

127073

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YENİ BİR TERMOFİLİK BAKTERİNİN, *Anoxybacillus gonensis* A4, HÜCREĐİŐİ
LİPAZ/ESTERAZ YETENEĞİNİN İNCELENMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Özlem FAİZ

Karadeniz Teknik üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce
“Yüksek Lisans (Kimya)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye VerildiĐi Tarih: 03.01.2005

Tezin Savunma Tarihi : 28.01.2005

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŐKENT

Trabzon 2005

ÖNSÖZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Lisans Üstü tezi olan bu çalışmada “*Anoxybacillus gonensis* A4” adlı yeni bir termofilik bakterinin lipas/esteraz yeteneği incelenmiştir.

Yüksek Lisansa başlamama vesile olan ve çalışmalarım süresince benden hiçbir yardımını, desteğini esirgemeyen, çalışmalarım sırasında bana yön veren tez danışmanım sayın Yrd.Doç.Dr. Ahmet ÇOLAK’a ve değerli zamanını, bilgisini paylaşan ve bu tezin bitiminde emeği olan Prof.Dr. Saadettin GÜNER’e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışmamda izolatlarını kullanmam konusunda bana yardımcı olan Doç.Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, Uzman Dr. Sabriye Dülger’e laboratuvar çalışmalarım sırasında bana büyük yardımları olan Arş.Gör. Nagihan SAĞLAM’a, Öğr. Gör. Barbaros DİNÇER’e ve Kimya Bölümümdeki değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan aileme sevgilerimi sunar teşekkür ederim.

Özlem FAİZ
Trabzon 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Esteraz/Lipazların Sınıflandırılması ve Özellikleri.....	2
1.2.1. α/β -Hidrolazlar.....	3
1.3. Esteraz/Lipazların Substrat Özgünlüğü.....	4
1.4. Estraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları.....	6
1.4.1. Esteraz/Lipaz Katalizli Hidroliz Reaksiyonu.....	7
1.4.2. Esteraz/Lipaz Katalizli Esterifikasyon Reaksiyonlar.....	8
1.5. Enzim Kaynakları ve Esteraz/Lipaz Üreten Organizmalar.....	9
1.5.1. Bakteriyel Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması.....	9
1.6. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri.....	12
1.7. <i>Anoxybacillus</i> Türlerinin Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	14
1.8. Endüstride Enzim Kullanımı ve Esteraz/Lipazların Endüstrideki Yeri.....	16
1.9. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
2.1. Cihazlar.....	22
2.2. Kimyasal Maddeler.....	22
2.3. Kullanılan Bakteriler.....	22
2.4. Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
2.4.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
2.4.2. Luria-Bertani (LB) Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması.....	23

2.4.3.	Lipolitik Enzim Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu İçin Gerekli Çözeltiler.....	24
2.5.	İzolatların Katı ve Sıvı Besiyeri Ortamlarında Büyütülmesi.....	24
2.6.	Lipolitik Enzim Aktivitesinin Kalitatif Tayini.....	25
2.7.	Büyüme Eğrilerinin Elde Edilmesi.....	25
2.8.	Hücre dışı Lipolitik Enzim Özütünün Hazırlanması.....	26
2.9.	Protein Tayini.....	26
2.10.	Lipolitik Enzim Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu.....	26
2.10.1.	Lipolitik Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi.....	27
2.10.2.	Lipolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	27
2.10.3.	Lipolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonu Etkisi.....	28
2.10.4.	Lipolitik Enzim Aktivitesine Protein Miktarının Etkisi.....	28
2.10.5.	Lipolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonu Etkisinin İncelenmesi.....	28
2.10.6.	Lipolitik Enzim Aktivitesine Genel Lipaz/Esteraz İnhibitör ve Aktivatörlerinin Etkisinin İncelenmesi	29
2.10.7.	Hücre dışı Lipaz/Esteraz Enziminin pH Kararlılığının İncelenmesi.....	29
2.10.8.	Hücre dışı Lipaz/Esteraz Enziminin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	29
3.	BULGULAR.....	30
3.1.	<i>Anoxybacillus gonensis</i> A4 Suşunun Katı ve Sıvı Besiyeri Ortamlarında Büyütülmesi.....	31
3.2.	Hücre dışı Enzim Özütünün Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi.....	32
3.3.	Esterolitik Aktivitenin Karakterizasyonu.....	33
3.3.1.	Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	34
3.3.2.	Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	34
3.3.3.	Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	35
3.3.4.	Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi.....	37
3.3.5.	Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonu Etkisi.....	37
3.3.6.	Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi.....	38
3.3.7.	Esterolitik Enzim Aktivitesinin Isıl ve pH Kararlılığı.....	39
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	41
5.	ÖNERİLER.....	45
6.	KAYNAKLAR.....	46
	ÖZGEÇMİŞ.....	55

ÖZET

Bu çalışmada yeni bir termofilik bakteri olan *Anoxybacillus gonensis* A4 (*A. gonensis* A4) suşunun esterolitik aktivitesi incelendi. Ester bağlarını hidrolizleyen hücre dışı bir enzimin varlığı tributirin-agar testi ile belirlendi. Tributirinli petrielerde büyütülen *A. gonensis* A4 izolatu etrafında berrak bölgelerin oluşması bu termofilde bir esterazın varlığını desteklemektedir. %0,3 karboksimetilselüloz Luria-Bertani (LB) besiyerinde büyümeyi ve spektrofotometrik olarak belirlenen esteraz aktivitesini artırdı. Substrat özgünlük çalışmaları, *A. gonensis* A4 suşundan hazırlanan hücre dışı enzim özütünün, kısa zincirli *p*-nitrofenil (PNP) esterlerini hidrolizleme kabiliyetinin uzun zincirli *p*-nitrofenil (PNP) esterlerini hidrolizleme kapasitesine göre daha yüksek olduğu saptandı. *A. gonensis* A4 suşu hücre dışı esterazının optimum sıcaklığı yaklaşık 80 °C, optimum pH'ı ise 5,5 olarak belirlendi. Isıl kararlılık eğrisi incelendiğinde, enzimin 30 dakika 30-70 °C arasındaki sıcaklıklarda inkübasyonuyla aktivitesinin yaklaşık %20 oranında arttığı gözlemlendi. Metal iyonlarının *A. gonensis* A4 suşu hücre dışı esteraz enzimi aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla nihai konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 11 farklı metal klorür tuzu kullanıldı. Enzim aktivitesi K⁺ varlığında %15 artış gösterdi ve diğer metal iyonlarının bazıları aktivite üzerinde hiçbir etki göstermezken diğer bazılarının aktiviteyi düşürdüğü gözlemlendi. Fenilmetilsülfonilflorür tarafından inhibisyon katalitik aktivitede önemli bir rol oynayan kritik bir serin amimoasidinin varlığını desteklemektedir. Elde edilen sonuçlar, *A. gonensis* A4 suşunun, genel olarak önceden belirtilen esterazlara benzer özelliklere sahip yüksek derecede ısıl kararlı bir gerçek esteraz salgıladığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Termofilik, Isıl Kararlı, *Anoxybacillus*, Lipaz, Esteraz

SUMMARY

Investigation of Esterase Capabilities of a Novel Bacterium, *Anoxybacillus gonensis* A4

In this study, esterolytic activities of a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* A4 strain, were investigated. Occurrence of an extracellular enzyme that hydrolyzes ester bonds was detected by tributyrin agar assay. Formation of clear zones around *A. gonensis* A4 isolates on agar plates containing tributyrin also supported the presence of an esterase in this thermophile. 0.3% Carboxymethylcellulose stimulated both the growth in Luria-Bertani (LB) medium and the esterase activities determined spectrophotometrically using *p*-nitrophenylbutyrate as substrate. The extracellular crude enzyme prepared from *A. gonensis* cultures showed greater substrate specificities for short chain *p*-nitrophenylesters than those for long chain *p*-nitrophenylesters. The temperature optimum of *A. gonensis* A4 extracellular esterase was found to be nearly 80 °C and its pH optimum was detected to be 5.5. When thermostability data was examined, it was seen that the esterolytic activity was stimulated at about 20% levels at temperatures ranging from 30 to 70 °C after 30 minutes of incubation. The effectiveness of various metal ions on the enzyme activity was tested for chloride salts of 11 metal ions at final concentration of 1 mM. In the presence of K⁺, the activity was enhanced at about 15%. The other ions had either no effect on esterase activities or possessed different inhibition profiles. Inhibition by phenylmethylsulphonylfluoride supported the presence of a critical serine residue thought to be significant for catalytic activity. All these results support that *Anoxybacillus gonensis* A4 strain excretes a highly thermostable true esterase possessing interesting characteristics some of which are similar to esterases reported earlier.

Key Words: Thermophilic, Thermostable, *Anoxybacillus*, Lipase, Esterase

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. α/β -Hidrolazların 2° yapısı.....	4
Şekil 2. Lipaz katalizli esterleşme ve hidroliz genel reaksiyon mekanizması...	7
Şekil 3. Lipaz/esteraz katalizli genel reaksiyon denklemi.....	8
Şekil 4. Çalışılan bakteri türlerinde hücre dışı lipolitik aktivitenin kalitatif tayini.....	30
Şekil 5. <i>A. gonensis</i> A4 suşunun karboksimetilselüloz içeren LB besiyeri ortamındaki büyüme eğrisi ve lipolitik aktivitenin büyüme zamanına bağlı olarak değişimi profili.....	32
Şekil 6. Karboksimetilselüloz'un <i>A. gonensis</i> A4 suşu hücre dışı özütündeki	33
Şekil 7. <i>A. gonensis</i> A4 suşu hücre dışı enzim özütünün substrat özgünlüğü.....	33
Şekil 8. Lipolitik enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.....	34
Şekil 9. Lipolitik enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	35
Şekil 10. <i>A. gonensis</i> A4 suşunun sahip olduğu lipolitik aktivite için PNPB substratı varlığındaki doygunluk eğrisi.....	36
Şekil 11. <i>A. gonensis</i> A4 suşunun sahip olduğu lipolitik aktivite için PNPB substratı varlığındaki Leneweaver-Burk eğrisi.....	36
Şekil 12. <i>A. gonensis</i> A4 suşunun sahip olduğu lipolitik aktivite üzerine protein miktarının etkisi.....	37
Şekil 13. Isıl kararlılık eğrisi.....	39
Şekil 14. pH kararlılık eğrisi.....	40

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Lipaz ve esterazları birbirinden ayıran özellikler.....	3
Tablo 2. Lipaz üreten bazı mikroorganizmalar.....	10
Tablo 3. <i>Bacillus</i> türlerine ait hücre dışı lipaz/esterazların biyokimyasal özellikleri.....	14
Tablo 4. <i>Anoxybacillus</i> türlerinin bazı fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	15
Tablo 5. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamalar.....	17
Tablo 6. Ticari olarak elde edilebilen bazı mikrobiyal lipazlar.....	17
Tablo 7. Çalışmada kullanılan termofilik bakteriler.....	23
Tablo 8. <i>A. gonensis</i> A4 suşunun esterolitik aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi.....	38
Tablo 9. <i>A. gonensis</i> A4 suşunun sahip olduğu esterolitik aktivite üzerine bazı kimyasalların etkisi.....	38

SEMBOLLER DİZİNİ

Asp	: Asparagin
DTT	: Ditiyotreitol
EDTA-Na	: Etilendiamin tetraasetik asit sodyum tuzu
Glu	: Glutamat
His	: Histidin
Ile	: İzolösin
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michealis-Menten değeri
LB	: Luria-Bertani
LBA	: Luria-Bertani Agar
Leu	: Lösin
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
Phe	: Fenilalanin
PMSF	: Fenil metil sülfonil florür
PNPA	: <i>p</i> -nitrofenilasetat
PNPB	: <i>p</i> -nitrofenilbutirat
PNPL	: <i>p</i> -nitrofenillaurat
Ser	: Serin
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
Trp	: Triptofan
Try	: Tirosin
U/L	: Ünite/Litre
V_0	: İlk Hız
V_{maks}	: Maksimum hız
ϵ	: Molar absorblama katsayısı
μM	: Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde endüstriyel teknolojilerin birçoğunda ve genel olarak biyoteknolojik işlemlerde enzimlerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Ancak maliyetleri ve elde edilebilmelerindeki problemler gibi bazı dezavantajlarından dolayı enzimlerin bazı endüstriyel alanlarda uygulanması sınırlı olmaktadır. Bu açıdan protein mühendisliği ve biyoteknolojik yöntemlerle endüstrinin ihtiyaç duyduğu, bir biyolojik kaynaktan büyük miktarlarda üretilen, yüksek sıcaklıklara ve kullanılacağı endüstriyel uygulama alanındaki çeşitli kimyasal ortamlara dayanıklı enzimlerin geliştirilmesi konusunda oldukça çarpıcı çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

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

Lipazların/esterazların endüstride birçok alanda kullanıma girmesi bu enzimlerle ya da bu enzimleri üreten mikroorganizmalarla ayrıntılı çalışmaların yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmalar, lipaz/esteraz üreten yeni mikroorganizmaların izole edilmesi ve tanınması, bu enzimlerin saflaştırılması, immobilizasyonu (tutuklanması), ekspresyonu ve karakterize edilmesi ile yüksek sıcaklık, pH, organik çözücüler, çeşitli yükseltgen/indirgenlere karşı kararlı olmasının ve aktivasyonunun sağlanması olarak özetlenebilir. Özellikle yağlarla ilgili son zamanlarda yapılan çalışmalar, kimyasal işlemlerin yerini biyolojik işlemlere terk etmesi konusunda yoğunlaşmaktadır. Bunun en temel sebebi kimyasal işlemlerde yan ürün oluşma ihtimali ve yan ürün sayısı çoktur ve

ayrıca yüksek sıcaklık, basınç, pH vb. gibi olağanüstü şartlar gerektirir. Dolayısıyla kimyasal yöntemler biyoteknolojik yöntemlere göre çoğu kez daha az ekonomiktirler. Ayrıca kimyasal işlemlerde oluşan yan ürünler uzaklaştırılmadıkları takdirde sağlık açısından problemler yaratırlar.

Sıcaklık endüstride vazgeçilmez bir unsurdur. Biyokatalizör olarak enzimlerin en bilinen dezavantajı yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve dolayısıyla aktivitelerini kaybetmeleridir. Ancak bazı mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda büyüebilmesi; bu sistemlerde mevcut enzim bileşenlerinin bu sıcaklarda bile yapılarını korumaları ve dolayısıyla aktivite gösterebilmelerinden kaynaklanır. Termofilik bakteriler bu türden, sıcaklığa dayanıklı enzimleri içeren ve endüstrilerde kullanılabilecek potansiyel enzim kaynaklarını oluştururlar. Bu enzimlerin termofilik mikroorganizmalardan elde edilmesi ve özelliklerinin araştırılması kuşkusuz bu enzimlerin kullanım alanlarını daha da genişletecektir (Janssen vd., 1994; Shao ve Weigel, 1995).

1.2. Esteraz/Lipazların Sınıflandırılması ve Özellikleri

Hidrolizledikleri ester bağlarına bağlı olarak esterazlar, birçok alt sınıfa ayrılırlar. Karboksil ester hidrolazlar (EC 3.1.1.x), tiyoesterazlar (EC 3.1.2.x), fosforik monoester hidrolazlar (EC 3.1.3.x), fosfodiester hidrolazlar (EC 3.1.6.x), difosforik monoesteraz (EC 3.1.7.x), fosforik triester hidrolazlar (EC 3.1.8.x) esterazların alt sınıflarını oluştururlar. Bu enzimler insan, hayvan ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Schmid vd., 1998). Karboksil ester hidrolazların (EC 3.1.1.x) iki önemli sınıfı mevcuttur ki bu türler bakteriler tarafından da üretilmektedir. Bunlar; lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve gerçek esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilesterazlar). Her iki enzimin üç boyutlu yapısı karakteristik α/β -hidrolaz katlanması oluşturur. Karboksilesterazlar kısa zincirli karboksilik asid esterlerini ($C \leq 12$) hidrolizlerken, lipazlar uzun zincirli suda çözünmeyen ($C \geq 12$) açilgliseritleri hidrolizlerler (Eggert vd., 2002).

Lipaz ve esterazların önemli bir özelliği de biyokatalistler tarafından bu enzimleri çekici kılan enantiyoseçiciliktir. Bazı lipaz ve esterazların neden bazı enantiyoseçicilikleri gösterdikleri henüz açıklanamamıştır. Enzimlerin stereoseçiciliklerini arttırmaya yönelik çok çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. 1980 ve 1990'lı yıllarda çözücü sistemindeki değişikliğin enzimatik reaksiyonların enantiyoseçiciliklerinde de değişiklik meydana getirdiği belirlenmiştir (Hirose vd., 1992).

Tablo1. Lipaz ve esterazları birbirinden ayıran özellikler

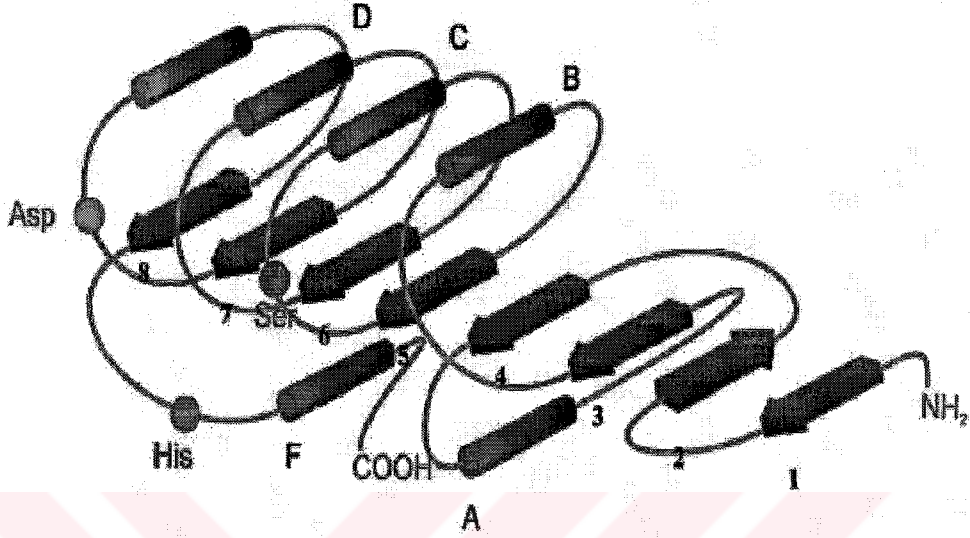
Özellikler	Lipazlar	Esterazlar
Tercih edilen substrat	Trigliseridler (uzun zincirli), tersiyer alkoller	Basit esterler, trigliseridler (kısa zincirli)
Arayüzey aktivitesi /kapak	Evet	Hayır
Substrat hidrofobikliği	Yüksek	Yüksekten düşüğe
Enantiyoseçicilik	Genelde yüksek	Yüksekten sıfıra

1.2.1. α/β -Hidrolazlar

Bugüne kadar lipazlar/esterazlarla yapılan x-ışını çalışmaları göstermiştir ki, bu enzimlerin sekonder yapıları α -sarmal ve β -katlanmış yapıları içermektedir. Bundan dolayı lipaz ve esterazlardan başka benzer bir sekonder ve tersiyer yapıya sahip proteazlar, peroksidazlar, kolinesterazlar, haloalkan dehidrojenazlar, epoksit hidrolazlar gibi diğer bazı enzimlere de α/β katlanmış hidrolazlar denilir (Hotta vd., 2002). Lipaz veya esterazların molekül ağırlıkları 19-60 kDa arasında değişiklik gösterebilir (Bañó vd., 2003). Bu grupta yer alan tüm enzimler, 8 farklı β -zinciri içeren merkezi β zincir yapısıyla bu yapılarla bağlantılı 5-8 α -sarmal yapı bulunduran $\alpha/\beta/\alpha$ sandviç modeli oluştururlar. α/β -hidrolaz enzim ailesi ilk defa Ollis (1992) tarafından ortaya konmuştur. Bu sınıf enzimlerin bir çoğunda β -tabakalar paraleldir fakat bazı enzimlerde ilk tabakada antiparalel bir yapılanma söz konusudur (Hotelier vd., 2004). Sekonder ve tersiyer yapılarındaki bu benzerliğe rağmen, α/β -hidrolaz enzim ailesinde yer alan esterazların aminoasit dizi analizleri değişiklik göstermektedir. Ancak katalitik mekanizmaları Ser-His-Asp(Glu) aminoasitlerinin oluşturduğu ve tüm enzimlerde korunmuş katalitik üçlü tarafından gerçekleştirilir.

