1846 (2000).

Ducret, A., Trani, M., Lortie, R., “Lipase catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity”, *Enzyme Microb. Technol.*, 22: 212–6 (1998).

Dutta, S., Ray, L., “Production and Characterization of an Alkaline Thermostable Crude Lipase from an Isolated Strain of *Bacillus cereus* C7”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 159: 142–154 (2009).

Eggert, T., Pouderoyen, G. V., Pencreac’h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B. W., Jeager, K., “Biochemical properties and three dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*”, *Colloids Surfaces B.*, 26: 37-46 (2002).

Elibol, M., Yaşa, İ., Karaçancı, Ş., Çoban, I., Özsoy, G., “Zeytinyağı işletmeleri katı (prina) ve sıvı (karasu) atıklarından mikrobiyal lipaz üretimi”, *Tubitak*, Ankara, 10 (2008).

Erarslan, A., Kazan, D., Denizci, A. A., Coşkuner Öztürk, D., Karahan, N., “Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler, VIII. Uygulamalı Eğitim Kursu”, *Tubitak*, Kocaeli (2005).

Eren Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., “Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları”, *KSU. Journal of Science and Engineering*, 9 (1): 12-19 (2006).

Ertuğrul, S., Dönmez, G., Takaç, S., “Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity”, *Journal of Hazardous Materials*, 149: 720–724 (2007).

Faiz, Ö., “Yeni bir termofilik bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, hücre dışı lipaz/esteraz yeteneğinin incelenmesi ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon, 2-6 (2005).

Fickers, P., Ongena, M., Destain, J., Weekers, F., Thonart, P., “Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*”, *Enzyme Microb. Technol.*, 38: 756-759 (2006).

Fischer, M., Pleiss, J., “The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families”, *Nucleic Acids Research*, 31 (1): 319–321 (2003).

Franssen, M. C. R., Alessandrini, L., Terraneo, G., “Biocatalytic production of flavors and fragrances”, *Pure Appl. Chem.*, 77 (1): 273–279 (2005).

Furukawa, S., Ono, T., Ijima, H., Kawakami, K., “Effect of imprinting sol–gel immobilized lipase with chiral template substrates in esterification of (*R*)-(+)- and (*S*)-(–)-glycidol”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17 (1): 23-28 (2002).

Garcia-Arrazola, R., David, A., Guerrero, L., Gimeno, M., Barzana, E., “Lipase-catalyzed synthesis of poly-l-lactide using supercritical carbon dioxide”, *J. Supercritical Fluids.*, 51: 197-201 (2009).

Gaskin, D. J. H., Romojaro, A., Turner, N. A., Jenkins, J., Vultson, E. N., “Alteration of lipase chain length specificity in the hydrolysis of esters by random mutagenesis”, *Biotechnol. Bioeng.*, 73: 433–41 (2001).

Gerritse, G., Hommes, R. W., Quax, W. J., “Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain”, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2644–51 (1998).

Ghanem, E. H., Al-Sayed, H. A., Saleh, K. M., “An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (5): 459-464 (2000).

Ghori, M. I., Iqbal, M. J., Hameed, A., Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 22-29 (2011).

Gilham, D., Lehner, R., “Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro”, *Methods*, 36: 139-147 (2005).

Gunalakshmi, B., Sahu, M. K., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Sudha, S., Kannan, L., “Investigation on Lipase Producing *Actinomyces* Strain LE-11, Isolated from Shrimp Pond”, *Res. J. Microbiol.*, 3 (2): 73-81 (2008).

Gunasekaran, G., Kotay, S. M., Das, D., “Alkaline lipase production by *Citrobacter freundii* IIT-BT L139”, *Indian J. Exp. Biol.*, 44: 485-491 (2006).

Guncheva, M., Zhiryakova, D., Radchenkova, N., Kambourova, M., “Properties of immobilized lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. Acidolysis of triolein with caprylic acid”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 727-731 (2009).

Gupta, N., Rathi, P., Gupta, R., “Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases”, *Analytical Biochemistry*, 311: 98–99 (2002).

Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., “Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 763–781 (2004).

Güner, S., “Biyokimya I, Biyomoleküllerin yapısı ve işlevi”, *Karadeniz Teknik Üniversitesi yayınları*, Trabzon, 168 (2007).

Güngör, K., “Çağla badem (*Prunus Dulcis*) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya (2008).