Lipazları gerçek esterazlardan ayıran diğer bir özellik ise lipazlara özgü organik çözücü-su arayüzeyi aktivitesi göstermeleridir. Lipazların arayüzey aktivitesi göstermeleri, tersiyer yapıları itibariyle, sahip oldukları hidrofobik birimden (kapak) kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, lipazlarda aktif bölge bir veya iki tane α -sarmalden oluşan bir kapak altında tamamen gömülü durumdadır ve katalitik üçlü bu kapak tarafından kapatılan katalitik dirsek olarak adlandırılan bir kaviteye yerleşmektedir (Pleiss vd., 2000). Belli konsantrasyondaki substrat ve organik çözücü varlığında, organik çözücü-su arayüzeyinde organik çözücü ile enzimin hidrofobik kapak kısmının etkileşmesi sonucu,

enzim yapısındaki konformasyonel değişiklerle birlikte kapak açılır ve aktif bölge substrat için ulaşılabilir hale gelir (Bornscheuer, 2002).



Şekil 1. α/β -Hidrolazların 2° yapısı

1.3. Esteraz/Lipazların Substrat Özgünlüğü

Karboksil esterazlar çok geniş substrat özgünlüğüne sahiptirler. Bu nedenle, literatürde çoğu kez, bu enzimlerin substrat özgünlüklerine göre sınıflandırılmasının çok zor olduğu bildirilmekle birlikte, lipazlar özelliklerine göre; spesifik olmayan lipazlar, spesifik lipazlar ve yağ asidi spesifik lipazlar olarak üç grup altında incelenebilmektedir. Spesifik olmayan lipazlar, trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki ester bağlarını hidrolizleyebilme yeteneğine sahip olup reaksiyon sonunda trigliseridler, gliserol ve serbest yağ asitlerine parçalanırlar. Reaksiyonda ara ürün olarak diaçil ve monoaçil gliseridler oluşmaktadır. *Candida cylindraceae*, *Corynebacterium acnes* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu türdendirler. Spesifik lipazlar, nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizler. Reaksiyon sonunda triaçilgliseridlerden 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. Pankreas, *Aspergillus niger* ve *Humicola lanuginosa* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-spesifiklerdir. Yağ asidi spesifik lipazlar ise açilgliseridlerdeki bazı yağ asitlerine spesifik olup bu yağ asitlerinin

oluşturduğu esterleri hidrolizler. *Geotrichum candidum* tarafından üretilen bir lipazın uzun zincirli bir yağ asidinin esterlerinin hidrolizi için uygun olduğu bildirilmiştir (Bornscheuer, 2000).

Açıkça görülmektedir ki; esterazlar, amid ve esterlere karşı geniş bir özgünlük göstermekte ve bir esterolitik reaksiyon birçok esteraz sınıfı enzim tarafından katalizlenebilmektedir. Karakterizasyon çalışmalarında ise ürünlerin spektrofotometrik olarak rahatlıkla belirlenebildiği *p*-nitrofenil esterleri sıkça kullanılmaktadır. Bundan başka naftil esterleri de yine spektrofotometrik çalışmalarda kullanılabilirken değişik sayılarda karbon ihtiva eden organik asitlerden oluşan trigliseridlerin hidrolizi ile oluşan ürünler de titrimetrik olarak tayin edilebilmektedir (Albasi ve Riba, 1997).

Cornec (1998), derin hidrotermal su kuyularından izole ettikleri hipertermofilik *Pyrococcus abyssi*' in substrat spesifitesini incelemişlerdir. Bu çalışmada, zincir uzunluğu 3-18 olan çeşitli *p*-nitrofenil ve *o*-nitrofenil yağ asidi esterleri kullanılmıştır. Zincir uzunluğu arttıkça aktivitenin arttığı, 5 karbonlu substrat için maksimum değere ulaştığı ve daha yüksek karbon atomlu substratlarda ise aktivitenin karbon sayısı arttıkça azaldığını saptanmıştır. α ve β -naftil esterleri substrat olarak kullanıldığında da kısa zincirli orta zincirli substratlara doğru aktivitenin arttığını saptamışlardır. Termofilik *Bacillus* J33 suşundan elde edilen hücre dışı lipaz aktivitesi ise tributirin(C₄), trikaproin (C₆), trikapriline (C₈), trikaprin (C₁₀), trilaorin (C₁₂), tripalmitin (C₁₆), triolein (C₁₈) substratları varlığında araştırıldı. Lipazın trilaorin ve tributirin substratları ile en yüksek aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır (Nawani ve Kaur, 2000). Kademi ve arkadaşlarının termofilik *Bacillus circulans* hücre dışı ekstrasını kullanarak yaptıkları çalışmada, lipaz aktivitesini *p*-nitrofenil esterlerinin hidrolizlenme kapasitesi olarak belirlemişlerdir. Zincir uzunluğu 2-16 karbon olan substratlar içerisinde iki karbonlu *p*-nitrofenil esteri için en yüksek aktivitenin gözlemlendiği, substrat zincir uzunluğu arttıkça (C₄-C₈) lipolitik aktivitenin azaldığı ve zincir uzunluğu C₈'den fazla olan substratlar varlığında çok düşük olduğunu bildirmişlerdir (Kademi vd., 1999). Lee (1999), *Bacillus thermoleovorans* ID-1'den hücre dışı lipaz saflaştırmışlar ve saflaştırma işleminden sonra spektrofotometrik yöntemlerle *p*-nitrofenil esterleri (4-18 Karbonlu) kullanarak enzimin substrat spesifitesini incelemişlerdir. En yüksek enzim aktivitesinin *p*-nitrofenilkaproat durumunda (C₆) söz konusu olduğunu tespit etmişler ve ayrıca enzimin 8, 10, 12 karbonlu triaçilgliserollere karşı da yüksek aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu özelliklerinden dolayı da bu enzimi bir lipaz olarak tanımlamışlardır.

1.4. Estraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları

α/β -hidrolazların sekonder yapılarının 5-6 kadar α –sarmal ve 8 kadar da β -tabaka yapısından ibaret olduğu ve aktif bölgede bulunan katalitik üçlünün (Ser-His-Asp/Glu) hidrofobik aminoasitlerce (Phe, Trp, Ile, Leu ve Try gibi) zengin, 1 veya 2 α -sarmal yapıda polipeptid zincirinden ibaret, bir kapakla kuşatıldığı bilinmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998). Bu hidrofobik birimlerin çoğu lipazların lipid-su arayüzeyine tutunabilmesi için görev görürler ve böylece lipid yüzeyinin hidrofobik kısmına enzimin nüfuz etmesini sağlarlar (Jaeger ve Reetz, 1998). Bir aktivasyon olduğunda enzimin kapağı kapalı formdan açık forma dönüşür ve böylece aktif bölge substratın etkileşebileceği bir hale gelir. Bu aktivasyon işlemi sırasında katalitik serin birimi üzerinde hidrofobik bir yarık oluşur. Bu yarık açıl gruplarının ulaşabilmesi için uzanmış bir cep şeklindedir. Bir çok lipazda kapağın hareketiyle ayrıca bir oksianyon boşluk oluşmaktadır. Bu boşluk substrata yapılacak nükleofilik saldırı sırasında oluşan negatif yükleri kararlı kılan elektrofilik bir çevre sağlar (Jaeger ve Reetz, 1998).

Genel olarak, α/β -hidrolaz enzim ailesi esterazları tipik serin hidrolaz mekanizmasını kullanırlar bu serin proteazların mekanizmasına benzerdir. Ester hidrolizi ve oluşumu reaksiyonları esterazlar için benzerdir ve dört adımdan oluşur (Bornscheuer, 2002) (Şekil 3).

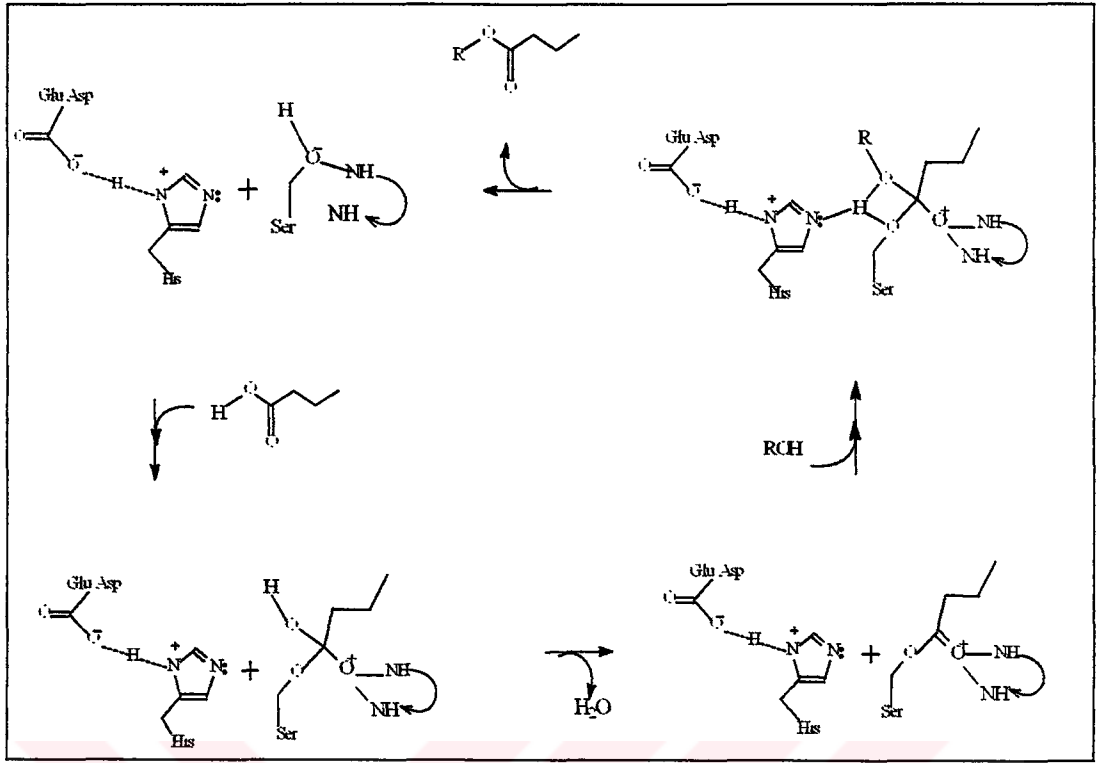
1- İlk basamakta aktif bölgedeki serin biriminin substratın karbonil karbonuna nükleofilik saldırısıyla tetrahedral bir ara ürün oluşur. Bu ara ürün histidin ve asparagin amino asitleri tarafından kararlı kılınır

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

3- Yine bir nükleofilin saldırısı ile (hidroliz reaksiyonlarında su molekülü ve transesterifikasyon/esterifikasyon reaksiyonlarında bir alkol ya da ester) açıl-enzim kompleksi hidrolizlenerek ikinci bir tetrahedral ara ürün oluşur.

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

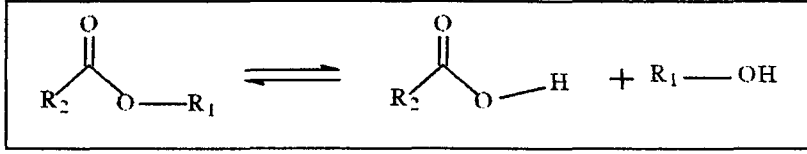
Her iki tetrahedral ara ürün bir oksianyona sahip olup bu oksianyon, oksianyon boşluğundaki protein atomlarının hidrojen bağı kapasitesi ile kararlı kılınır (Gandhi vd., 2000).



Şekil 2. Lipaz katalizli esterleşme ve hidroliz genel reaksiyon mekanizması

1.4.1. Esteraz/Lipaz Katalizli Hidroliz Reaksiyonu

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



Şekil 3. Lipaz/esteraz katalizli genel reaksiyon denklemi

1.4.2. Esteraz/Lipaz Katalizli Esterifikasyon Reaksiyonları

Organik sentezlerde kullanılan enzimlerin yüksek termal kararlılığa sahip olmaları istenir. Dolayısıyla bu tür sentezlerde kullanılacak enzimlerin termal kararlı enzimlerin ana kaynağı olan termofilik organizmalardan izolasyonunu gerektirmektedir (Kademi vd., 2000). Lipaz ve esterazların geniş substrat spesifikliğine sahip olmaları onların organik sentezlerde kullanımını artıran özelliklerindedir. Organik ortamda lipazlar ve esterazlar esterifikasyon, interesterifikasyon, alkoliz ve asidoliz reaksiyonlarını da katalizlerler (Teo, 2003). Stereospesifik esterler lipazlar ve esterazlar kullanılarak alkol ya da asitlerden sentezlenebilir. Lipazlar rasemik karışımların ayrılmasında ve böylece kiral moleküllerin elde edilmesinde sıkça kullanılırlar. Fakat, domuz karaciğeri esterazı ve *Bacillus coagulans* karboksilesterazı dışında genel olarak esterazlar daha az kullanılırlar (Faber, 1997). Esterazların bu denli az kullanılması bu enzimlerin endüstriyel anlamda organik sentezlerde kullanılmasına yetecek miktarda bulunamamasından kaynaklanır (Faber, 1997).

Lipaz/esteraz katalizli esterifikasyon, transesterifikasyon ve interesterifikasyon reaksiyonları genel olarak, kozmetik, ilaç, gıda ve sürfaktan endüstrisi gibi sanayi dallarında daha çok doğal ürünlerden eldesi zor olan saf kimyasalların sentezi için kullanılmakta olup genel reaksiyon mekanizmaları aşağıda belirtilmektedir (Gandgi, 2000). Doğal olarak bu türden esterleşme reaksiyonları organik çözücü ortamlarında gerçekleşmektedir (Bauman vd., 2000). Eğer ortamdaki su miktarı artar ve hidrofilik kapasite yükseltirse bu defa esterleşme reaksiyonları aksine enzim katalizli hidroliz reaksiyonları gerçekleşeceği bilinmektedir.

Meso-konfigurasyonundaki siklopentendiol türevleri lipaz katalizli esterifikasyon ya da hidroliz reaksiyonları ile asimetrize edilebilirler. Bu reaksiyon ürünleri prostaglandin sentezinde kullanılabilirler (Theil, 1995). Kısa zincirli esterlerin lipaz katalizli sentezi ile

gıda sanayiinde kullanılan meyve tatlarının oluşturulduğu katkılar elde edilmiştir (Leblanc vd., 1998).

1.5. Enzim Kaynakları ve Esteraz/Lipaz Üreten Organizmalar

Endüstriyel uygulamalar için bol miktarda enzim gereklidir. Bu nedenle, biyolojik sistemlerden izole edilen bir enzimin endüstriyel işlemlerde kullanılabilmesi için ihtiyaç duyulan enzimin nasıl ve hangi kaynaktan elde edileceği verilecek ilk ve belki de en önemli karardır. Bu kaynakların ticari olarak kullanılabilmeleri maliyetleri ve elde edilebilme kolaylığı gibi faktörlere ve biraz da toplumda kabul görmelerine bağlıdır.

İnsan-hayvan, bitki ve mikroorganizmalar enzimlerin elde edilmesinde kullanılan ana kaynaklardır. Günümüzde, mikroorganizmalar, enzimlerin üretilmesinde en önemli ve en yaygın kaynak durumundadır (Kademi vd., 1999). Buzağı midesinden elde edilen rennin peynir yapımında kullanılmaktadır ve bir istisna teşkil etmektedir.

Penicillium lipazı ise bu enzimin birçok alanda kullanılabilmesine olanak sağlayan, endüstrinin bir çok talebine cevap verebilecek özelliklere sahip bir lipazdır. Mantar kökenli lipazlar kompleks bileşenli ortamlarda üretilmektedirler (Pimentel vd., 1994; Chahinian vd., 2000).

Ticari olarak kullanılan bir çok lipaz aslında mikrobiyal kaynaklıdır. Lipaz üreten mikroorganizmalar farklı ortamlarda bulunabilmektedir ki bunlar; endüstriyel atıklar, bitki yağı işleme fabrikaları, süt ürünleri, petrol veya yağ ile kirletilmiş topraklarda sıcak su kaplıcaları şeklinde sıralanabilmektedir. Lipaz üreten mikroorganizmalar, bakteriler, mantarlar, mayalar ve aktinomisitler olarak sınıflandırılmaktadır (Sharma vd., 2001). Bu mikroorganizmalarda lipazın varlığının tayini değişik metodlarla kolayca yapılabilmektedir (Sierra, 1957; Cardenas vd., 2001; Yeoh vd., 1986; Wang vd., 1995).

1.5.1. Bakteriyel Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin sınıflandırılması substrat spesifitelerine göre yapılabildiği gibi gen dizi analizlerine göre de yapılabilir. Lipazların ve esterazların yapıları hakkında bilgiler son yıllarda bir çok gen dizisinin açıklanmasıyla ve kristal yapıların aydınlatılmasıyla birlikte büyük ölçüde artmıştır. Böylelikle, farklı kaynaklardan elde edilen enzimler

karşılaştırılabilir olmuştur. Diğer taraftan yüksek dizin homolojisi enzimlerin benzer substrat spesifitesine, benzer optimum pH ya da sıcaklığa sahip olduklarını göstermemektedir. Hatta bazı durumlarda da benzer bir dizine sahip enzimlerin tamamıyla farklı reaksiyonları katalizledikleri görülmektedir.

Tablo 2. Lipaz üreten bazı mikroorganizmalar (Sharma vd., 2001).

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

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

1. Aile I

Gerçek lipazlar olarak adlandırılırlar ve 6 alt sınıftan oluşmaktadır. *Pseudomonas* lipazları, *Bacillus* lipazları bu sınıftandır.

2. GDSL ailesi

Bu proteinlerde katalitik aktivitede rol oynayan önemli aminoasitler diğer lipolitik enzimlere göre N- ucuna daha yakındır. *Streptomyces scabies* esterazı bu sınıfta yer almaktadır. Bu enzim özel bir mimariye sahiptir ve katalitik üçlü yerine aktif bölgesi katalitik bir ikili şeklindedir.

3. Aile III

Bu enzim ailesi ilk olarak Cruz ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur. Daha sonra Wei ve arkadaşları çalışmalarında bu sınıftan söz etmişlerdir. Wei ve arkadaşları *Streptomyces exfoliatus* (M11) lipazınının 3 boyutlu yapısını ortaya koymuşlardır. Buna göre, enzim α/β -hidrolazlardan olup tipik bir katalitik üçlü içermektedir.

4. Hormon duyarlı lipaz ailesi

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

5. Aile V

Bu sınıf lipolitik enzimlerin çoğu *Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus* gibi mezofil bakteri kökenlidir. Aminoasit sıraları α/β -hidrolaz yapısına sahip ve katalitik üçlü içeren epoksit hidrolaz, dehalojenaz ve haloperoksidaz gibi lipolitik olmayan enzimlerle benzerlik gösterir.

6. Aile VI

23-26 kDa'luk molekül ağırlıklarıyla bilinen en küçük esteraz sınıfını oluştururlar. *Ps. fluorescens* karboksil esterazının üç boyutlu yapısı belirlenmiştir. Bu enzim bir dimerdir ve alt birimleri α/β -hidrolaz yapısına sahiptir ve klasik Ser-Asp- His katalitik

üçlüsünü içerir. Bu karboksil esteraz küçük substratları hidrolizlemesine rağmen uzun zincirli trigliseritlere karşı aktivite göstermemektedir. Bu ailede yer alan enzimler hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Aminoasit sırasını veren gen sıraları başka gen sıralarıyla benzerlik göstermemektedir. Bununla birlikte yalnızca bir tane enzimin ökaryotik lizofosfolipaz ile (Ca^{+2} a bağımlı olmayan lizofosfolipaz A₂) ile %40 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

7. Aile VII

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

8. Aile VIII

Bu aileyi meydana getiren üç enzim de yaklaşık 380 aminoasit içermekte ve C β-laktamaz sınıfı enzimlerle benzerlik göstermektedir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

1.6. Termofiller ve Termofilik Enzimlerin Özellikleri

65-85 °C arasında yaşayabilen organizmalar termofiller olarak bilinirler (Kristjansson, 1989). Termofilik bakterilerin çoğunu *Bacillus* (Ash vd., 1991; Rainey vd., 1994) ve *Thermus* gibi iki esas cins oluşturmaktadır.

Termofilik bakterilerin çeşitliliği çok az olmakla birlikte arttırılması gerekmektedir. Genel olarak, bilinen termofilik bakteriler mezofil ortamlara kolay bir şekilde adapte olabilmektedirler. Bu nedenle dünya üzerinde yaşayan tüm bakterilerin atalarının termofilik bakteriler olduğu öne sürülmektedir (Madigan vd., 2000). Termofilik bakteriler tabii olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda, çöplerde ve bazı belli başlı yerlerde bulunurlar.

Termofilik mikroorganizmaların, ekstrem şartlarda örneğin yüksek sıcaklıklarda yaşamaları için kazandıkları olağan dışı kabiliyetler, bunların yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlarına dayanır. Mezofilik organizmalara ait proteinlerin üç boyutlu yapıları yüksek sıcaklıkta önemli derecede bozunur. Son zamanlara kadar proteinlerin yüksek sıcaklığa karşı kararlı hale gelmeleri üzerinde birçok biyofiziksel çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, proteinlerin ısıya karşı dirençli hale getirilmesinde 15 farklı fizikokimyasal faktörün etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu faktörlerden bazıları,

hidrojen bağları, proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlenmeler, sarmal ikiz kutup kararlılığı ve tuz köprülerinin en iyi şekilde kullanımınıdır. Das ve Gerstein (2000) yaptıkları bir çalışmada termofilik organizmaların hem genomik hem de α -sarmal yapılarında mezofilik organizmalardan çok daha fazla yüklü alt birimlere sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca Haney vd., (1999) yaptıkları çalışmada termofilik *Methanococcus jannaschii*'den izole edilen 115 adet termofilik protein ile mezofilik *Methanococcus* türlerindeki bu 115 adet proteinin homoloğu olan protein sıralarını karşılaştırdılar. Yaptıkları karşılaştırma sonucunda, termofilik proteinlerin daha fazla sayıda alt birim içerdiği, alt birimlerde çokça hidrofobik ve yüklü aminoasitlere (özellikle Glu, Arg ve Lys) ve daha az sayıda da polar amino asitlere sahip olduğunu tespit ettiler. Bu araştırmacılar proteinlerin ısıya karşı dirençli hale gelebilmesi için hidrofobik etkileşimler yanında hidrojen, disülfür ve iyonik bağlardaki küçük değişmelerin meydana gelmesinin yeterli olduğunu önerdiler (Haney vd., 1999). Yapılan bir çalışmada (Matsumura vd., 1984), kanamisin nükleotidiltransferaz genindeki tek bir nükleotidin değişmesinin, üretilen proteinde tek bir aminoasidin değişmesine ve böylece bakterinin ısıya karşı olan dirençliliğinin 10 °C kadar artmasına sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Enzim fonksiyonları organizmanın büyüme sıcaklığı tarafından düzenlenir. Mezofilik organizmalara ait enzimler 20-40 °C arasında en iyi şekilde çalışır ve yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar. Buna karşın termofillerin enzimleri de organizmanın büyüyebildiği sıcaklıkta en etkin şekilde çalışır ve denaturasyon bu sıcaklık derecesinin çok üzerinde meydana gelir. Termofilik enzimler mezofilik sıcaklıklarda çok yavaş çalışır ve bu sıcaklıklarda ve donma durumunda çok kararlı bir şekilde bulunabilirler. (Amelunxen ve Lins, 1968; Koffler, 1957).

Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonların ilgi çekici olmasının temelinde,

- a) Reaksiyon hızı artar
- b) Ortam viskozitesi düşer
- c) Substrat çözünürlüğü artar
- d) Kontaminasyon ihtimali düşüktür (Brock vd., 1986).
- e) Termofil ve hipertermofil enzimler sıcaklığa tabii tutularak daha kolay saflaştırılabilirler gibi sebepler bulunmaktadır (Stetter, 1996, 1999).

Isıl kararlılıktan başka termofillerden elde edilen enzimlerin organik çözücü içinde denatürasyona karşı dayanıklılıkları onların sudaki ısıl kararlılıkları ile ilişkilidir (Owusu

ve Cowan, 1989). Bu nedenle ısı kararlı enzimler sadece sulu ortamda değil, organik ortamda da kullanmak için çekicidirler.

Termofilik *Bacillus* türleri çok çeşitli termal ve termal olmayan çevrelerden izole edilmiştir (Sharp vd., 1992). Literatüre göre sadece birkaç termofilik *Bacillus* türünün sıcak su kaplıcalarından izole edildiği görülmüştür. Bilinen 6 hücre dışı lipaz ve iki esteraz, *Bacillus* türlerinde bulunmuştur. Bu türlerin katalitik serin içeren Ala-X-Ser-X-Gly pentapeptidine sahip olduğu belirtilmiştir (Eggert vd., 2002).

Tablo 3. *Bacillus* türlerine ait hücre dışı lipaz/esterazların biyokimyasal özellikleri (Eggert vd., 2002).

Enzim Kaynağı	Moleküler Ağırlık (kDa)	pH Opt.	Sıcaklık Opt. (°C)	Substrat Spesifikliği
<i>B. subtilis</i> 168				
LipA	19.3	10	35-40	pNP-C8,C14 TG-C8
LipB	19.5	10	35-40	pNP-C8,C14 TG-C8
<i>B. subtilis</i> NRRL 365			Veri Yok	
Esterase I	36.0	8	Veri Yok	pNP-C2-C3
Esterase II	105.0	8		pNP-C2
<i>B.thermocatemulatus</i>				
BLT1	16.0	7-8	60-70	pNP-C10-C12
BLT2	43.0	8-9	60-70	pNP-C10 TG-C4
<i>B.stearothermophilus</i> LI	43.0	9-10	60-65	pNP-C8 TG-C3,C12
<i>B. thermoleovorans</i> ID-I	43.0	7-8	70-75	pNP-C6 TG-C8
<i>B.licheniformis</i>				
Lipase	19.2	Veri Yok	Veri Yok	Veri Yok
Esterase	81.3	8-8.5	55	pNP-C6-C8
<i>B. circulans</i>	30.0	8.5-9.5	60	pNP-C3-C4
<i>B.spec.</i> THL027	69.0	7	70	TG-C8

1.7. *Anoxybacillus* Türlerinin Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Anoxybacillus cinsi, Pikuta ve arkadaşları tarafından *Bacillus* cinsinden farklılandırılmış olup bu cinsin tip türü *Anoxybacillus pushchinensis* DSM 12423^T'tir. Pikuta ve arkadaşları ilk olarak bu cinsin tip suşunu zorunlu anaerob olarak tanımlamış fakat daha sonraki bir makalede *Anoxybacillus* cinsinin fakültatif anaerob olduğunu belirtmişlerdir. *Anoxybacillus* cinsi 5 türe sahip olup, bunlar; *Anoxybacillus flavithermus*

(*A. flavithermus*) DSM 2641^T, *Anoxybacillus pushchinensis* (*A. pushchinensis*) DSM 12423^T, *Anoxybacillus gonensis* (*A. gonensis*) NCIMB 13933^T, *Anoxybacillus kestanbolensis* (*A. kestanbolensis*) K4^T ve *Anoxybacillus ayderensis* (*A. ayderensis*) AB04^T (Pikuta vd., 2000; Belduz vd., 2003; Dulger vd., 2004) şeklinde sıralanabilir. Tablo 4' te *Anoxybacillus* türleri ile ilgili bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal özellikler özet oluşturacak şekilde sunulmaktadır.

Tablo 4. *Anoxybacillus* türlerinin bazı fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

Özellikleri	<i>A.</i> <i>kestanbolensis</i> K4 ^T	<i>A.</i> <i>gonensis</i> NCIMB 13933 ^T	<i>A.</i> <i>ayderensis</i> AB04 ^T	<i>A.</i> <i>flavithermus</i> DSM 2641 ^T	<i>A.</i> <i>pushchinensis</i> DSM 12423 ^T
G+C içeriği (%mol)	50	57	54	41.6	42
Gram boyama	+	+	+	+	+
Oksijen kullanımı	fakültatif	fakültatif	fakültatif	fakültatif	fakültatif
Hücre şekli	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk
Spor oluşumu	+	+	+	+	+
Fiziksel büyüme şartları					
Sıcaklık aralığı (°C)	40-70	40-70	30-70	30-72	37-66
Optimum sıcaklık (°C)	50-55	55-60	50	60-65	62
pH aralığı	6,0-10,5	6,0-10,0	6,0-11,0	5,5-9,0	8,0-10,5
Optimum pH	7,5-8,5	7,5-8,0	7,5-8,5	7,0	9,5-9,7
NaCl toleransı (%)	4,0	4,0	2,5	2,5	3,0
Karbon kaynağı kullanımı					
D-rafinoz	+	+	+	-	Veri yok
D-ksiloz	-	+	+	-	Veri yok
L-arabinoz	-	-	+	zayıf	Veri yok
D-mannoz	+	-	+	+	Veri yok
L-ramnoz	-	-	-	-	Veri yok
D-glukoz	+	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	Veri yok
Laktoz	-	-	-	-	Veri yok
Nitrat indirgeme	+	+	-	-	+
Jelatin hidrolizi	-	+	+	-	-

1.8. Endüstride Enzim Kullanımı ve Esteraz/Lipazların Endüstrideki Yeri

Günümüzde bilinen 4000 enzimden yaklaşık 200 tanesi ticari olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin birçoğu mikrobiyal kökenlidir. 1960'a kadar yıllık enzim satışı yalnızca birkaç milyon dolardı. O tarihten bu yana enzim pazarı hızla büyüdü (Godfrey ve West, 1996; Wilke, 1999).

Biyokimyasal tekniklerin gelişmesi , fermantasyon işlemlerinin ve yeni metodların keşfedilmesi ile enzim üretiminde dikkate değer bir artış gözlemlenmektedir. Ayrıca enzimlerin kullanım alanlarının gelişmesi ile enzim talebi de oldukça artmıştır (Sharma vd., 2001). Tüm dünyada enzim ihtiyacı 12 ana üretici tarafından karşılanmaktadır. Dünya enzim ihtiyacının % 60'ını Avrupa ülkeleri sağlamaktadır. Endüstriyel enzimlerin çoğu hidrolitiktir. Proteazlar bu sahada başı çekmektedir ve enzim satış piyasasının % 40'ını proteazlar oluşturmaktadır (Sharma vd., 2001).

Lipazlar gıda sanayiinde süt, peynir ve dondurma üretiminde, ayrıca kozmetik, parfümeri ve deri sanayii gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998). Bunların dışında, ucuz olan bitki yağlarından lipazların katalizlediği transesterifikasyon reaksiyonları ile kıymetli yağların üretilmesi de mümkündür (Colman ve Macrae, 1980; Undurraga vd., 2001). Ayrıca kirli suların temizlenmesinde, biyosümfaktan olarak deterjan üretiminde, karbohidrat ve aminoasit türevlerinin eldesinde ve hayati önem arz eden enantiyomerik olarak saf ilaçların hazırlanması gibi biyoteknolojik uygulamalarda da sıkça kullanılmaktadırlar (Jaeger ve Reetz, 1998; Arpigny ve Jaeger, 1999). Çeşitli endüstriyel kullanım amaçları için hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan bir çok lipaz saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve pek çok mikrobiyal lipaz klonlanmıştır (Schmidt, 1998; Choi vd., 2000; Rua vd., 1998). Lipazlar üzerine yapılan çalışmaların %90'ı bazı avantajlarından dolayı bakteri veya mantar orjinlidir ve ticari olarak çeşitli özelliklere sahip lipazlar mevcuttur. Fakat, son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle endüstrinin duyduğu talepten dolayı sıcaklığa karşı dirençli lipazlar üzerine odaklanmıştır (Dharmstithi ve Luchai, 1999; Nawani ve Kaur, 2000; Kademi vd., 2000; Lee vd., 2001). Özellikle termofilik bakterilerde mevcut lipazların yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olması bunların endüstride kullanımı için oldukça önemlidir. Bu enzimlerin, kumaşa zarar vermemek için düşük sıcaklıklarda kullanılan deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (Rathi vd., 2001).

Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları ve bu uygulamalarda katalizledikleri işlemler, elde edildikleri bazı mikroorganizmalar ve ticari firmalar Tablo 5 ve 6 da özetlenmektedir.

Tablo 5. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları (Vulfson, 1994).

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

Tablo 6. Ticari olarak elde edilebilen bazı mikrobiyal lipazlar (Jaeger ve Reetz, 1998).

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

Esterazların ise endüstride uygulama buldukları alanlardan biri tarımdır. Karboksilesterazlar tarım kimyasallarının üç sınıfını oluşturan organofosfatlar, karbamatlar ve piretroidlerle etkileşerek tarım kimyası ve detoksifikasyonu üzerinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Kao vd., 1985). Organofosfatlar ve karbamatlar toksisitelerini asetil kolin esterazı inhibe ederek gösterirler (Gupta ve Dettbarn, 1993). Bu şekilde sinir sisteminde kesilme meydana gelir (Quinn, 1987). Malatyon toksisitesinin insanlarda ve farelerde karboksilesteraz seviyesi ile ilişkili olduğu gösterildi (Talcott, 1979a; Talcott vd., 1979b). Memelilerde (Casida, 1980) ve böceklerde (Davies, 1985) piretroidlerin karboksilesterazlar tarafından hidrolizi bu grup böcek öldürücülerin başlıca detoksifikasyon mekanizmalarından biridir. Organofosfat ve/veya karbamatlara maruz kalan organizmalar bir de piretroid denen maddelerle etkileşirse sinerjetik toksisite

meydana gelebilmektedir (Gaughan vd., 1980). Bu şekilde meydana gelen bu sinerjetik etki birçok organizmada gösterilmiştir (Abernathy ve Casida, 1973; Casida vd., 1983). Tarım kimyasallarına karşı dayanıklılığı sağlayan yolların başında karboksilesteraz seviyesinin yükseltilmesi gelmektedir (Harold ve Ottea, 2000). Karboksil esterazların bu olumlu etkisi birçok böcek türünde organofosfat ve piretroid bileşikleri varlığında tespit edilmiştir. Bu nedenle karboksil esterazların bu bileşiklerle etkileşimi üzerine çalışmak tarım için ekonomik açıdan oldukça önemli görülmektedir.

Yağ rafinerisi, sabun ve deri üretimi gibi birçok endüstriyel işlemler sırasında lipidece zengin atıklar oluşur. Bu atık akıntıları; yağ, yağ asitleri, sülfatlar, yüksek konsantrasyonda oksitlenebilen maddeleri içerirler. Bu akıntıların özellikleri düşük pH değerleri ve yüksek sıcaklıkları ile karakterize edilebilmeleridir. Atık miktarı ve bileşimi uygulanan endüstri türünde kullanılan hammaddelere bağlıdır. Termofilik organizmalar bu tür endüstriyel atıkların iyileştirilmesi amacıyla kullanılabilirler (Markossian vd., 2000). Termofilik organizmaların bu tür atıkların saflaştırılmasında uygulanmasının bir çok avantajı vardır. Bunlardan bir tanesi de 50 °C üzerinde hidrofobik substratların enzim ve organizmalar için uygunluğunun artmasıdır (Becker vd. 1997, 1999). Böylelikle esterazlar çevre temizliği konusunda da uygulama alanı bulmaktadır.