Han, S., Back, J. H., Yoon, M. Y., Shin, P. K., Cheong, C. S., Sung, M. H., Hong, S. P., Chung, I. Y., Han, Y. S., “Expression and characterization of a novel

enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01”, **Biochem.**, 85: 501-510 (2003).

Hartmann, M., “Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis”, **Chem. Mater.**, 17 (18): 4577 – 4593 (2005).

Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., “ Industrial applications of microbial lipases”, **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 235–251 (2006).

Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., “Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review”, **Biotechnology Advances**, 27: 782–798 (2009).

He, P., Greenway, G., Haswell, S. J., “Development of a monolith based immobilized lipase micro-reactor for biocatalytic reactions in a biphasic mobile system”, **Process Biochem.**, 45: 593-597 (2010).

Hong, C. M., Chang, C. M., “Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1”, **Biotechnology Letters**, 20 (11): 1027-1029 (1998).

Internet: “*Bacillus megaterium*”, http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_megaterium (2011).

Internet: “Dialysis”, <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-11.jpg> (2011).

Hu, B., Pan, J., Yu, H. L., Liu, J. W., Xu, J. H., “Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate”, **Process Biochemistry**, 44 (9): 1019-1024 (2009).

Huang, X. R., Li, Y. Z., Yang, G. L., Liu, L. L., Qu, Y. B., Zhang, W. J., “A Novel Method for Fabrication of a Glass-Electrode-Based Lipase Sensor”, **Chinese Chemical Letters**, 12 (5): 453 – 456 (2001).

Hun, C. J., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., Basri, M., “A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase”, **Biochem. Eng. J.**, 15: 147-151 (2003).

Hutt, A. J., Caldwell, J., “The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs”, **Clin. Pharmacokinet.**, 9: 371–3 (1984).

Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Vanheuver, M., Misset, O., “Bacterial lipases”, **FEMS Microbiol. Rev.**, 15: 29–63 (1994).

Jaeger, K. E., Reetz, M. T., “Microbial lipases form versatile tools for biotechnology”, *Trends Biotechnol.*, 16: 396-403 (1998).

Jaladi, H., Katiyar, A., Thiel, S. W., Gulians, V. V., Pinto, N. G., “Effect of pore diffusional resistance on biocatalytic activity of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on SBA-15 hosts”, *Chemical Engineering Science*, 64 (7): 1474-1479 (2009).

Joseph, B., “Isolation, purification and characterization of cold adapted extracellular lipases from psychrotrophic bacteria: feasibility as laundry detergent additive”, Ph. D thesis, *Allahabad Agricultural Institute-Deemed University*, Allahabad, India (2006).

Joseph, B., Ramteke, P. W., Thomas, G., “Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments”, *Biotechnology Advances*, 26: 457–470 (2008).

Joshi, G. K., Kumar, S., Tripathi, B. N., Sharma, V., “Production of Alkaline Lipase by *Corynebacterium paurometabolum* MTCC 6841 Isolated from Lake Naukuchiatal, Uttaranchal State, India”, *Current Microbiology*, 52: 354–358 (2006).

Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A., “Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22: 307-313 (2003).

Kang, H., Kim, J., Kim, M., Park, S., Oh, T., Hur, C., “MELDB: A database for microbial esterases and lipases”, *FEBS Lett.*, 580: 2736-2740 (2006).

Kanjanavas, P., Khuchareontaworn, S., Khawsak, P., Pakpitcharoen, A., Pothivejkul, K., Santiwatanakul, S., Matsui, K., Kajiwarra, T., Chansiri, K., “Purification and Characterization of Organic Solvent and Detergent Tolerant Lipase from Thermotolerant *Bacillus* sp. RN2”, *Int. J. Mol. Sci.*, 11: 3783-3792 (2010).

Kanwar, S. S., Ghazi, I.A., Chimni, S.S., Joshi, G.K., Rao, G.V., Kaushal, R.K., Gupta, R., Punj, V., “Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate”, *Protein Expression and Purification*, 46: 421-428 (2006).

Kar, M. K., Ray, L., Chattopadhyay, P., “Isolation and identification of alkaline thermostable lipase producing microorganism and some properties of crude enzyme”, *Ind J Exp Biol*, 34: 535-8 (1996).

Kato, K., Seelan, S., “Enhancing activity and stability of *Burkholderia cepacia* lipase by immobilization on surface-functionalized mesoporous silicates”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109 (6): 615-617 (2010).

Kaya, A., “Elektroforez Yöntemleri”, *Dicle Tıp Dergisi*, 29 (3): 57- 63 (2002).

Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U. T., “Biotransformations with lipases”, In: Rehm, H. J., Pihler, G., Stadler, A., Kelly, P. J. W., *Biotechnology*, New York: VCH, 8: 37–192 (1998).

Kim, H. K., Choi, H. J., Kim, M. H., Sohn, C. B., Oh, T. K., “Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1583: 205–212 (2002).

Kim, K. R., Kwon, D. Y., Yoon, S. H., Kim, W. Y., Kim, K. H., “Purification, refolding and characterization of recombinant *Pseudomonas fluorescens* lipase”, *Protein Expression and Purification*, 39 (1): 124-129 (2005).

Kim, H. R., Song, W. S., “Lipase treatment of polyester fabrics”, *Fibers Polym.*, 7: 339-343 (2006).

Klibanov, A. M., “Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents”, *Acc. Chem. Res.*, 23: 114–20 (1990).

Klibanov, A. M., “Why are enzymes less active in organic solvents than in water?”, *Trends Biotechnol.*, 15: 97–101 (1997).

Kodera, Y., Sakurai, K., Satoh, Y., “Regioselective deacetylation of peracetylated monosaccharide derivatives by polyethylene glycol modified lipase for oligosaccharide synthesis”, *Biotechnol. Lett.*, 20: 177–80 (1998).

Kojima, Y., Shimizu, S., “Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96 (3): 219-226 (2003).

Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D., Schmid, R. D., “Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data”, *Journal of Bacteriology*, 173 (15): 4836-4841 (1991).

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., Gupta, R., “Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3”, *Protein Expression and Purification*, 41: 38-44 (2005).

Küfrevioğlu, Ö. İ., “Jel Filtrasyon Kromatografisi ve İyon Değişim Kromatografisi Yöntemleriyle Proteinlerin Saflaştırılması”, Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Adil Denizli, Ö. İrfan Küfrevioğlu, *Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti.*, Ankara, 257-265 (2010).

Laemmli, U. K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, 227: 680-685 (1970).

Lee, W. M., Kim, K. J., Kim, M. G., Lee, S. B., “Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: effects of organic cosolvents and temperature”, *J. Ferment. Bioeng.*, 6: 613–5 (1995).

Lee, D. W., Kima, H. W., Leeb, K. W., Kima, B. C., Choea, E. A., Lee, H. S., Kimb, D. S., Pyuna, Y. R., “Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1”, *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 363–371 (2001).

Lee, S. H., Park, D. H., “Isolation and physiological characterization of *Bacillus clausii* SKAL-16 isolated from wastewater”, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 1908-1914 (2008).

Lee, D. G., Ponvel, K. M., Kim, M., Hwang, S., Ahn, I. S., Lee, C. H., “Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles”, *J. Mol. Catal. B. Enz.*, 57: 62-66 (2009).

Lee, H. K., Lee, J. K., Kim, M. J., Lee, C. J., “Immobilization of lipase on single walled carbon nanotubes in ionic liquid”, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 31: 650-652 (2010).

Li, C. Y., Cheng, C. Y., Chen, T. L., “Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source”, *Biochem. Eng. J.*, 19: 25-31 (2004).

Li, Q., Yan, Y., “Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase”, *Appl. Energ.*, 87 (10): 3148-3154 (2010).

Lianghua, T., Liming, X., “Purification and Partial Characterization of a Lipase From *Bacillus coagulans* ZJU318”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 125: 139-147 (2005).

Lim, L. T., Auras, R., Rubino, M., “Processing technologies for poly (lactic acid)”, *Prog. Polym. Sci.*, 33: 820-852 (2008).

Lima, V. M. G., Kriegera, N., Mitchell, D. A., Baratti, J. C., Filippis, de I., Fontana, J. D., “ Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31: 53–61 (2004).

Liu, C. H., Lin, Y. H., Chen, C. Y., Chang, J. S., “Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers”, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 40: 359-363 (2009).

Long, Z. D., Xu, J. H., Zhao, L. L., Pan, J., Yang, S., Hua, L., “Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen”, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 27: 105-110 (2007).