Esterazların insan sağlığı açısından incelenmesi çok fazla çalışılmış bir konu değildir. Bu enzimlerin geniş substrat spesifitelerinden dolayı çalışılması zordur. Endojen metabolik yollarda hayati öneme sahip olamamaları da esterazlar üzerine olan ilgiyi azaltmıştır. Yine de bazı çalışmalarda karboksilesterazların kolesterol biyosentezi (Benayoud, 2000) ve A vitamininin hepatik kullanımı (Harrison, 1998; Harrison, 2000) üzerinde rol oynayabilecekleri belirtilmiştir. Karboksilesterazlar farmakolojik açıdan önem arz eden birçok bileşiğin sentezinde kullanılmaktadır. Örneğin Sanfetrinem Cilexetil antibiyotiğini aktif formu olan trineme hidrolizleyebilmektedirler. Karboksilesterazlar amit ve ester bağı içeren birçok tedaviye ait maddenin farmokinetik davranışlarının belirlenmesinde temel olarak kullanılan belirleyicidirler (Oliver vd., 2000). Bazen de karboksilesterazların inhibe edilmesi tedavi amaçlı olarak kullanılabilirler. Örneğin Alzheimer ilaçlarında karboksilesterazlar mevcuttur. Bu ilaçlarda butirilkolinesterazın inhibe edilmesinde karboksilesterazlar kullanılmaktadır (Yu vd., 2001).

Esterazlara başvuru bir diğer endüstri kolu da gıda sanayidir. Fermente gıda ürünleri göz önüne alındığında tat çok önemli bir organoleptik parametredir. Tadın, reaksiyon ilerleyişi sırasında, lipid bileşiminde meydana gelen hidrolitik ve oksidatif

değişikliklerle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Demeyer vd., 1974). Bu hidrolitik değişimler, gliserol-ester bağlı yağ asitlerinin salıverilmesi, bakteriyal lipaz ve esterazlardan kaynaklanır (Lopes vd., 1999). Bilim adamları yıllarca, süt ürünlerinin olgunlaştırılması işlemini kısaltmaya, maliyeti düşürmeye ve farklı peynirlerin tadını artırmaya çalışmışlardır. Bu amaç için proteazları, lipazları ve esterazlar kullanmıştır (Choi ve Lee, 2001).

1.9. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Pekçok endüstriyel faaliyette kimyasal yöntemlerin yerini biyoteknolojik yöntemler ve daha çok enzimlerin kullanımı almaktadır. Bunun en önemli sebeplerinden birkaçı kimyasal yöntemlerin spesifik olmaması, verim düşüklüğü, yan ürünlerin sayısının fazla olması, ürünlerin canlı sistemler üzerinde toksite yapabilmesi dolayısıyla biyouyumlu ve biyobozunur olmamaları sayılabilir. Ancak doğal olarak organizmalar tarafından üretilen enzimler oldukça spesifiktirler ve sadece tek bir stereospesifik ürün oluşturmak üzere reaksiyonları katalizlenmemiş reaksiyonlara göre milyar kat daha hızlı katalizleyebilirler. Böylece istenilen kıymetli ve faydalı ürünün yüksek saflıkta ve verimle kimyasal yöntemlere göre çok daha kısa sürelerde sentezlenmesi sağlanır. Dolayısıyla ekonomik açıdan da değerlendirildiklerinde kimyasal yöntemlere göre enzimlerin sayısız avantajları vardır. Ayrıca kimyasal yöntemlerden farklı olarak enzimler varlığında reaksiyonlar ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı ve basıncı, fizyolojik pH vb.) gerçekleştirilir, böylece büyük oranda enerji tasarrufu ve ekonomi de sağlanmış olur. Başlıca bu özelliklerinden dolayı artık günlük hayatımızda kullandığımız pek çok üründe ve bu ürünlerin fabrikasyon aşamalarında enzimler önemli bir yer tutmaya başlamışlardır.

Termofiller üzerinde yapılan çalışmalardan yola çıkılarak sıcaklığa dirençli yeni proteinlerin keşfedilmesi sağlanmıştır ki bu proteinler yüksek sıcaklıklarda kararlılık göstermeleri, aktif olmaları ve hatta yüksek basınçlarda bile termal kararlılıklarını devam ettirebilmeleri endüstriyel açıdan bu tür enzimleri cazip kılmaktadır. Gıdadan temizlik, kozmetik, ilaç ve tekstil endüstrisine kadar bir çok alanda oldukça fazla kullanım payına sahip olan enzimlerin bu alanlarda uygulanmasıyla hem daha düşük maliyetlerde yüksek saflıkta ve bol miktarda ürün eldesi gerçekleşir ve hem de çevre kirliliğine neden olan atık ürünlerin miktarı oldukça azaltılmış olur.

1995 yılında enzim piyasası yaklaşık 30 milyon dolar kadar olmuştur ve bunun yaklaşık % 30'unu temizlik veya deterjan endüstrisi kullanmıştır. Lipazların enzim piyasasındaki potansiyeli oldukça yüksek olup her yıl üretilen yaklaşık 15 milyar ton kadar deterjana 5 bin ton kadar lipazın katkı olarak ilave edildiği bildirilmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998).

Çeşitli çevresel şartlarda kararlı olabilen lipazların daha ileri düzeyde çeşitli biyolojik kaynaklardan izole edilip karakterize edilmesi ile biyomoleküllerin hem endüstride kimyasal eşdeğerlerine göre daha fazla yer alması sağlanacak ve hem de endüstriyel enzim pazarındaki payı daha da artacaktır. Lipazların ve dolayısıyla lipaz katalizli işlemlerde elde edilen ürünlerin endüstride sınırlı kullanımları lipazların mikrobiyal kaynaklardan endüstriyel talebe cevap verecek çoklukta üretilemeyişi, üretim maliyetlerinin fazlalığından ve bunların daha çok fakat daha ucuz üretilebilecek biyoişlem metodolojilerinin yetersiz oluşundan kaynaklanmaktadır.

Önerilen çalışmanın amacı, Biyoloji Bölümü araştırmacıları (Doç.Dr. A. O. Beldüz ve Uzman Dr. S. Dülger Çanakçı) tarafından Türkiye'deki değişik kaplıcalardan izole edilen, çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle sistematigi yapılan, 16S rRNA analizleri ile yeni türler olduğu ortaya konan termofilik bakterilerden (Belduz vd., 2003; Dulger vd., 2004) ısıya dirençli lipolitik aktivitelerinin araştırılması, lipaz üreten bu mikroorganizmaların maksimum ekstraselüler lipaz aktivitesi gösterebileceği pH, sıcaklık, substrat özgünlüğü, çeşitli kimyasal maddelerin etkisi vs. şartların tespit edilmesi ve karakterize edilmesidir. Lipaz enziminin termofilik bakterilerden izole edilip, saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesiyle bu enzimin uygulama alanı bulunduğu endüstriler için daha gelişmiş ve uygun özelliklere sahip bir türünün mikrobiyal kaynaklardan üretilmesinin söz konusu olabileceği açıktır. Bu şekilde halen faaliyet gösteren birçok endüstriyel kuruluşta lipaz kullanımının artması söz konusudur. Ayrıca optimum şartların belirlenmesi ve detaylı analizi ile yeni ve geniş kararlılık aralığına ve özelliklere sahip lipazlar üretilebilecektir. Hatta bu enzimlerin veya bu enzimlerin kaynağı olan mikroorganizmaların; genetik mühendisliği, biyokimyasal ve biyoteknolojik yöntemler yardımıyla modifiye edilmesi ile de özel ihtiyaçlara cevap verebilecek lipazlar ve lipaz üreten mikroorganizmalar mümkün olabilecektir.

Lipaz/esteraz enzimlerinin termofilik bakterilerden izole edilip, saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesiyle bu enzimlerin uygulama alanı bulunduğu endüstriler için daha gelişmiş ve uygun özelliklere sahip türlerinin mikrobiyal kaynaklardan üretilmesinin

söz konusu olabileceği açıktır. Bu şekilde halen faaliyet gösteren birçok endüstriyel kuruluşta lipaz/esteraz kullanımının artması söz konusudur. Ayrıca optimum şartların belirlenmesi ve detaylı analizi ile yeni ve geniş kararlılık aralığına ve özelliklere sahip lipazlar üretilenmektedir. Hatta bu enzimlerin veya bu enzimlerin kaynağı olan mikroorganizmaların; genetik mühendisliği, biyokimyasal ve biyoteknolojik yöntemler yardımıyla modifiye edilmesi ile de özel ihtiyaçlara cevap verebilecek lipazlar ve lipaz üreten mikroorganizmalar mümkün olabilecektir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Cihazlar

Spektrofotometrik çalışmalarda, ATI Unicam UV2-100 model çift ışın yollu ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi, tampon çözeltilerin hazırlanmasında Jenway 3010 model pH metre kullanılmıştır. Ayrıca kültürlerin hazırlanmasında Nüve EN 400 model inkübatör ve Memmert model su banyolu hızı ayarlanabilir çalkalayıcı kullanılmıştır. Reaksiyon karışımlarının ve bileşenlerinin hazırlanmasında, 1-10 µL, 10-100 µL ve 100-1000 µL Socorex model otomatik pipetleri, Themolyne marka vorteks karıştırıcı ve Chiltern marka ısıtıcı-magnetik karıştırıcı kullanıldı.

2.2. Kimyasal Maddeler

Magnezyum klorür, sodyum klorür, potasyum klorür, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum hidroksit, bakır sülfat penta hidrat, merkaptoetanol, hidrojen klorür, etilendiamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), agar, etanol ve maya ekstrağı kimyasalları, divalent Cu^{+2} , Ni^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} ve trivalent Cr^{+3} iyonlarının klorür tuzları Merck A.G. (Darmstadt, Germany)'den sağlandı.

Karboksimetil selüloz, kalsiyumklorür dihidrat, *p*-nitrofenil asetat (PNPA), *p*-nitrofenil butirat (PNPB), *p*-nitrofenil laurat (PNPL), trizma baz, bovin serum albümin, sodyum potasyum tartarat, fenil metil sülfonil florür (PMSF) ve ditiyotreitöl (DTT) kimyasalları, Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)'dan, baktotripton ise Acumedia Manufacturers, Inc. (Maryland, USA)'dan temin edildi.

2.3. Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada, Biyoloji Bölümü araştırmacıları (Doç.Dr. A. O. Beldüz ve Uzman Dr. S. Dülger Çanakçı) tarafından Türkiye'deki değişik kaplıcalardan izole edilen, çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle sistematığı yapılan, 16S rRNA analizleri

ile yeni türler olduğu ortaya konan termofilik bakterilerin (Belduz vd., 2003; Dulger vd, 2004) bir kısmında (Tablo 7) ısıya dirençli lipaz/esteraz aktiviteleri araştırıldı.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan termofilik bakteriler

İzolot No	Suş
A4	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
A7	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
A9	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
G2 ^{T*}	<i>Anoxybacillus gonensis</i>
K1	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>
K4 ^{T*}	<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>

* Üst indis T bir türün tip suşu anlamına gelmektedir.

2.4. Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Termofilik bakterilerden hazırlanan hücre dışı özütlerde lipaz/esteraz aktivitelerin araştırılmasında 50 mM pH=7,5 olan fosfat tamponu kullanıldı. 50 mM fosfat tamponu (pH=7,5); 1 L saf suda yaklaşık 8,7 g K_2HPO_4 çözülmesiyle hazırlanan dibazik potasyum hidrojen fosfat çözeltisinin belli bir hacmi 1 L suda yaklaşık 6,8 g KH_2PO_4 'ın çözülmesiyle hazırlanan monobazik fosfat çözeltisinin belirli bir hacmi ile pH=7,5 oluncaya kadar titre edilerek hazırlandı.

Hücre dışı özütlerde lipaz/esteraz aktivitesinin karakterizasyonu çalışmalarında ise 50 mM pH=5,5 Sodyum asetat tamponu kullanıldı. 50 mM pH=5,5 Sodyum asetat tamponu; 4,1 g sodyum asetatın yaklaşık 1 L saf suda çözülüp pH=5,5 oluncaya kadar seyreltik asetik asit ile titre edilerek hazırlandı.

2.4.2. Luria-Bertani (LB) Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması

10 g baktotripton, 5 g maya özütü, 5 g NaCl bir erlene konulup üzerine yaklaşık 900 mL dd H_2O ilave edildi. Bir magnetik karıştırıcı üzerinde iyice çözüldükten sonra, belli konsantrasyondaki NaOH çözeltisi ile pH 7,5 oluncaya kadar titre edildi ve yine dd H_2O ile

1 L'ye tamamlandı (Luria vd., 1960). Hazırlanan bu çözelti sıvı besiyeri olarak (LB) kullanılabileceği gibi çizgi ekimler için kullanılan katı besiyeri olan Luria Bertani Agar (LBA) hazırlamak için ise LB içerisine pH ayarlandıktan sonra katılaşmayı sağlaması amacıyla 15 g agar katılıp su banyosunda çözüldü. 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilmek suretiyle sterilize edildikten sonra dolaba konulup gerektiğinde kaynayan su banyosunda gevşetilip kullanıldı.

2.4.3. Lipolitik Enzim Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu İçin Gerekli Çözeltiler

Uygun tampon çözeltiler yanında, enzim aktivitesinin karakterizasyonu için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı. 100 mM'lık stok substrat *p*-nitrofenil butirat (PNPB) çözeltisi için yaklaşık 18 µl PNPB asetonitrilde çözülüp yine asetonitrille 1 mL'ye tamamlandı. Karakterizasyon çalışmaları sırasında bu çözeltiden uygun hacimlerde alınıp reaksiyon karışımına konuldu.

Anoxybacillus gonensis A4 suşundan elde edilen hücre dışı özütün sahip olduğu lipaz/esteraz aktivitesine metal iyonlarının etkisinin incelenmesi amacıyla, monovalent Na⁺ ve K⁺, divalent Cu⁺², Ni⁺², Ca⁺², Mn⁺², Hg⁺², Zn⁺², Co⁺² ve Cd⁺² ve trivalent Cr⁺³ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri pH=5,5 asetat tamponu içerisinde hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerin uygun hacimleri reaksiyon karışımlarına katılarak aktivite tayinleri yapıldı.

Hücre dışı özütlerdeki lipaz/esteraz aktivitesine inhibitör etkisinin incelenmesi için ise yine pH=5,5 asetat tamponu içerisinde, merkaptoetanol ve EDTA-Na'un 10 mM'lık, DTT'nin ise 500 µM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerin uygun hacimleri reaksiyon karışımlarına katılarak aktivite tayinleri yapıldı.

2.5. İzolatların Katı ve Sıvı Besiyeri Ortamlarında Büyütülmesi

Önceden hazırlanıp steril edilmiş LBA besiyeri, steril petrilere döküldükten sonra stok kültürlerden küçük bir kısım bir öze vasıtasıyla çizgi ekimiyle ekildi. Petrilere 60 °C'de etüvde bir gece bekletilerek bakterilerin büyümeleri sağlandı. Bu şekilde katı besiyeri ortamında büyütülen ve daha sonraki karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak olan

bakteriler gliserol stok kültürlerinden LBA içeren petri kaplarına çizgi ekimle aseptik transferiyle hazırlandı ve kirlilik oluşuncaya kadar 4 °C'de saklandı.

Sıvı besiyeri ortamında bakterilerin büyümesi ise sterilize edilmiş LB sıvı besiyeri ortamında gerçekleştirildi. Sıvı besiyeri içerisine taze hazırlanmış katı besiyeri ortamındaki bakterilerden yine bir krom öze teli vasıtasıyla küçük bir miktar aktararak sıvı kültüre ekim yapılmış oldu. Bu işlem, değişik hacimler için bir erlen ya da bir kültür tüpünde yapıldı. Kültürler 60 °C'de 200 rpm hızla çalkalanan sabit sıcaklık su banyolu çalkalayıcıda belli bir süre bekletilerek büyütüldü. Bütün sıvı besiyeri ortamındaki inkübasyonlar 60 °C ve 200 rpm'deki su banyolu çalkalayıcıda gerçekleştirildi.

2.6. Lipolitik Enzim Aktivitesinin Kalitatif Tayini

LBA katı besiyeri ortamına % 1,5 (w/v) oranında tributirin ilave edildikten sonra karışım 10 dakika boyunca homojenize edildi ve sterilize edilip uygun şekilde petrilere aktarıldı. Daha sonra petrilerin orta kısmına Tablo 7' de belirtilen bakteri kültürlerinden daire şeklinde çizgi ekim yapıldı ve inkübatörde 60 °C'de iki gün inkübe edildi. Koloniler etrafında oluşan berrak bölgeler, bakterilerin tributirini hidrolizlemesinin sonucu olup lipaz/esteraz aktivitesinin kalitatif tayininde kullanılmaktadır (Bhadabhade vd., 2002). Koloniler etrafında oluşan bu berrak bölgelerin daha iyi görüntülenmesi için 3-4 gün boyunca petriler 4 °C'de bekletildi ve daha sonra petrilerin fotoğrafları çekildi.

2.7. Büyüme Eğrilerinin Elde Edilmesi

LB sıvı besiyerinin 10 mL'sine % 0,3 (w/v) olacak şekilde karboksimetilselüloz ilavesi ile oluşturulan ortamda (Gum arabic gibi emülsifiye edici bir madde olup karbon kaynağı olarak ortama katılmıştır. Literatürde Gum arabic'in aktivite tayini için hazırlanan reaksiyon karışımına bir emülsifiyer olarak ilave edildiği bildirilmiştir (Bhardwaj vd., 2001) izolatların bir gece inkübe edilmesiyle büyütülen bakteri kültürlerinden 2 mL alındı ve yine aynı oranda karboksimetilselüloz içeren sıvı besiyerinin belirli bir hacmine ilave edildi. Daha sonra belli saatlerde alınan kültür örneklerinin 660 nm'de optik yoğunlukları ölçüldü. Her ölçümde sıvı besiyeri ortamının 1 mL'lik hacmi kontrol olarak kullanılırken, alınan kültür örnekleri 1:1 oranında sıvı besiyeri ile seyreltilerek absorbansları okundu. Bu

şekilde okunan absorbans değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek *A. gonensis* A4 suşu için büyüme eğrisi elde edildi.

2.8. Hücre dışı Lipolitik Enzim Özütünün Hazırlanması

% 0,3 (w/v) karboksimetilselüloz içeren sıvı besiyeri ortamında 60 °C'de ve sabit sıcaklıklı çalkalamalı (200 rpm) su banyosunda belirli bir süre inkübe edilen kültürler masaüstü santrifüjde 4000 rpm'de oda sıcaklığında 30 dakika santrifüj edildi. Katı kısım ayrılarak berrak kısım alındı. Bu şekilde hazırlanan özüt -34 °C'de küçük hacimler halinde saklandı ve gerektiğinde kullanıldı (Lee vd., 1999).