Longo, M. A., Carvalho, E., Deive F. J., Sanromán, M. A., “An approach to the characterization of a novel thermophilic *Bacillus thermoamylovorans* lipase”, *Chemical Engineering Transactions*, 20: 145-150 (2010).

Lopes, M. F. S., Cunha, A. E., Clemente, J. J., Carrondo, M. J. T., Crespo, M. T. B., “Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 51: 249-54 (1999).

Lopes, M., Gomes, N., Goncalves, C., Coelho, M. A. Z., Mota, M., Belo, I., “*Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 46: 255-260 (2008).

Lotrakul, P., Dharmstithi, S., “Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004”, *Journal of Biotechnology*, 54: 113–120 (1997).

Lund, H., “Process for combined desizing and stone-washing of dyed denim”, *United States Patent 6261828*. <http://www.freepatentsonline.com> (2001).

Madan, B., Mishra, P., “Overexpression, Purification and Characterization of Organic Solvent Stable Lipase from *Bacillus licheniformis* RSP-09”, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 118-123 (2009).

Madan, B., Mishra, P., “Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 597–604 (2010).

Matsumura, S., Mabuchi, K., Toshima, K., “Lipase-catalyzed polymerization of Lactide”, *Macromol. Rapid. Commun.*, 18: 477-482 (1997).

Mingarro, I., Abad, C., Braco, L., “Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 3308-3312 (1995).

Minovska, V., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., “Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hidrolisis”, *J. Serb. Chem. Soc.*, 70: 609-624 (2005).

Miyazaki, K., Fujikawa, S., “Methods of treating skin disease, scalp disease,, sensitive skin or suppressing hair loss with microbubble washing compositions”, *US patent number 200090214512*. <http://www.freepatentsonline.com> (2009).

Miyazawa, T., Yukawa, T., Chezi, S., Yanagihara, R., Yamada, T., “Resolution of 2-phenoxy-1-propanols by *Pseudomonas* species lipase catalyzed highly

enantioselective transesterification: influence of reaction conditions on the enantioselectivity toward primary alcohol”, *Biotechnol. Lett.*, 20: 235–8 (1998).

Mnisi, S. M., Louw, M. E., Theron, J., “Cloning and characterization of a carboxylesterase from *Bacillus coagulans* 81-11”, *Curr. Microbiol.*, 50: 196-201 (2005).

Mosbah, H., Sayari, A., Bezzine, S., Gargouri, Y., “Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala”, *Protein Expression and Purification*, 47 (2): 516-523 (2006).

Nandini, K. E., Rastogi, N. K., “Reverse micellar extraction for downstream processing of lipase: Effect of various parameters on extraction”, *Process Biochem.*, 44: 1172-1178 (2009).

Nawani, N., Kaur, J., “Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 206: 91–96 (2000).

Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J., “A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290: 17–22 (2006).

Nawani, N., Kaur, J., “Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization”, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 881-887 (2007).

Nelson, D. L., Cox, M. M., “Lehninger Biyokimyanın İlkeleri”, Nedret Kılıç, *Palme Yayıncılık*, Ankara, Bölüm 5 (2005).

Nishio, T., Chikano, T., Kamimura, M., “Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B”, *Agric Biol Chem*, 51: 181–7 (1987).

Oh, B., Kim, H., Lee, J., Kang, S., Oh, T., “*Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 179: 385-392 (1999).

Ooi, C. W., Tey, B. T., Hii, S. L., Kamal, S. M. M., Lan, J. C. W., Ariff, A., Ling, T. C., “Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems”, *Process Biochemistry*, 44: 1083–1087 (2009).

Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A., “Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 669–77 (1995a).

Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A., “Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat”, ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, 43: 42–51 (1995b).

Padilha, G. S., Curvelo-Santano, J. C., Alegre, R. M., Tambourgi, E. B., “Expanded bed adsorption of an alkaline lipase from *Pseudomonas cepacia*”, ***J. Chromatogr. B.***, 877: 521-526 (2009).

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T., “The realm of microbial lipases in biotechnology”, ***Biotechnol. Appl. Biochem.***, 29: 119-131 (1999).

Pauwels, K., Gelder, P. V., “Affinity based isolation of a bacterial lipase through steric chaperone interactions”, ***Protein Expr. Purif.***, 59: 342-348 (2008).

Pencreac’h, G., Baratti, J. C., “Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media”, ***Enzyme Microb. Technol.***, 18: 417–22 (1996).