2.9. Protein Tayini

Özütlerdeki protein miktarı Lowry yoluyla tayin edildi (Lowry, vd., 1951). Bu işlemden standart olarak bovin serum albümini kullanıldı. Kalibrasyon için bir seri serum albümin çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilere % 1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve % 2 Na-K tartaratın 0,1 N NaOH içeren çözeltilere ilavesiyle hazırlanan çözeltilerden 1 mL ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1:1 oranında seyreltilmiş folin reaktifinden 0,10 mL ilave edildi. Karanlıkta 30 dakika kadar bekletildikten sonra 650 nm'deki absorbanslar, standart serum albümin ve enzim özütü örnekleri için okundu. Örneklerdeki protein miktarları mg/ml olarak tayin edildi.

2.10. Lipolitik Enzim Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu

Lipaz/esteraz enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ve 2,4 mL reaksiyon karışımları ile incelendi (Lee, vd., 1999). Reaksiyon karışımı, 0,6 mL enzim özütü ve 1,8 mL de substrat çözeltisi içerecek şekilde hazırlandı. Substrat çözeltisi ise 1:4:95 (v/v/v) oranında olacak şekilde asetonitrilde çözülmüş PNPB (10 mM):etanol:50 mM, pH=7,5 fosfat tamponu (karakterizasyon çalışmalarında ise 50 mM, pH=5,5 asetat tamponu kullanılmıştır) bileşenlerinden hazırlandı. Kontrol olarak ise belirlenen oranlarda hazırlanan 1,8 mL substrat çözeltisi ve 0,6 mL sıvı besiyeri karışımı kullanıldı. Hem reaksiyon karışımı hem de kontrol çalışılan sıcaklıkta 20 dakika inkübe edildi ve bu süre

sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak lipaz/esteraz aktivitesi tayin edildi. 1 Ünite, hazırlanan hücre dışı lipaz/esteraz enzim özütü ile çalışılan pH ve sıcaklıkta PNPB'den 1 dakikada oluşan 1 μmol *p*-nitrofenolat olarak tanımlanmıştır. Fakat bu değer daha sonra reaksiyon karışımının hacmine (litre) bölünerek U/L olarak tanımlanan aktivite ifadesi hesaplandı.

Belli zaman dilimlerinde kültür ortamından küçük miktarlarda alınarak hazırlanan özütlerin belirtilen reaksiyon karışımına göre PNPA, PNPB ve PNPL gibi *p*-nitrofenil esterlerini fenolat iyonuna dönüşüm hızı incelendi ve enzim özütlerinin sahip olduğu lipaz/esteraz aktivitesinin substrat özgünlüğü tayin edildi.

2.10.1. Lipolitik Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

A. gonensis A4 suşundan hazırlanan hücre dışı enzim özütündeki lipaz/esteraz aktivitesine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla aktivitenin ölçüldüğü rutin yöntemde substrat çözeltisinde kullanılan tampon yerine belirli pH değerlerinde tamponlar kullanıldı ve bu pH değerlerindeki aktivite tayinleri 60 °C'de gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan tamponların tamamı 50 mM konsantrasyonda olup farklı pH değerleri için aşağıda belirtilen farklı tamponlar kullanılmıştır. Buna göre; pH=4,0-5,5 aralığında asetat tamponu ve 6,0-8,0 aralığında fosfat tamponu kullanılmıştır.

2.10.2. Lipolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Anoxybacillus gonensis A4 suşundan hazırlanan hücre dışı enzim özütündeki lipaz/esteraz aktivitesinin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 20-90 °C aralığında 10 °C'lik artışlarla sabit sıcaklıklı, çalkalayıcı su banyosu kullanılarak belli sıcaklık ve optimum pH değerlerinde yukarıda anlatıldığı şekilde lipaz/esteraz aktivitesi tayin edildi. Bu durumda reaksiyon karışımı her bir çalışma sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra spektroskopik ölçümler yapıldı.

2.10.3. Lipolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonu Etkisi

Protein miktarı sabit tutularak yapılan optimum pH ve sıcaklık değerlerinde yapılan bu çalışmada, 100 mM PNPB çözeltisi stok olarak hazırlandı ve reaksiyon belirtilen şartlarda yapıldı. Her bir ölçüm için PNPB'nin değişen konsantrasyonlarını (0-800 μ M nihai PNPB konsantrasyon aralığında) içeren 1:4:95 (v/v/v) oranında olacak şekilde PNPB: etanol: asetat tamponu karışımları hazırlandı. Reaksiyon karışımı her seferinde 4 mL'ye tamamlandı ve 405 nm de PNPB için spektroskopik ölçümler gerçekleştirildi ve aktivite değerleri hesaplandı. Hesaplanan hız değerleri substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek substrat doygunluk ve Lineweaver-Burk grafikleri hazırlandı. Daha sonra bu grafiklerden optimum substrat konsantrasyonu belirlendi ve V_{maks} ve K_m gibi kinetik ifadeler tayin edildi.

2.10.4. Lipolitik Enzim Aktivitesine Protein Miktarının Etkisi

Bu çalışmada substrat konsantrasyonu sabit tutulup, protein içeriği bilinen özütlerden değişik hacimlerde alınarak yukarıda belirtilen şekilde bir seri reaksiyon karışımı hazırlandı. Değişen protein miktarı ile aktivite ilişkisi incelendi.

2.10.5. Lipolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonu Etkisinin İncelenmesi

Lipaz/esteraz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla monovalent Na^+ ve K^+ , divalent Cu^{+2} , Ni^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} ve Cd^{+2} ve trivalent Cr^{+3} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Kullanılan metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde her bir metal iyonu enzim özütü ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Karışımdan alınan belli bir hacim substrat çözeltisi ile muamele edildi ve optimum sıcaklık değerinde bu metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelendi.

2.10.6. Lipolitik Enzim Aktivitesine Genel Lipaz/Esteraz İnhibitör ve Aktivatörlerinin Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmada ise PMSF, merkaptoetanol, DTT, Na-EDTA gibi 3 farklı kimyasal maddenin *Anoxybacillus gonensis* A4 suşunun lipaz/esteraz aktivitesi için bir inhibitör ya da aktivatör olup olamayacağı denendi. Bu kimyasallardan PMSF ve DTT 50,100 ve 250 µM, 2-merkaptoetanol ve Na-EDTA ise 2, 2,5 ve 5 mM konsantrasyonlarda olacak şekilde her bir kimyasalın her bir çözeltisi enzim özütü ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra inkübasyon karışımından alınan belli hacim substrat çözeltisi ile karıştırıldı ve bu kimyasalların aktivite üzerine etkisi incelendi.

2.10.7. Hücre dışı Lipolitik Enziminin pH Kararlılığının İncelenmesi

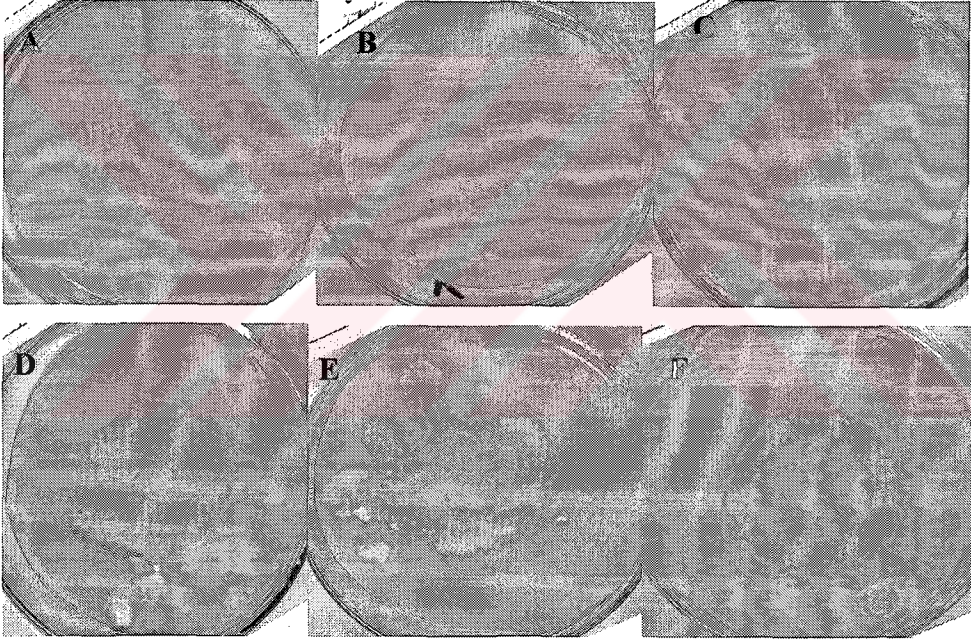
Anoxybacillus gonensis A4 suşunun lipaz/esteraz aktivitesinin pH kararlılığını incelemek için, belli hacimdeki enzim özütü pH'sı 4,0-9,0 arasında değişen değişik tampon çözeltilerinin belli hacimleri içerisinde 4 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu çalışmada değişik pH'ların sağlanabilmesi için farklı tamponlar kullanıldı. pH 4,0-5,5 için 50 mM asetat tamponu, pH 6,5-7,5 aralığı için 50 mM fosfat tamponu ve 8,0-9,0 için ise 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Reaksiyonlar her seferinde optimum pH ve sıcaklık değerinde gerçekleştirildi. % Kalan lipaz/esteraz aktivitesi 24. saat sonunda hesaplanan aktivitelerin 0. saatteki aktiviteyle karşılaştırılması sonucunda belirlendi (Dincer vd., 2002).

2.10.8. Hücre dışı Lipolitik Enziminin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Termofilik *Anoxybacillus gonensis* A4 suşunun sahip olduğu lipaz/esteraz aktivitesinin ısıl kararlılığının belirlenmesi için hücre dışı enzim özütü 30 dakikalık zaman diliminde 10 °C lik artışlarla 30-80 °C sıcaklıklarda inkübe edildi. Belli sıcaklıklarda belli sürelerde bekletilen özüt oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra daha önce belirlenen optimum şartlarda aktivite tayinleri yapıldı. % Kalan aktiviteler herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış enzim özütünün optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, ilk olarak, Biyoloji Bölümü araştırmacıları tarafından Türkiye'deki değişik kaplıcalardan izole edilen ve çeşitli yöntemlerle yeni birer termofilik tür oldukları ortaya konulan (Belduz vd., 2003; Dulger vd., 2004) 6 adet *Anoxybacillus gonensis* ve *Anoxybacillus kestanbolensis* suşunun (Tablo 7) sahip olabileceği lipaz/esteraz aktiviteleri kalitatif olarak tributirin testi ile araştırıldı. Kalitatif petri testi sonucunda çalışılan bütün türlerin hücredışı lipolitik aktiviteden sorumlu bir esteraz/lipaz enzimi salgıladıkları ortaya konuldu (Şekil 4).



Şekil 4. Çalışılan bakteri türlerinde hücredışı lipolitik aktivitenin kalitatif tayini
A) *A. kestanbolensis* K1, B) *A. kestanbolensis* K4^T, C) *A. gonensis* G2^T
D) *A. gonensis* A4, E) *A. gonensis* A7, F) *A. gonensis* A9

Petri üzerinde büyüyen koloniler etrafında Şekil 5'te de görüldüğü gibi berrak bölgelerin oluşması, çalışılan bakteri türlerinin tributirinin hidrolizinden sorumlu bir lipolitik aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Çalışmanın bundan sonraki bölümünde ise kalitatif lipolitik aktivite testinin pozitif sonuç verdiği bir tür olan *A. gonensis* A4 suşunun karboksimetilselüloz içeren Luria-Bertani sıvı besiyeri ortamında büyütülmesi ve büyüme eğrisinin elde edilmesi, uygun zamanda alınan hücrelerden hücredışı enzim özütü

hazırlanması ve bu özütlerdeki lipolitik aktivitenin karakterizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi.

3.1. *Anoxybacillus gonensis* A4 Suşunun Katı ve Sıvı Besiyeri Ortamlarında Büyütülmesi

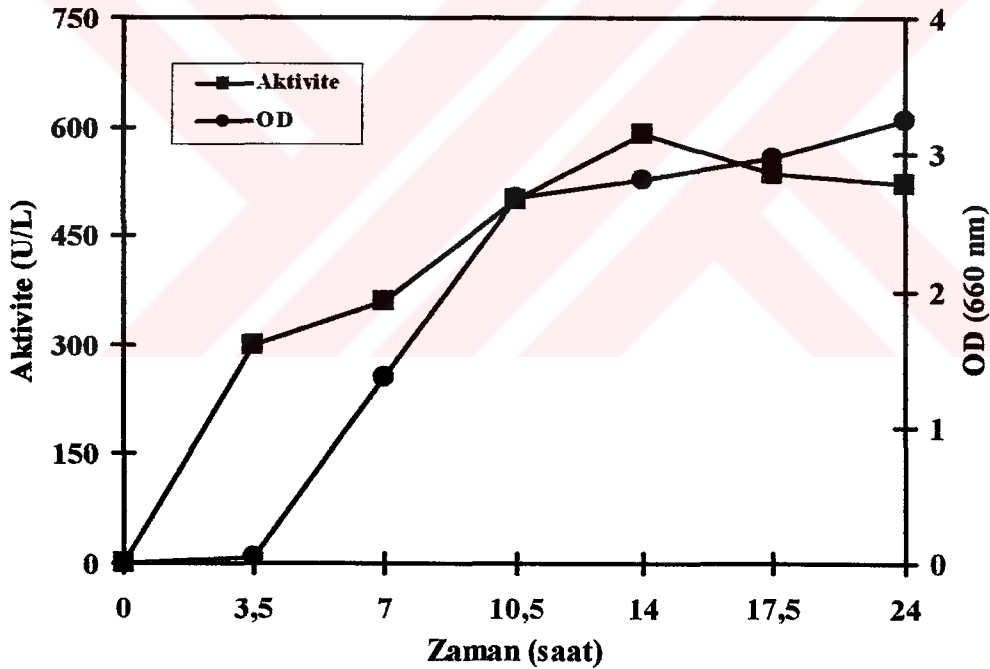
Stok kültürlerden sağlanan *A. gonensis* A4 suşu çizgi ekimle önceden hazırlanmış ve sterilize edilmiş Luria-Bertani agar katı besiyeri ortamına (LBA) aseptik olarak transfer edildikten sonra 60 °C de inkübatörde bir gece bekletilerek büyütüldü. *A. gonensis* A4 suşunun koloni oluşturmaktan çok katı besiyeri üzerine yayılarak tabaka oluşturmak suretiyle büyüdüğü gözlemlendi.

A. gonensis A4 suşunun sıvı besiyeri ortamında büyütülmesi ise % 0,3 (w/v) olacak şekilde karboksimetilselüloz ilavesi ile oluşturulan LB sıvı besiyeri ortamında gerçekleştirildi. Bu şekilde hazırlanan sıvı besiyeri ortamında büyütülen *A. gonensis* A4 suşunun kültür ortamından belli periyotlarda alınan küçük miktarlar kullanılarak zamana bağlı hem optik yoğunluk hem de kantitatif lipolitik aktivite denemeleri gerçekleştirildi. Böylelikle, *A. gonensis* A4 suşu için belirtilen besiyeri ortamındaki büyüme eğrisi elde edildi ve zamana bağlı olarak lipolitik aktivitenin değişimi gözlemlendi (Şekil 5). Lipolitik aktivitenin tayininde substrat olarak *p*-nitrofenilbutirat kullanıldı ve zamana bağlı aktivite eğrisinin zamana bağlı optik yoğunluk eğrisi ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Bu sonuca göre, *A. gonensis* A4 suşunun karboksimetilselüloz'lu ortamda inkübasyonunun 14. saatinde optik yoğunluğun ve lipolitik aktivitenin (600 U/L) maksimumuna ulaştığı gözlemlendi.

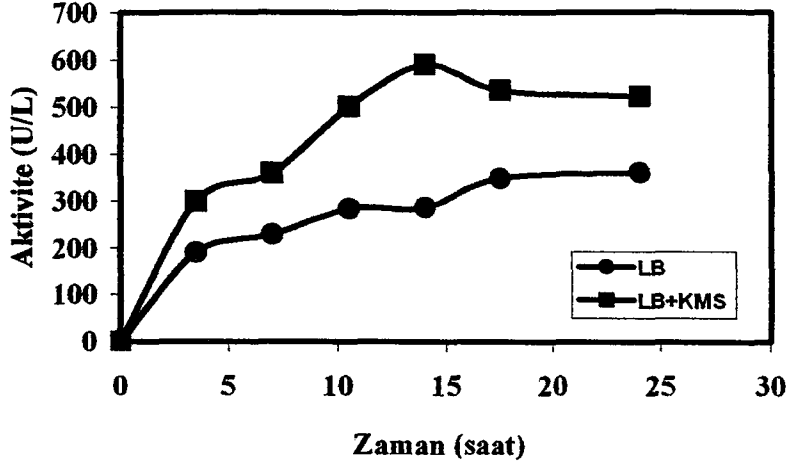
Ayrıca, karboksimetilselüloz'un hücre dışı lipolitik aktivite üzerine katkısının ortaya konması için *A. gonensis* A4 suşunun sadece LB sıvı besiyeri ortamında ve % 0,3 (w/v) karboksimetilselüloz içeren LB sıvı besiyeri ortamında büyütülmesi sırasında kültür ortamlarından belli periyotlarda alınan küçük miktarlardan hazırlanan hücre dışı özütlerde lipolitik aktivite tayini yapıldı. Buna göre, karboksimetilselüloz içeren ortamlarda büyüyen *A. gonensis* A4 suşunda lipolitik aktivitenin daha yüksek olduğu (yaklaşık 2 kat) gözlemlenmiştir (Şekil 6).

3.2. Hücre dışı Enzim Özütünün Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

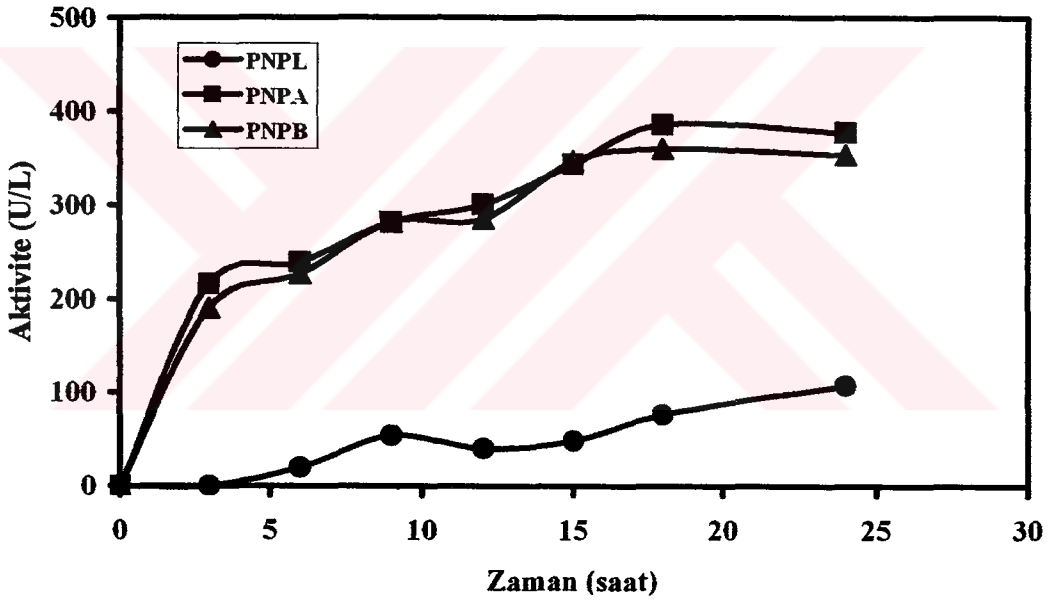
A. gonensis A4 suşundan hazırlanan hücre dışı özütlerdeki lipolitik aktiviteden sorumlu enzimin, substrat özgünlüğünün spektroskopik olarak belirlenmesi amacıyla *p*-nitrofenil asetat (PNPA), -butirat (PNPB) ve -laurat (PNPL) gibi *p*-nitrofenil (PNP) esterleri kullanıldı. Sıvı kültür ortamında büyütülen kültürden 24 saat boyunca belirli periyotlarda küçük hacimler alınarak bu örneklerin her birinin PNP esterlerini hidrolizleme kapasiteleri incelendi. Her üç PNP esteri durumunda da 24. saatte kültür ortamından alınarak hazırlanan hücre dışı özütlerin, bu esterleri hidrolizleme kapasitesinin en yüksek olduğu ancak PNPA ve PNPB gibi kısa zincirli esterlerin hidrolizinin PNPL gibi yüksek zincirli bir ester hidrolizine göre yaklaşık olarak 5 kat daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 7).



Şekil 5. *A. gonensis* A4 suşunun karboksimetilselüloz içeren LB besiyeri ortamındaki büyüme eğrisi ve lipolitik aktivitenin büyüme zamanına bağlı olarak değişimi profili



Şekil 6. Karboksimetilselüloz'un *A. gonensis* A4 suşu hücre dışı özütündeki lipolitik aktiviteye etkisi



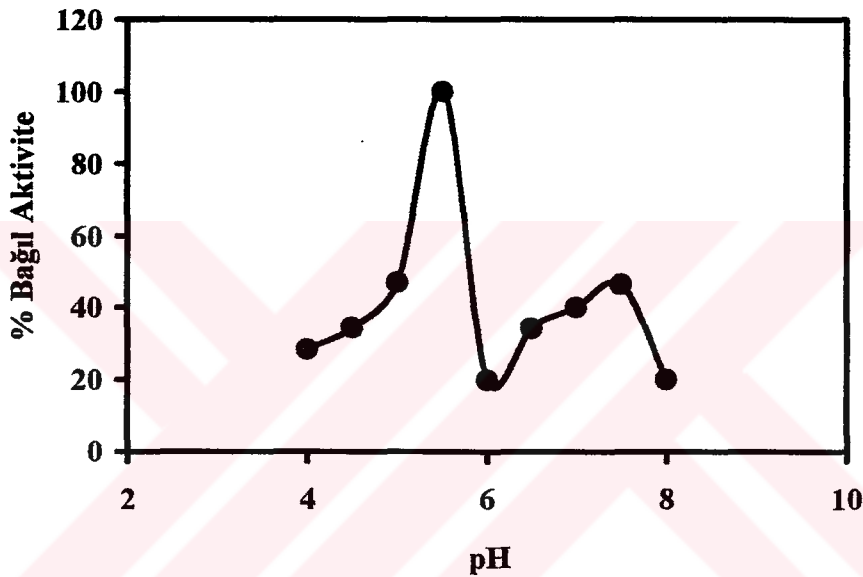
Şekil 7. *A. gonensis* A4 suşu hücre dışı enzim özütünün substrat özgünlüğü

3.3. Esterolitik Aktivitenin Karakterizasyonu

A. gonensis A4 suşundan hazırlanan hücre dışı özütlerdeki lipolitik aktiviteden sorumlu enzimin daha detaylı bir şekilde karakterizasyonu için, özütlerdeki lipolitik aktivite üzerine pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, protein konsantrasyonu, metal iyonu ve genel lipaz/esteraz inhibitör ve aktivatörlerinin etkisi incelendi. Ayrıca, özütlerdeki lipolitik aktiviteden sorumlu enzimin pH ve ısıl kararlılığı da belirlendi.

3.3.1. Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

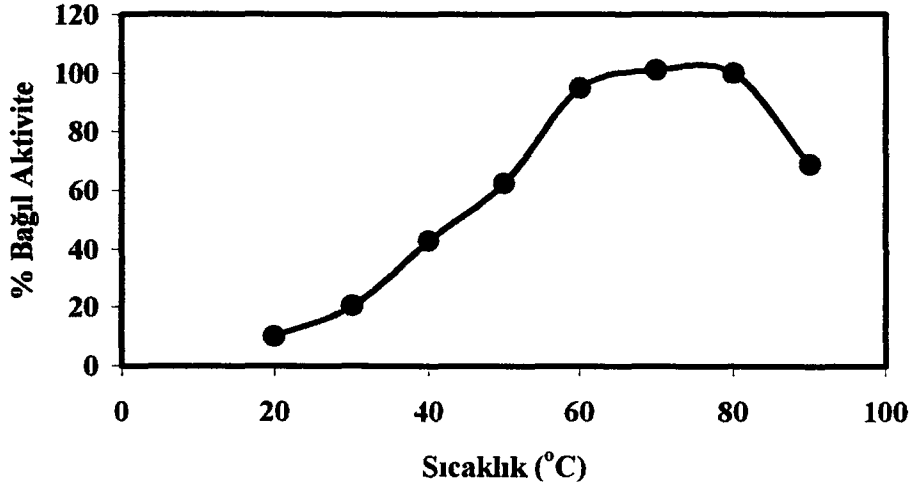
A. gonensis A4 suşundan hazırlanan hücre dışı enzim özütündeki esterolitik aktivitenin en yüksek etkinlik gösterdiği pH değerinin bulunması amacıyla farklı pH değerlerine sahip tamponların kullanımıyla enzim aktiviteleri belirlenerek pH değerlerine karşılık gelen aktivitelerle bir pH-% Bağlı Aktivite eğrisi elde edildi (Şekil 8). Buna göre elde edilen eğri tipik bir pH-Aktivite eğrisinden farklı olarak iki farklı pH değerinde pik vermektedir.



Şekil 8. Esterolitik enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

3.3.2. Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

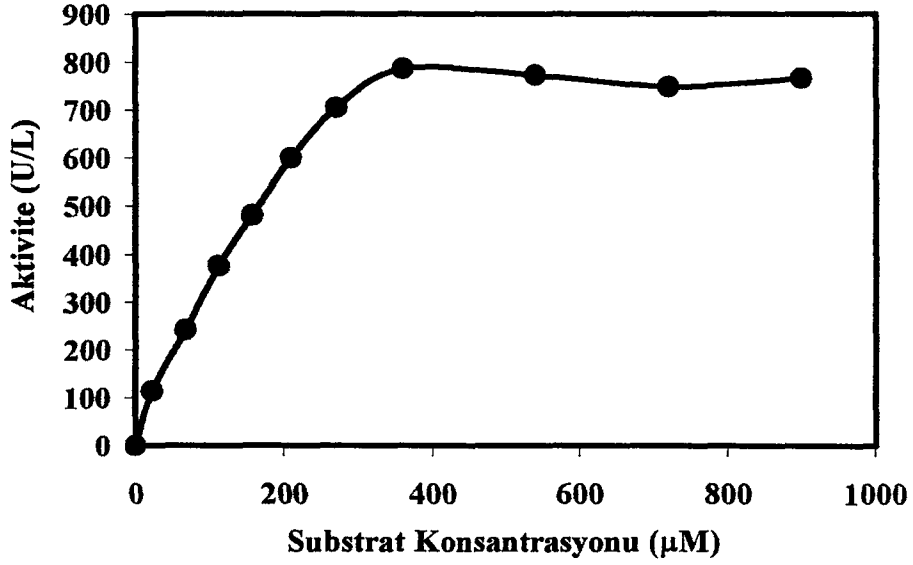
A. gonensis A4 suşundan hazırlanan hücre dışı enzim özütündeki esterolitik aktivitenin en yüksek etkinlik gösterdiği sıcaklık değerinin bulunması amacıyla 20-90 °C sıcaklık değerlerindeki enzim aktiviteleri belirlenerek sıcaklık değerlerine karşılık gelen aktivitelerle bir sıcaklık-% Bağlı Aktivite eğrisi elde edildi (Şekil 9). Hesaplanan aktivite değerleri bu sıcaklık-aktivite eğrisinde yayvan bir çan eğrisi verdi ve bu eğriden *A. gonensis* A4 suşu esterolitik aktivitesinin 60-80 °C aralığında bir optimuma ulaştığı gözlemlendi. 80 °C'nin üzerinde ise enzim aktivitesinin tekrar % 70'lere düştüğü tespit edildi.



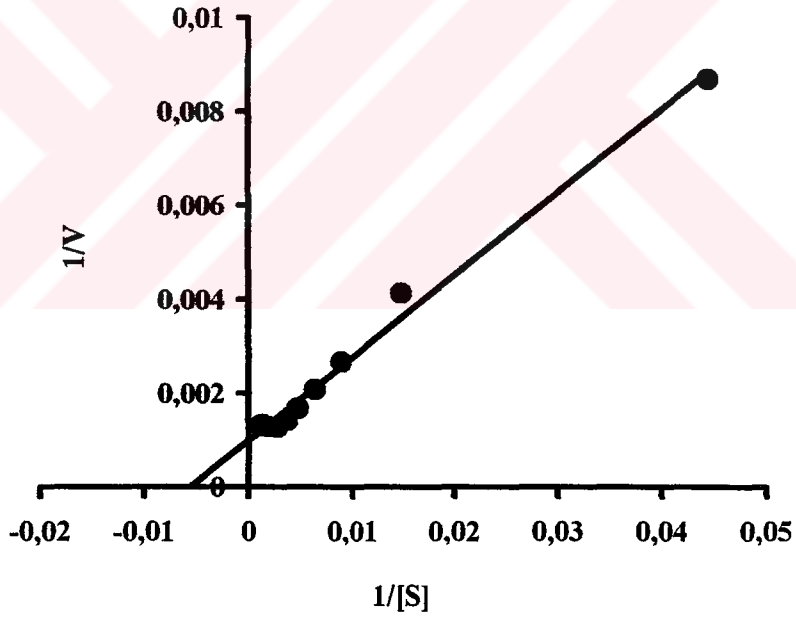
Şekil 9. Esterolitik enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

3.3.3. Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Protein miktarı sabit tutularak yapılan bu çalışmada, *A. gonensis* A4 suşunun sahip olduğu esterolitik enzim aktivitesinin çeşitli kinetik verilerle karakterize edilmesi amacıyla, nihai konsantrasyonu 0-900 μM aralığında olacak şekilde değişik konsantrasyonlardaki PNPB substratlarının hidrolizi reaksiyonu sonucunda *p*-nitrofenolat'ın oluşumu, 405 nm deki absorbans değişimleri ile ölçüldü. Aktivite hesaplamaları için, $\epsilon=1,457 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ (Lee, vd., 1999) alındı ve ilk hız değerleri bulunduktan sonra substrat doygunluk eğrisi (Şekil 10) ve Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 11) çizildi. Daha sonra bu eğrilerden yararlanılarak optimum enzim aktivitesinin sağlanacağı substrat konsantrasyonu, V_{maks} ve K_M değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk eğrisinden PNPB için V_{maks} ve K_M değerleri sırasıyla 800 U/L ve 176,5 μM olarak belirlendi. Substrat doygunluk eğrisi PNPB substratı varlığında incelendiğinde ise 360 μM , substrat konsantrasyonu değerine kadar aktivitede bir artışın gözlemlendiği ancak daha yüksek konsantrasyon değerlerinde ise enzimin doygunluk noktasına ulaşması nedeniyle aktivitenin bu optimum değerde sabit kaldığı gözlemlendi. Bu nedenle bundan sonraki karakterizasyon çalışmalarında optimum aktiviteyi sağlamak amacıyla reaksiyon karışımındaki substrat konsantrasyonu 360 μM olacak şekilde ayarlandı.



Şekil 10. *A. gonensis* A4 suşunun sahip olduğu esterolitik aktivite için PNPB substratı varlığındaki doygunluk eğrisi

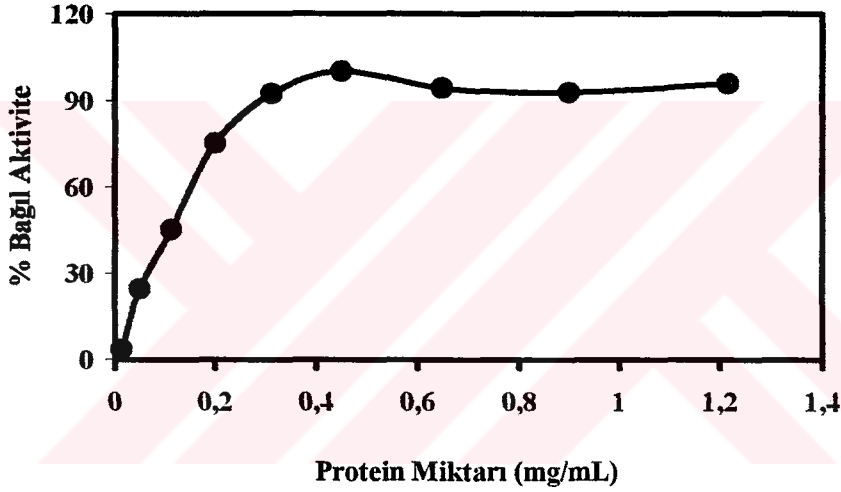


Şekil 11. *A. gonensis* A4 suşunun sahip olduğu esterolitik aktivite için PNPB substratı varlığındaki Leneweaver-Burk eğrisi

Her iki eğriden elde edilen bu kinetik veriler dikkatlice analiz edildiğinde birbirleri ile son derece uyumlu olduğu gözlenmektedir. Ayrıca, substrat doygunluk eğrisi hiperbolik bir karakter taşımakta olup Michealis-Menten kinetiğine uygunluk göstermektedir.

3.3.4. Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

A. gonensis A4 suşundan hazırlanan hücre dışı enzim özütündeki protein miktarı 6 mg/mL olarak bulunduktan sonra enzim aktivitesinin karakterizasyonu için esterolitik aktivite tayini yine PNPB substratı varlığında önceden anlatıldığı gibi yapıldı. Buna göre enzim aktivitesinin, reaksiyon karışımındaki 0,45 mg/mL'lik protein içeriğine kadar arttığı ve daha sonra sabit kaldığı gözlenmiştir (Şekil 12). Bu hiperbolik eğriden yararlanılarak bundan sonraki karakterizasyon çalışmaları için, yeterli esterolitik aktivitenin gözlenebileceği nihai protein konsantrasyonu 0,3 mg/mL olacak şekildeki reaksiyon karışımları kullanıldı.



Şekil 12. *A. gonensis* A4 suşunun sahip olduğu esterolitik aktivite üzerine protein miktarının etkisi

3.3.5. Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonu Etkisi

Esterolitik aktiviteye metal iyonlarının etkisini ortaya koymak amacıyla monovalent Na^+ ve K^+ iyonlarının, divalent Cu^{+2} , Ni^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} ve trivalent Cr^{+3} iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. Belirli konsantrasyonlardaki metal iyonları varlığında ve optimum şartlarda esterolitik aktivitedeki değişimler kaydedildi (Tablo 8). Kontrol olarak, metal iyonu ihtiva etmeyen reaksiyon karışımı kullanıldı ve böyle bir karışım için gözlenen aktivite değeri % 100 kabul edildi.

Tablo 8. *A. gonensis* A4 suşunun esterolitik aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi

Metal İyonu [1 mM]	% Kalan Aktivite
yok	100
Cu ⁺²	69
Ni ⁺²	80
Ca ⁺²	86
Mn ⁺²	96
Hg ⁺²	47
Zn ⁺²	59
Co ⁺²	65
Cd ⁺²	86
Cr ⁺³	53
K ⁺	115
Na ⁺	101

Metal iyonlarının esterolitik aktivite üzerine etkisi incelendiğinde farklı profillerle karşılaşılmaktadır. Mn⁺² ve Na⁺ durumunda esterolitik aktivite hemen hemen değişmezken, K⁺ durumunda % 15 lik bir artış, ancak denenen diğer metaller durumunda ise esterolitik aktivitede belirli oranlarda azalma gözlenmiştir.

3.3.6. Esterolitik Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

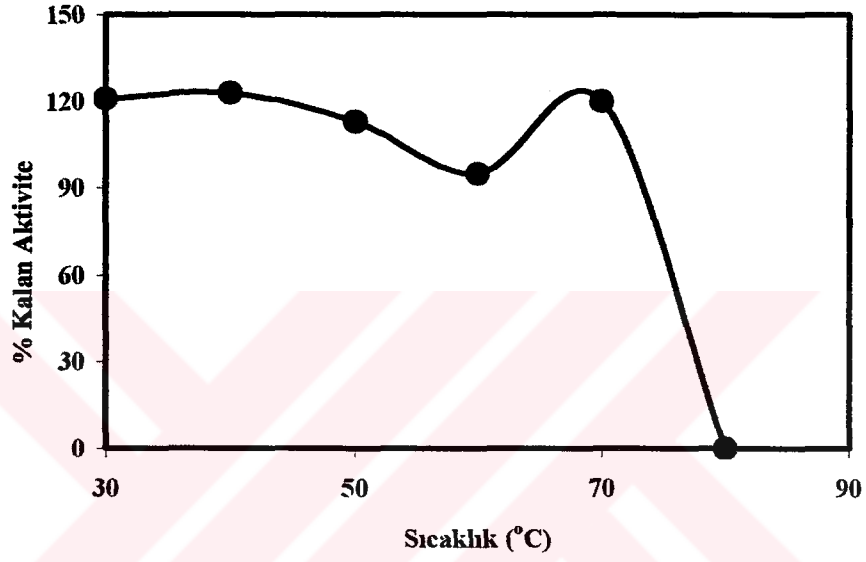
PMSF, DTT, Na-EDTA ve 2-merkaptetanol gibi kimyasal maddelerin *A. gonensis* A4 suşundan hazırlanan hücre dışı enzim özütünün sahip olduğu esterolitik aktivite üzerine etkisi incelendiğinde farklı iki profil ortaya çıkmaktadır (Tablo 9). PMSF ve Na-EDTA'nın artan konsantrasyonu ile aktivitenin inhibe olduğu, DTT ve 2-merkaptetanolün de denenen tüm konsantrasyonlarda aktivitede bir artışa sebep olduğu belirlendi.