Pogaku, P., Suresh, A., Srinivas, P., Ram Reddy, S., “Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12”, ***African Journal of Biotechnology***, 9 (6): 882-886 (2010).

Priya, K., Chadha, A., “Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase”, ***Enzyme Microb. Technol.***, 32: 885-890 (2003).

Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R. D., “High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase”, ***Protein Expression and Purification***, 28 (1): 102-110 (2003).

Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Basri, M., “Lipases: Introduction”, New Lipases and Proteases, Abu Bakar Salleh, Raja N. Z. R. Abdul Rahman, Mahiran Basri, ***Nova Science Publishers, Inc.***, New York, 1-22 (2006).

Raita, M., Champreda, V., Laosiripojana, N., “Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system”, ***Process Biochem.***, 45: 829-834 (2010).

Rajmohan, S., Dodd, C. E. R., Waites, W. M., “Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage”, ***Journal of Applied Microbiology***, 93: 205–213 (2002).

Ramani, K., Chockalingam, E., Sekaran, G., “Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate”, ***J. Ind. Microbiol. Biotechnol.***, 37: 531-535 (2010).

Ramchuran, S. O., Vargas, V. A., Hatti-Kaul, R., Karlsson, E. N., "Production of a lipolytic enzyme originating from *Bacillus halodurans* LBB2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*", *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 71: 463-472 (2006).

Riaz, M., Shah, A. A., Hameed, A., Hasan, F., "Characterization of lipase produced by *Bacillus* sp. FH5 in immobilized and free state", *Ann. Microbiol.*, 60: 169-175 (2010).

Ropaning Sulong, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Basri, M., "A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene", *Protein Expression and Purification*, 49 (2): 190-195 (2006).

Rosenau, F., Tommassen, J., Jaeger, K. E., "Lipase specific foldases in bacteria", *Chem. Biochem.*, 5: 152-161 (2004).

Roy, N., Ray, L., Chattopadhyay, P., "Production of lipase in a fermentor using a mutant strain of *Corynebacterium* species: its partial purification and immobilization", *Indian J Exp Biol.*, 42 (2): 202-7 (2004).

Rubin, B., Dennis, E. A., "Lipases: Part B. Enzyme characterization and utilization Methods in enzymology", *New York: Academic Press*, 286: 1-563 (1997).

Ruchi, G., Gupta, G. N., Vamsikrishnan, M., Khare, S. K., "Protein coated microcrystals of *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipase", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 151: 160-166 (2008a).

Ruchi, G., Anshu, G., Khare, S. K., "Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application", *Bioresource Technology*, 99 (11): 4796-4802 (2008b).

Sağ Açıkel, Y., Çelebi, B., "R. delemar ile Lipaz Üretimi", *Tubitak*, Ankara, 19 (2006).

Sakai, S., Liu, Y., Yamaguchi, T., Watanabe, R., Kawabe, M., Kawakami, K., "Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto electrospun polyacrylonitrile fibers through physical adsorption and application to transesterification in nonaqueous solvent", *Biotechnol. Lett.*, 32 (8): 1059-1062 (2010).

Salis, A., Bhattacharyya, M. S., Monduzzi, M., Solinas, V. "Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57 (1-4): 262-269 (2009).

Salgın, U., Çalimli, A., Yıldız, N., Salgın, S., Sarı, M., "Süperkritik CO2 ortamında lipaz enzimlerinin kararlılığı ve yapısal bozunmasının incelenmesi", *Tubitak*, Ankara, 15-17 (2007).