Tablo 9. *A. gonensis* A4 suşunun sahip olduğu esterolitik aktivite üzerine bazı kimyasalların etkisi

Konsantrasyon (µM)	% Kalan Aktivite		Konsantrasyon (mM)	% Kalan Aktivite	
	PMSF	DTT		2-merkaptetanol	Na-EDTA
50	94	107	2	127	79
100	90	110	2.5	130	56
250	85	118	5	153	32

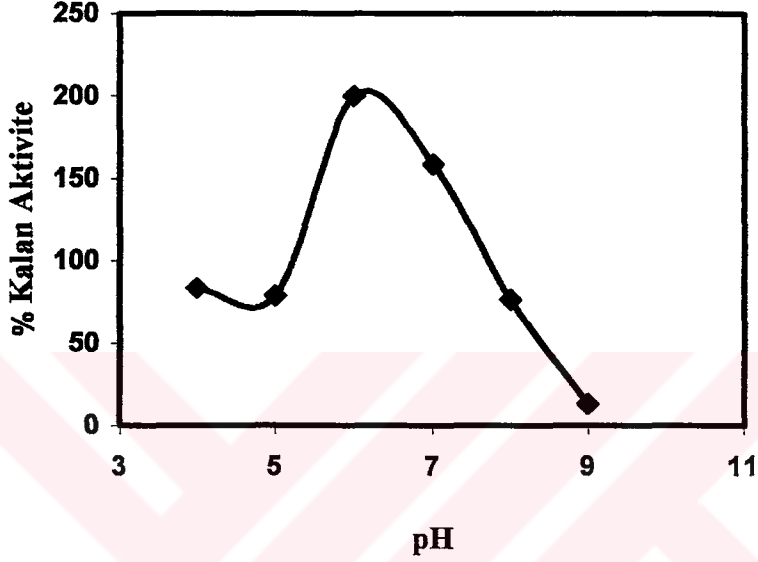
3.3.7. Esterolitik Enzim Aktivitesinin Isıl ve pH Kararlılığı

Esterolitik aktivitenin ısıl kararlılığının belirlenmesi amacıyla çalışmalar, 30-80 °C sıcaklık aralığında 10 °C'lik aralıklarla gerçekleştirildi. *A. gonensis* A4 suşunun sahip olduğu esterolitik aktivitenin 30 dakikalık inkübasyon süresi sonunda kontrol reaksiyon karışımının aktivite değeri ile karşılaştırıldığında 30-70 °C aralığında % 20 civarında arttığı ancak 60 °C de ise hemen hemen değişmediği gözlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Isıl kararlılık eğrisi

% Kalan enzim aktivitesinin pH ile değişiminin belirlenmesi için enzim özütünün 4 °C de 24 saat inkübe edildiği pH değerlerindeki gözlenen kalan aktiviteler pH değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 14). *A. gonensis* A4 suşundan hazırlanan hücre dışı enzim özütündeki esterolitik aktiviteden sorumlu enzim aktivitesi pH 6 ve 7' de inkübasyonla arttığı halde denenen diğer pH değerlerinde ihibisyon gözleildi.



Şekil 14. pH kararlılık eğrisi

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, Diyardin kaplıcalarından izole edilen ve yapılan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, kemotaksonomik ve genetiksel testler sonucunda *Anoxybacillus gonensis* (*A. gonensis*)'e ait yeni bir suş olduğu belirlenen (Belduz vd., 2003) *A. gonensis* A4 suşundan hazırlanan ham enzim özütünün sahip olduğu esterolitik aktivitenin varlığı çeşitli metodlarla ortaya kondu ve spektrofotometrik olarak enzimin biyokimyasal özellikleri ve davranışı incelendi. Isıya dayanıklı enzimlerin ısıya dayanıklı organizmalardan elde edildiği bilinmektedir ve bu şekilde bir çok uygulama mevcuttur (Kademi vd., 1999; Markossian vd., 2000). Termofillerin mezofillere göre yüksek ısı kararlılığı, onların biyoteknolojik uygulamalar için özel uygulama alanları bulmalarına yol açmıştır. Yaygın olarak, *Bacillus* türlerine ait birçok bakterinin lipolitik enzim ürettiği ve bu türlerden saflaştırılan enzimlerin endüstride çokça kullanıldığı bildirilmektedir.

Altı adet *Anoxybacillus gonensis* ve *Anoxybacillus kestanbolensis* suşunun (Tablo 7) esterolitik enzimleri içerdiğinin kalitatif delili olarak tributirini parçalaması gösterilebilir. Tributirin-agar testi sonucunda çalışılan bütün türlerin koloniler etrafında berrak bölgeler oluşturması çalışılan tüm suşların tributirini kullanabildiğinin ve dolayısıyla hidrolizleyebildiğinin göstergesidir (Şekil 5). Bu yöntemin, yine aynı enzimlerin klonlanmasını amaçlayan çalışmalarda bu enzimlerin genini içeren izolatların saptanmasında kullanılan önemli bir teknik olduğu bilinmektedir (Ihara vd., 1991; Longshaw vd., 2000; Henne vd., 2000; Huber vd., 2001).

Büyüme ortamının gerek hücre içi gerekse hücre dışı enzimlerin aktivasyonuna olan etkisi literatürlerde çok defa rapor edilmiştir. (Kademi vd., 1999; Choi vd., 2001). Lipazlar arayüzeyde aktivite gösteren enzimlerdir. Dolayısıyla yüzey aktif maddelerin ortamda bulunması enzim-substrat etkileşimini artırmaktadır. Bu nedenle karakterizasyon çalışmaları için uygun besiyeri belirlenmesi amacıyla değişik yüzey aktif maddeler içeren ortamlarda büyütülen *A. gonensis* A4'ten elde edilen hücre dışı özütlerden *p*-nitrofenilbutirat (PNPB)'ı hidrolizleme kapasitesinin karboksimetilselüloz içeren ortamda büyüyen kültürlerde en yüksek olduğu belirlendi (Şekil 7). *A. gonensis* A4 hücre dışı enzim özütü için yapılan substrat özgünlük çalışmaları, PNPB'ın hidrolizinden sorumlu enzimin bir esteraz olabileceği, dolayısıyla karboksimetilselülozun bu olumlu

etkisi esterolitik aktiviteyi stimüle edici bir karbon kaynağı olarak davranabileceğine atfedilebilir.

A. gonensis'in sergilediği esterolitik aktivitenin pH'ya bağımlılığı incelendiğinde optimum pH'ın 5,5 olduğu ancak pH 7,5'ta ise ikinci bir pikin varlığı gözlenmiştir (Şekil 9). Asidik pH optimumu, esterazların genel olarak asidik pH'larda maksimum aktivite gösterirken lipazların bazik pH'larda bir optimuma sahip olmaları ile ilişkilendirilebilir (Fojan vd., 2000; Bornscheuer, 2002). Bu sonuç da *A. gonensis* A4 hücre dışı enzim özütünün sergilediği hidrolitik aktivitenin esteraz aktivitesi olduğunu desteklemektedir. pH-% Bağıl Aktivite eğrisinde iki farklı pik gözlenmesi, çalışmanın hücre dışı ham özütte gerçekleştirilmesi nedeniyle farklı özellikler gösteren izoenzimlerin veya benzer reaksiyonları katalizleyebilen farklı enzimlerin varlığına atfedilebilir. Aktivitenin pH'ya karşı bu şekildeki davranışı farklı organizmalar ve farklı enzimler için de elde edilmiştir (Dincer vd., 2002). Daha sonraki karakterizasyon çalışmaları, bağıl aktivitenin %100 olduğu pH değeri olan pH 5,5'ta gerçekleştirilmiştir. Tsuboi ve arkadaşları (1996) *Candida albicans* A-714'nin hücre dışı özütünde optimum pH değeri 5,5 olan fakat Jung ve arkadaşları da (2003) *Bacillus megaterium* 20-1'dan optimum pH değeri 8,0 olan bir hücre dışı esterazı elde ettiklerini bildirmişlerdir. pH 6'da enzimin 24 saat bekletilmesi ile aktivitenin stimülasyonu gözlemlendi ancak optimum pH değeri pH 5,5'de enzimin kararlılığının düşük olduğu saptandı (Şekil 15).

A. gonensis A4 suşu hücre dışı enzim özütünün esteraz aktivitesi için optimum sıcaklığı *Bacillus* suşlarının sahip olduğu sıcaklık optimumu ile benzerlik göstermektedir (Emanuilova vd., 1993). Ayrıca, Kademi ve arkadaşları (2000) çalışmalarında *Bacillus circulans* esterazının da 60 °C civarında optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. *A. gonensis* A4'esterazının sıcaklık-aktivite profilinden optimum sıcaklığın 60-80 °C olduğu (Şekil 10), elde edilen sonuçların ısıya dayanıklı enzimlerin termofilik organizmalardan elde edildiği görüşü ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Enzimin ısı kararlılığı ile ilgili bulgular ise 80 °C de enzimin aktivitesini tamamıyla yitirdiğini ancak 70 °C gibi yüksek bir sıcaklığa kadar PNPB'nin hidrolizinden sorumlu enzimin sıcaklıkla aktive edildiğini, dolayısıyla enzimin yüksek bir ısı kararlılığına sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 14). Reaksiyon hızının artması, ortam viskozitesinin düşük olması, substrat çözünürlüğünün yüksek olması ve mikrobiyal kontaminasyonların minimuma inmesi gibi özelliklerinden dolayı yüksek sıcaklıklarda yürütülen enzim katalizli işlemler ilgi görmektedir ve bu sıcaklıklarda aktivitesini koruyabilen enzim arayışları devam

etmektedir. Bu çalışmada, *A. gonensis* A4'ün sahip olduğu esterolitik aktivitenin sıcaklık artışı ile yaklaşık % 20 oranında artış göstermesi bu enzimin endüstriyel ihtiyaçlara katkıda bulunabilecek bir potansiyel olabileceğini ortaya koymaktadır.

Enzimin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla yağ asidi uzunluğu birbirinden farklı 3 PNP esteri kullanıldı. Bakterinin büyüme ortamından 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarında alınan numunelerden hazırlanan enzim özütleriyle gerçekleştirilen spektrofotometrik aktivite tayin çalışmaları sonucunda, *A. gonensis* A4 ham enzim özütünün sahip olduğu hidrolitik aktivitenin kısa zincirli substratları parçalama kapasitesinin daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. PNPL için elde edilen aktivite değeri PNPA ve PNPB substratları için elde edilen aktivite değerinden yaklaşık 5 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8). Bu sonuç, *A. gonensis* A4 suşundan hazırlanan hücre dışı özütlerdeki hidrolitik aktiviteden sorumlu enzimin kısa zincirli esterlerin hidrolizini katalizeleyen bir esteraz olabileceğini göstermektedir (Verger, 1997; Kademi vd., 1999; Teo vd., 2003) ve daha sonraki karakterizasyon çalışmalarında da kısa zincirli bir PNP esteri olan PNPB kullanılmıştır.

Protein miktarı sabit tutularak elde edilen substrat doygunluk eğrisinden V_{maks} ve K_M değerleri sırasıyla 800 U/L ve 176,5 μ M olarak belirlendi ve bu sonuçların Lineweaver-Burk eğrisinden elde edilen kinetik verilerle uyumlu olduğu tespit edildi (Şekil 11 ve 12).

A. gonensis A4 hücre dışı özütünün sergilediği enzimatik aktivitenin protein konsantrasyonuna bağımlılığının incelendiği çalışmada, *A. gonensis* A4 suşu ham enzim özütünün 0,45 mg/mL'lik protein içeriğine kadar esteraz aktivitesinin arttığı daha yüksek protein konsantrasyonlarında ise katalitik aktivitenin protein miktarından bağımsız olduğu belirlendi (Şekil 13). Sonuç olarak maksimum protein konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra PNPB'nin parçalanma hızının protein miktarından bağımsız bir şekilde gerçekleştiği söylenebilir. Lipaz/esteraz gibi hidrolaz sınıfı bir enzim olan depolimerazlarla yapılan bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, substratın hidrolizi maksimum bir değere ulaştıktan sonra artık hidrolizlenme hızının protein miktarından bağımsız olarak gerçekleştiği belirtilmiştir (Tomasi vd., 1996; Colak vd., 2004).

Metal iyonlarının, genellikle spesifik bölgelerdeki negatif yüklü aminoasit birimlerine bağlanarak enzimin aktif ve kararlı yapısını korumasında etkili bir rol oynadığı bilinmektedir (Şişik, 2003). Aktivite üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından çalışılan konsantrasyon değerinde sadece K^+ iyonunun aktiviteyi stimüle etmesi, *A. gonensis* A4 hücre dışı özütünün sahip olduğu katalitik aktivitenin maksimum düzeyde

gözlemlenebilmesi için K^+ iyonlarının gerekliliğini göstermektedir (Tablo 8). Şelatlayıcı olarak davranan EDTA'nın artan konsantrasyonuyla aktivitenin düşmesi esterazın bir metaloenzim olduğuna işaret etmektedir. Hg^{+2} bir tiyol grubu reaktifidir (Teo vd., 2003) ve Hg^{+2} iyonlarının aktiviteyi inhibe etmesi hücre dışı özütün PNPB hidrolizleyebilmesi için -SH gruplarının gerekliliğini ortaya koymaktadır. DTT'nin aktivite üzerine etkisinin incelendiği çalışmada ise denenen tüm konsantrasyonlarda DTT'nin aktiviteyi stimüle ettiği belirlendi. Disülfür köprüsü indirgeyicisi olan (Smialowski-Fleter vd., 2000) DTT'nin bu davranışı disülfür köprülerinin aktivite için gerekli olmadığını göstermektedir. PMSF aktif bölgedeki serin amino asidini sülfolayarak enzim aktivitesini (Cornec vd., 1998) inhibe eder. *A. gonensis* A4 esteraz aktivitesinin PMSF ile inhibisyonu serinin katalitik üçlünün bir parçası olduğunun göstergesidir (Teo vd., 2003; Hiol vd., 1999) (Tablo 9).

Bütün bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, çalışılan bütün bakteriler büyüme ortamına lipolitik aktiviteden sorumlu bir hücre dışı enzim salgıladığı ve bunlardan *A. gonensis* A4 suşundan hazırlanan enzim özütünün daha çok kısa zincirli *p*-nitrofenil esterlerinin hidrolizini katalizleyen yüksek oranda ısı kararlı esteraza sahip olduğu görülmektedir.

5. ÖNERİLER

Enzimlerin endüstride en çok kullanıldıkları alan kuşkusuz organik sentezlerdir. Sentez reaksiyonları genellikle yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücü bulunan ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, bu amaca hizmet etmek için kullanılacak bir enzim yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücü ortamlarında kararlı olması ve bu şartlarda katalitik fonksiyonunu yüksek oranda gerçekleştirmesi gerekmektedir. Esterazlar, sentetik kimya yanında ilaç, gıda ve deterjan sanayiinde de en çok kullanılan enzimlerdendir. Bu açıdan ele alındığında *A. gonensis* A4 hücre dışı enzim özütünün sahip olduğu hidrolitik aktiviteden sorumlu esteraz enziminin yüksek ısı kararlılığına sahip olması nedeniyle organik sentezlerde ve yukarıda belirtilen sanayi kollarında kullanılması uygun olabileceği sonucuna varabiliriz. Ancak bunun için enzimin saflaştırılıp daha ileri derecede karakterize edilmesi yanında organik çözücü ortamlarındaki kararlılığı ve kimyasal sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği ayrıntılı bir şekilde ele alınmalıdır. Ayrıca, *A. gonensis* A4 hücre dışı enzim özütünün sahip olduğu esteraz aktivitesinin metal iyonu ve inhibitörlere karşı davranışı, bu enzimin farklı sanayi kollarında, farklı reaksiyonların katalizinde kullanımına olanak sağlayabilecek türden olabileceğini göstermektedir.

Ayrıca, esterolitik aktiviteden sorumlu olan bu enzimi kodlayan genin DNA sırası bulunarak bir ekspresyon vektörüne klonlanıp *E. coli*'ye aktarılması sonucunda aşırı ekspresyonu da sağlanabilir ki bu da enzimin daha az maliyetle daha çok üretilmesi anlamına gelmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abernathy, C. O. ve Casida, J. E., 1973. Pyrethroid Insecticides: Esterase Cleavage in Relation to Selective Toxicity, Science, 179, 1235-1236.
- Albasi, C. ve Riba, J. P., 1997. Enzymatic Hydrolysis of Sunflower Oil: Characterization of Interface, J. Chem. Technol. Biot., 69, 329-336.
- Amelunxen, R. E. ve Lins, M., 1968. Comparative Thermostability of Enzymes from *Bacillus Stearotherophilus* and *Bacillus cereus*, Arch. Biochem. Biophys., 125, 765-771.
- Arpigny, J. L. ve Jaeger, K. E., 1999. Bacterial Lipolytic Enzymes: Classification And Properties, Biochem. J., 343, 177-183.
- Ash, C., Farrow, A. E., Wallbanks ve Collins, M. D., 1991. Phylogenetic Heterogeneity of the Genus *Bacillus* Revealed by Comparative Analysis of Small-Subunit-Ribosomal RNA Sequences, Lett. Appl. Microbiol., 13, 265-269.
- Bañó, M. C., González-Navarro H. ve Abad C., 2003. Long-Chain Fatty Acyl-CoA Esters Induce Lipase Activation in the Absence of a Water-Lipid Interface, BBA-Mol. Cell Biol. L., 1632, 55-61.
- Bauman, M., Hauer, B. H. ve Bornscheuer, U. T., 2000. Rapid Screening of Hydrolases for the enantioselective conversion of 'difficult-to-resolve' substrates, Tetrahedron, 11, 4781-4790.
- Becker, P., Abu-Reesh I., Markossian, S., Antranikian, G. ve Markl, H., 1997. Determination of the Kinetic parameters during Continuous cultivation of the Lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on Olive Oil, Appl. Microbiol. Biot., 48, 184-190.
- Becker, P., Köster, D., Popov, MN., Markossian, S., Antranikian, G. ve Markl, H., 1999. The Biodegradation of Olive Oil and the Treatment of Lipid-Rich Wool Scouring Wastewater Under Aerobic Thermophilic Conditions, Water Res., 33, 653-660.
- Belduz, A. O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-forming Bacterium, Int. J. Syst. Evol. Micr., 53, 1315-1320.
- Benayoud, F., Abouabdellah, A., Richard, C., Bonnet-Delpon, D., Begue, J. P., Levasseur, D., Boutaud, O., ve Schuber, F., 2000. Trifluoromethyl Ketones Derived From Squalene: Inhibition of the Cholesterol Biosynthesis in HepG2 Cells. Tetrahedron Lett., 41, 6367-6370.

- Berto, P., Belingheri, L. ve Dehorter, B., Production and Purification of a Novel Extracellular Lipase from *Alternaria brassicicola*, Biotechnol. Lett., 19 (1997) 533-6.
- Bhadbhade, B. J., Şarnaik, Ş. Ş., Kanekar, P. P., 2002. Biomineralization of an Organophosphorus Pesticide, Monocrotophos, by Soil Bacteria, J. Appl. Microbiol., 93, 224-223.
- Bhardwaj, K., Raju, A. ve Rajasekharan, R., 2001. Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran. A New Member of the (Phospho) Lipase Family, Plant Physiol., 127, 1728-1738.
- Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J., 1999. Hydrolases in Organic Synthesis-Regio- and Stereoselective Biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim.
- Bornscheuer, U.T., 2000. Enzymes in Lipid Modification, WILEY-VCH, Weinheim, Germany.
- Bornscheuer, U.T., 2002. Microbial Carboxyl Esterases: Classification, Properties and Application in Biocatalysis, FEMS Microbiol. Rev., 26, 73-81.
- Brock, T.D., 1986. Notes on the Ecology of Thermophilic Archae Bacteria, Syst. Appl. Microbiol., 17, 213-215.
- Cardenas, J., Alvarez, E., Castro-Alvares, M-S., Sanchez-Montero, J-M, Valmaseda, M., Elson, S. W., Sinisterra J-V., 2001. Screening and Catalytic Activity In Organic Synthesis of novel Fungal and Yeast Lipases, J. Mol. Catal. B-Enzym., 14, 111-23.
- Casida, J.E., 1980. Pyrethrum Flowers and Pyrethroid Insecticides, Environ. Health Persp., 34, 189-202.
- Casida, J.E., Gammon, D. W., Glickman, A. H., ve Lawrence, L. J., 1983. Mechanisms of Selective Action of Pyrethroid Insecticides, Annu. Rev. Pharmacol., 23, 413-438.
- Chahinian, H., Vanot, G., Ibrık, A., Rugani, N., Sadra, L. ve Comeau L. C., 2000. Production Extracellular Lipase by *Penicillium cyclopium* Purification and Characterization of Partial Acylgliserol lipase, Biosci. Biotech. Bioch., 64, 215-22.
- Choi, A. R., Yoo, S. K. ve Kim, E. J., 2000. Cloning, Sequencing and Expression in *Escherichia coli* of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiol. Lett., 8, 186-235.
- Choi, Y. J. ve Lee, B. H., 2001. Culture Conditions for the Production of Esterase from *Lactobacillus casei* CL96, Bioproc. Biosyst. Eng., 24, 59-63.

- Colak, A. ve Güner, S., 2004. Polyhydroxyalkanoate Degrading Hydrolase-Like Activities by *Pseudomonas* sp. Isolated from soil., Int. Biodeter. Biodegr., 53, 103-109.
- Colman, M. H. ve Macrae, A. R. 1980. UK Patent no. 1577933.
- Cornec, L., Robineau, J., Rolland, J. L., Dietrich, j. ve Barbier G., 1998. Thermostable Esterases Screened on Hyperthermophilic Archaeal and Bacterial Strains Isolated from Deep-Sea Hydrothermal Vents: Characterization of Esterase Activity of a Hyperthermophilic Archaeum, *Pyrococcus abyssi*, J. Mar. Biotechnol., 6, 104-110.
- Das, R. ve Gerstein, M., 2000. The Stability of Thermophilic Proteins: A Study Based on Comprehensive Genome Comparison, Funct. Integr. Genomics, 1, 76-88.
- Davies, J. H., 1985. The Pyrethroids: An Historical Introduction, In The Pyrethroid Insecticides. J. P. Leahey, Taylor & Francis Inc., Philadelphia.
- Demeyer, D., Hooze J. ve Mesdom H., 1974. Specificity of Lipolysis During Dry Sausage Ripening, J. Food Sci., 39, 357-362.
- Dharmsthiti, S. ve Luchai, S., 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027, FEMS Microbiol. Lett., 179, 241-246.
- Dincer, B., Colak, C., Aydin, N., Kadioglu, A. and Güner S., 2002. Characterization of Polyphenoloxidase from Medlar Fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae), Food Chem., 77, 1-7.
- Dulger, S., Demirbag, Z. ve Belduz, A. O., 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. And *Anoxybacillus Kestanbolensis* sp. nov., Int. J. Syst. Evol. Micr., Baskıda.
- Eggert, T., Pouderoyen, G. V., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B. W. ve Jeager K., 2002. Biochemical properties and three dimensional structures of two extracellular Lipolytic Enzymes from *Bacillus Subtilis*, Colloids Surfaces B., 26, 37-46.
- Emanuilova, E., Kamboruova, M., Dekovska, M., Manolov, R., 1993. Thermoalkalophilic Lipase-Producing *Bacillus* Selected by Continuous Cultivation, FEMS Microbiol. Lett. 108, 247-250.
- Faber, K., 1997. Biotransformations in Organic Chemistry, 3rd Edn. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N. ve Petersen, S.B., 2000. What distinguishes an Esterase from a Lipase: A Novel Structural Approach, Biochimie, 82, 1033-1041.
- Gandgi, N. N., Patil, N. S., Sawant, S. B. Ve Joshi J. B., 2000. Lipase- Catalysed Esterification, Catal- Rev.-Sci. Eng., 42, 2, 439-480.

- Gaughan, L. C., Engel, J. L. ve Casida, J. E., 1980. Pesticide interactions: Effects of Organophosphorus Pesticides on the Metabolism, Toxicity and Persistence of Selected Pyrethroid Insecticides, Pestic. Biochem. Phys., 14, 81-85.
- Godfrey, T. ve West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology, In: Godfrey, T., West, S., Industrial Enzymology 2nd ed., Stockton Pres., New York.
- Gupta, R. C. ve Dettbarn, W. D., 1993. Role of Carboxylesterases in the Prevention and Potentiation of N-Methylcarbamate Toxicity, Chem. Biol.Interact., 87, 295-303.
- Haney, P. J., Badger, J. H., Buldak, G. L., Reich, C.I., Woese, C.R. ve Olsen, G., 1999. Thermal Adaptation Analysed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3578-3583.
- Harrison, E. H., 1998. Lipases and Carboxylesterases Possible Roles in the Hepatic Metabolism of Retinol, Annu. Rev. Nutr., 18, 259-276.
- Harrison, E. H., 2000. Lipases and Carboxylesterases Possible Roles in the Hepatic Utilization of Vitamin A, J. Nutr., 130, 340-344.
- Harold, J. A. ve Ottea, J. A., 2000. Characterization of Esterases Associated with Profenofos resistance in the Tobacco Budworm, *Heliothis virescens* (F.), Arch. Insect Biochem. Physiol., 45, 47-59.
- Henne, A., Schmitz, R., Bömeke, M., Gottschalk, G. ve Daniel, R., 2000. Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microb., 66 (3113-3116).
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Druet, D., Comeau, L., 1999. Production, Purification and Characterization of an extracellular Lipases from *Hiemalis f. Hiemalis*, Enzyme Microb. Tech., 25, 80-87.
- Hirose, Y., Karia, K., Sasaki, I., Kurono, Y., Ebiike, H., Achiwa, K., 1992. Drastic Solvent Effect on Lipase-Catalysed Enantioselective Hydrolysis of Prochiral 1,4-dihidropyridines, Tetrahedron Lett., 33, 7157-7160.
- Hotelier, T., Renault, L., Cousin, X., Negre, V., Marchot, P. ve Chatonnet, A., 2004. Esther, the Database of the α/β -Hydrolase Superfamily of Proteins, Nucleic Acids Research, 32, 145-147.
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin S. ve Eberl, L., 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility, Genetics and Molecular Biology, Microbiology, 147, 2517-2528.

- Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T. ve Yamada, Y., 1991. Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* species, J. Biol. Chem., 27, 18135-18140.
- Jaeger K. E. ve Reetz, M. T., 1998. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology, Trends Biotechnol., 16, 396-403.
- Janssen, P. H., Monk, C. R. ve Morgan, H. W., 1994. A Thermophilic *Bacillus* sp., and a Continious Assay of its *p*-nitrophenylpalmitate Esterase Activity, FEMS Microbiol. Lett., 120, 195-200.
- Jung, y., Lee, J., Sung. C., Oh, T. K., Kim, H. K., 2003. Nonionic Dtergent-Induced Activation of an Esterase from *Bacillus megaterium* 20-1, J. Mol. Catal. B-Enzym., 26, 223-229.
- Kademi, A., Ait- Abdelkader, N., Fakhreddine. L. ve Baratti, J. C., 1999. A Thermostable Esterase Acrivity From Newly İolated Moderate Thermophilic Bacterial Strains, Enzyme Microb. Tech., 24, 332-338.
- Kademi, A., Ait- Abdelkader, N., Fakhreddine. L. ve Baratti, J. C., 2000. Purification and Characterization of a Thermostable Esterase From The Moderate Thermophilic Bacterium *Bacillus circulans*, Appl. Microbiol Biot., 54, 173-179.
- Kao, L.N., Motoyama ve Dauterman, W., 1985. Multiple Forms of Esterase in Mouse, Rat, and Rabbit Liver, and their Role in Hydrolysis of Organophosphate and Pyretroid İnsecticides, Pestic, Biochem. Phys. 23, 66-73.
- Kawamoto, T., Sonomoto. K. ve Tanaka, A., 1987. Esterification in Organic Solvents: Selection of Hydrolases and Effects of Reaction Conditions, Biocatalysis, 1, 137-145.
- Kazlauskas, R. J. ve Bornscheuer, U. T., 1998. Biotransformation with Lipase, Biotechnology vol. 8, VCH, New York.
- Koffler, H., 1957. Protoplasmic Differences Between Mesophiles and Thermophiles, Bacterial Rev., 21, 227-232.
- Kristjansson, J. K., 1989. Thermophilic Organisms as Sources of Thermostable Enzymes, Trends Biotechnol., 7, 349.
- Leblanc, M. J., Gavino, V., Pérea, A., Yousef, i. M., Lévy, E. ve Tuchweber, B., 1998. The Role of Dietary Choline in the Beneficial Effects of Lecithin on the Secretion of Biliary Lipids in Rats, BBA, 1393, 223-234.
- Lee. D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., 1999. Suhartono, M. ve Pyun, Y., Isolation and Characterization of a Thermophilic Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiol. Lett., 179, 393-400.

- Lee, D., Kim, H., Lee, K., Kim, B., Choe, E., Lee, H., Kim, D. ve Pyun, Y., 2001. Purification and Characterization of Two Distinct Thermostable Lipases from the Gram-Positive Thermophilic Bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1, Enzyme Microb. Tech., 29, 363-371.
- Longshaw, M., Farrell, M., Wright, D. ve Holland, T., 2000. Identification of a Second Lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases, Microbiology, 146, 1419-1427.
- Lopes, M. F. S., Cunha, A. E., Clemente, J. J., Carrondo M. J. T. ve Crespo, M. T. B., 1999. Influence of Environmental Factors on Lipase Production by *Lactobacillus plantarum*, Appl. Microbiol. Biot., 51, 249-254.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Luria, S.E., Adam, J.N., and Teng, R.C., 1960. Transduction of Lactose Utilizing Ability Among Strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the Properties of the Transducing Phage Particles, Virology, 12, 348-390.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 2000. Brock Biology of Microorganisms, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Markossian, S., Becker, P., Markl, H. ve Antranikian, G., 2000. Isolation and Characterization of Lipid-Degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an Icelandic Hot Spring, Extremophiles, 4, 365-371.
- Martinelle, M., Holmquist, M. ve Hult, K., 1995. On the Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase A and B as Compared with *Humicola lanuginosa* Lipase, BBA., 272-276.
- Matsurama, M., Katakura, T., Imanaka, T. ve Aiba, S., 1984. Enzymatic and Nucleotide Sequence Studies of a Kanamycin- Inactivating Enzyme Encoded by a Plasmid from Thermophilic Bacilli in Comparison with that Encoded by Plasmid pUB110, J. Bacteriol., 160, 13-420.
- Nawani, N. ve Kaur, J., 2000. Purification, Characterization and Thermostability of a Lipase from a Thermophilic sp. J33, Mol. Cell Biochem., 206, 91-6.
- Ollis, D. L., Shea, E., Cygler, M. B., Dijkstra, B. ve Frolow, F., 1992. The α/β Hydrolase Fold, Protein Eng., 5, 197-211.
- Oliver, J., Naidoo, A., Vandin, L., Pugnaghi, F., Gatehouse, D., ve Comelli, R., 2000. Carboxylesterases, a Key Factor in Evaluating Potential Genotoxicity of Trinem Antibiotics, Mutagenesis, 15, 45-55.
- Owusu, R. K. ve Cowan, D. A., 1989. Correlation Between Microbial Protein Thermostability and Resistance to Denaturation in Aqueous: Organic Solvent Two-Phase Systems, Enzyme Microb. Tech., 11, 568-574.

- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a Novel Anaerobic, Alkaliphilic, Moderately Thermophilic Bacterium from Manure, and Description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov., Int. J. Syst. Evol. Micr., 50, 2109-2117.
- Pimentel, M. C., Krieger, N., Coelho, L. C., Fontana, J. O., Melo, E. H., Ledingham, W. M. ve Lima-Filho, J. L., 1994. Lipase from a Brazilian Strain of *Penicillium citrinum*, Appl. Biochem. Biotech., 49, 59-74.
- Pleiss, J., Fisher, M., Peiker, M., Thiele, C. ve Schmid, R. D., 2000. Lipase Engineering Database Understanding and Exploiting Sequence-Structure-Function Relationships, J. Mol. Catal. B- Enzym., 10, 491-508.
- Quinn, D. M., 1987. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics and Virtual Transition States, Chem.Rev., 87, 955-979.
- Rainey, F. A., Fritze, D. ve Stackebrandt, E., 1994. The Phylogenetic Diversity of Thermophilic Members of the Genus *Bacillus* as Revealed by 16S rDNA Analysis, FEMS Microbiol. Lett., 115, 205-212.
- Rathi, P., Saxena, R. K. ve Gupta, R., 2001. A Novel Alkaline Lipase from *Burkholderia cepacia* for Detergent Formulation, Process Biochem., 37, 187-192.
- Rua, M. L., Schmidt- Dannert, C., Wahl, C., Sprauer A. ve Schmade, R. D., 1998. Thermo Alkalophilic Lipase of *Bacillus thermocatelunatus* Large-Scale Production, Purification and Properties: Aggregation Behaviours and Its effect on Activity, J. Biotechnol., 56, 89-102.
- Schmid, R. D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, Angew Chem. Int. Ed., 37, 1608-1633.
- Shao, W. ve Weigel, J., 1995. Purification and Characterization of Two Thermostable Acetyl Xylan Esterase from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485, Appl. Environ. Microb., 61, 729-733.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U. C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases, Biotechnol. Adv., 19, 627-662.
- Sharp, R.J., Riley, P.W. ve White, D., 1992. Heterotrophic Thermophilic Bacilli, Thermophilic Bacteria, Kristjansson, J. K., Ed., CRC Press, Boca Raton.
- Shum, A. C., Marcovetz, A. J., 1974. Purification and Properties of Undecyl Acetate Esterase from *Pseudomonas cepacia* Grown on 2-Tridecanone, J. Bacteriol., 118, 880-889.
- Sierra, G., 1957. A Simple Method For The Detection Of Lipolytic Activity Of Microorganisms And Some Observations On The Influence Of The Contact Between Cells And Fatty Substrates, Antonie Van Leeuwenhoek, 23, 15-22.

- Smialowski- Fleter, S., Moulin, A., Villard, C. ve Puigserver, A., 2000. Structure- Function Relationships in the Carboxylic- Ester- Hydrolase Superfamily Disulfide Bridge Arrangement in Porcine İntestinal Glycerol- Ester Hydrolase, Eur. J. Biochem., 267, 2227-2234.
- Stetter, K. O., 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments, FEBS Lett., 452, 22-25.
- Stetter, K. O., 1996. Hyperthermophilic Procaryotes, FEMS Microbiol. Rev., 18, 149-158.
- Şişik, D., 2003. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis*, Polihidroksibutirat Parçalama Yeteneğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Talcott, R. E., Mallipudi, N. M. ve Fukuto, T. R., 1979a. Malathion Carboxylesterase Titer and its Relatonship to Malathion Toxicity., Toxicol. Appl. Pharm., 50, 501-504.
- Talcott, R. E., Mallipudi, N .M., Umetsu, N. ve Fukuto, T.R., 1979b. Inactivation of Esterases by İmpurities İsolated from Technical Malathion, Toxicol. Appl. Pharm., 49, 107-112.
- Teo, J. W. P., Zhang, L. ve Poh, C. L., 2003. Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6, Gene, 312, 181-188.
- Theil, F., 1995. Chemoenzymatic Synthesis of Enantiomerically Pure γ,β -disubstituted γ -lactones, Tetrahedron, 6, 1693-1698.
- Tomasi, G., Scandola, M., Briese, B. H. Ve Jendrossek, D., 1996. Enzimatic Degratation of Bacterial poly(3-hydroxybutirate) Depolimerase from *Pseudomonas lemoignei*, Macromolecules, 29, 507-513.
- Tsuboi, R., Komatsuzaki, H. ve Ogawa, H., 1996. İnduction of an Extracellular Esterase from *Candida albicans* and Some of İts Properties, İnfect. İmmun., Aug., 2936-2940.
- Undurraga, D., Markovits, A. ve Erazo, S., 2001. Cacao Butter Equivalent Through Enzymatic İnterseterification of Palm Oil Midfraction, Process Biochem., 36, 933-9.
- Wang, Y., Srivastava, K. C., Shen, G. J., Wang, H. Y., 1995. Thermostable Alkaline Lipase from a Newly İsolated Thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841), J. Ferment Bioeng., 79, 433-8.
- Wilke, D., 1999. Chemicals from Biotechnology: Molecular Plant Genetics will Challenge the Chemical and Fermentation İndustry, Appl. Microbiol. Biot., 52, 135-45.
- Verger, R., 1997. Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts, Trends Biotechnol., 15, 32-38.

- Vulfson, E. N., 1994. Industrial applications of lipases, Wolley P., Peterson, S. B., Cambridge Univ. Pres, Cambridge.
- Yeoh, H. H., Wong, F. M., Lin, G., 1986. Screening for Fungal Lipases Using Chromogenic Lipid Substrates, *Mycologia*, 78, 298-300.
- Yu, Q. S., Holloway, H. W., Flippen-Anderson, L. L., Hoffman, B., Brossi, A. ve Greig, N. H., 2001. Methykal Analogues of the Experimental Alzheimer Drug Phenserine: Synthesis and Structure and Structure/Activity Relationships for Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitory Action, *J. Med. Chem.*, 44, 4062-4071.



ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Trabzon'un Araklı ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Fransa'da, orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1998 yılında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 2002 yılında kimyager ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına girdi bu yıl itibariyle KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandı bu göreve halen devam etmektedir. Yabancı dili Fransızca ve İngilizcedir.