- Sangeetha, R., Geetha, A., Arulpandi, I., “Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: Production, purification and characterization”, *Brazilian J. Microbiol.*, 41: 179-185 (2010a).
- Sangeetha, R., Geetha, A., Arulpandi, I., “Concomitant production, partial purification and characterization of a serine protease and a proteolysis-resistant metalloprotease from *Bacillus pumilus* SG2”, *Z. Naturforsch.*, 65: 61-65 (2010b).
- Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha, A., “Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview”, *Research Journal of Microbiology*, 6 (1): 1-24 (2011).
- Sani, D. G., “Step up: Bacterial lipase to substitute pancreatic lipase for enzymetherapy”, www.microbepundit.blogspot.com (2006).
- Saraç, N., Boran, R., Ökmen, G., Uğur, A., “Toprak ve Süt Kökenli Gram Pozitif Bakterilerde Lipaz Üretimi”, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1 (2): 23-28 (2008).
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., Sheba Davidson, W., “Purification strategies for microbial lipases”, *Journal of Microbiological Methods*, 52: 1 – 18 (2003).
- Sekhon, A., Dahiya, N., Tiwari, R. P., Hoondal, G. S., “Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1”, *J. Basic Microbiol.*, 45 (2): 147–154 (2005).
- Setzu, S., Salis, S., Demontis, V., Salis, A., Monduzzi, M., Mula, G., “Porous silicon-based potentiometric biosensor for triglycerides”, *Phys. Status solidi (a)*, 204: 1434-1438 (2007).
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., “Production, purification, characterization, and applications of lipases”, *Biotechnology Advances*, 19: 627–662 (2001).
- Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Gupta, L. K., Gupta, J. K., “Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1”, *Process Biochemistry*, 37: 1075–1084 (2002).
- Singh, M., Saurav, K., Srivastava, N., Kannabiran, K., “Lipase Production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in Solid State Fermentation Using Ground Nut Oil Cakes as Substrate”, *Current Research Journal of Biological Sciences*, 2 (4): 241-245 (2010).
- Stammen, S., Müller, B. K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E., Jahn, D., “High-Yield Intra- and Extracellular Protein Production Using *Bacillus megaterium*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (12): 4037–4046 (2010).

Sulong, R. M., Rahman R. N. Z. R. A., Salleh, B. A., Basri, M., “A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene”, *Protein Expression and Purification*, 49: 190-195 (2006).

Talon, R., Montel, M. C., Berdague, J. L., “Production of flavour esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*”, *Enzyme Microb. Technol.*, 19: 620-622 (1996).

Taneja, S. C., Sethi, V. K., Andotra, S. S., Koul, S., Qazi, G. N., “Rose oxides: A facile chemo and chemo-enzymatic approach”, *Synth. Commun.*, 35: 2297-2303 (2005).

Therisod, M., Klibanov, A. M., “Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents”, *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 3977–81 (1987).

Tripathi, M. K., Roy, U., Jinwal, U. K., Jain, S. K., Roy, P. K., “Cloning, sequencing and structural features of a novel *Streptococcus* lipase”, *Enzyme and Microbial Technology*, 34 (5): 437-445 (2004).

Tsai, S. W., Dordick, J. S., “Extraordinary enantiospecificity of lipase catalysis in organic media induced by purification and catalyst engineering”, *Biotechnol. Bioeng.*, 52: 296–300 (1996).

Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S., “Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction”, *Process Biochem.*, 36: 933–9 (2001).

Van Dyck, S. M. O., Lemiere, G. L. F., Jonckers, T. H. M., Dommissie, R., Pieters, L., Buss, V., “Kinetic resolution of a dihydrobenzofuran-type neolignan by lipase-catalysed acetylation”, *Tetrahedron: Asymmetry*, 12: 785–9 (2001).

Van Kampen, M. D., Rosenstein, R., Götz, F., Egmond, M. R., “Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1544 (1-2): 229-241 (2001).

Vaysse, L., Dubreucq, E., Pirat, J. L., Galzy, P., “Fatty hydroxamic acid biosynthesis in aqueous medium in the presence of the lipase-acyl transferase from *Candida parasitosis*”, *J. Biotechnol.*, 53: 41–6 (1997).

Vujaklija, D., Abramic, M., Lescic, I., Marsic, T., “*Streptomyces rimosus* GDS(L) Lipase: Production, Heterologous Overexpression and Structure-Stability Relationship”, *Food Technol. Biotechnol.*, 41: 89-93 (2003).

Wang, Y., Srivastava, K. C., Shen, G. J., Wang, H. Y., “Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841)”, *J. Ferment. Bioeng.*, 79: 433–8 (1995).

Wang, Q., Su, L., Fan, X., Yuan, J., Cui, L., Wang, P., “Effects of lipase on poly (lactic acid) fibers”, *Fibers Polym.*, 10: 333-337 (2002).

Wang, X., Yu, X., Xu, Y., “Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416”, *Enzyme Microb. Technol.*, 45: 94-102 (2009).

Wang, Y., Zhang, L., “Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase”, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 62: 91-96 (2009).

Weber, N., Klein, E., Mukerjee, K. D., “Long chain acyl thioesters prepared by solvent free thioesterification and transesterification catalyzed by microbial lipases”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 401-4 (1999).

Westers, H., Braun, P. G., Westers, L., Antelmann, H., Hecker, M., Jongbloed, J. D. H., Yoshikawa, H., Tanaka, T., Dijk, van J. M., Quax, W. J., “Genes Involved in SkfA Killing Factor Production Protect a *Bacillus subtilis* Lipase against Proteolysis”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (4): 1899-1908 (2005).

Winkler, U. K., Stuckmann, M., “Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*”, *Journal of Bacteriology*, 138 (3): 663-670 (1979).

Wu, H. S., Tsai, M. J., “Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase”, *Enzyme Microb. Technol.*, 35: 488-493 (2004).

Xie, Y. C., Liu, H. Z., Chen, J. Y., “*Candida rugosa* lipase catalyzed esterification of racemic ibuprofen and chemical hydrolysis of S-ester formed”, *Biotechnol. Lett.*, 20: 455-8 (1998).

Xin, J. Y., Li, S. B., Xu, Y., Chui, J. R., Xia, C. G., “Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76: 579-85 (2001).

Xu, J. H., Zhou, R., Bornscheuer, U. T., “Comparison of differently modified *Pseudomonas cepacia* lipases in enantioselective preparation of a chiral alcohol for agrochemical use”, *Biocatal. Biotransform.*, 23: 415-422 (2005).

Xu, Y., Liu, H., Du, W., Sun, Y., Ou, X., Liu, D., “Integrated production of biodiesel and 1,3-propanediol with lipase catalyzed transesterification and fermentation”, *Biotechnol. Lett.*, 39: 1335-1341 (2009).

Yan, J., Li, L., Tang, Q., Jiang, M., Jiang, S., “Preparation of a crosslinked bioimprinted lipase for enrichment of polyunsaturated fatty acids from fish processing waste”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162: 757-765 (2010).

Yang, J., Zhang, B., Yan, Y., “Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification”, ***Appl. Biochem. Biotechnol.***, 159: 355-365 (2009).

Yapaşan, E., “Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain”, Yüksek Lisans Tezi, ***İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü***, İzmir, 26 (2008).

Yeo, S. H., Nihira, T., Yamada, Y., “Screening and identification of a novel lipase from *Burkholderia* sp. YY62 which hydrolyzes t-butyl esters effectively”, ***J. Gen. Appl. Microbiol.***, 44: 147–52 (1998).

Yeoh, H. H., Wong, F. M., Lin, G., “Screening for fungal lipases using chromogenic lipid substrates”, ***Mycologia***, 78: 298–300 (1986).

Yılmaz, E., “Bioimprinting of microbial lipase at air water interface”, ***World J. Microbiol. Biotechnol.***, 18: 141-145 (2002).

Yılmaz, M., “Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara (2003a).

Yılmaz, E., “Orlistat induced molecular bioimprinting of microbial lipase”, ***World J. Microbiol. Biotechnol.***, 19: 161-165 (2003b).

Yılmaz, M., Mercan, N., Beyatlı, Y., “Topraktan izole edilen bazı *Bacillus* suşlarının proteolitik ve lipolitik aktivitelerinin incelenmesi”, ***18. Ulusal Biyoloji Kongresi*** (2006).

Zhang, Y., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Shi, P., Wu, N., Fan, Y., Li, J., Yao, B., “A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11”, ***Enzyme and Microbial Technology***, 42: 346–352 (2008).

Zhang, A., Gao, R., Diao, N., Xie, G., Gao, G., Cao, S., “Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963”, ***J. Mol. Catal. B. Enzym.***, 56: 78-84 (2009a).

Zhang, H., Zhang, F., Li, Z., “Gene analysis, optimized production and property of marine lipase from *Bacillus pumilus* B106 associated with South China Sea sponge *Halichondria rugosa*”, ***World J. Microbiol. Biotechnol.***, 25: 1267-1274 (2009b).

Zhao, L. L., Xu, J. H., Zhao, J. P., Wang, Z. L., “Biochemical properties and potential applications of an organic solvent tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010”, ***Process Biochem.***, 43: 226-233 (2008).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TEKİNER, Refiye
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 11.12.1986 Marmaris
Medeni hali : Bekar
e-mail : refiyetekiner@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	2011
Tezsiz yüksek lisans	Ankara Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	2008
Lise	Süleyman Demirel Anadolu Lisesi	2004

Yabancı Dil

İngilizce