

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF17 SUŞUNDAN ESTERAZ  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Çiğdem AYNA**

**HAZİRAN 2011**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF17 SUŞUNDAN ESTERAZ  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Çiğdem AYNA**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20.05.2011  
Tezin Savunma Tarihi : 10.06.2011**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK**

**Trabzon 2011**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalında**

**Çiğdem AYNA tarafından hazırlanan**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF17 SUŞUNDAN ESTERAZ  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 24 / 05 / 2011 gün ve 1406 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 10 / 06 / 2011 tarihinde yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ .....**

**Üye : Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK .....**

**Üye : Yrd.Doç.Dr. Nagihan Sağlam ERTUNGA .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Termofilik bir bakteri olan *Geobacillus sp.* TF17 suşundan esteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yapılmış olup, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenen, Biyokimya bilimini tanımamda ve bu alanda çalışmayı seçmemde büyük katkıları olan değerli hocam Sayın Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK’a, tezin hazırlanmasında ve geliştirilmesinde büyük katkısı olan, yardımlarını ve deneyimlerini benden esirgemeyen sevgili hocam Öğr.Gör.Dr. Yakup KOLCUOĞLU’na, Doktora öğrencisi Fulya ÖZ’e ve Biyokimya Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkürü ve minneti bir borç bilirim.

Maddi ve manevi desteğini, ilgisini ve sevgisini hiçbir zaman eksik etmeyen her zaman yanımda olan aileme sonsuz minnet duygularımı sunuyorum. Hakkınızı ödeyemem, sizleri çok seviyorum.

Çiğdem AYNA  
Trabzon 2011

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Termofilik *Geobacillus sp.* TF17 Suşundan Esteraz Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK‘ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 13/06/2011

Çiğdem AYNA

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ .....	III
TEZ BEYANNAMESİ .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ .....	X
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Esteraz /Lipazların Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	2
1.3. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları .....	5
1.4. Esteraz/Lİpazların Bulunduğu Organizmalar .....	7
1.5. Termofilik bir mikroorganizma olan <i>Geobacillus</i> 'lar .....	8
1.6. Esteraz/Lipazların Endüstrideki Yeri .....	9
1.7. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Kullanılan Materyaller.....	14
2.1.1. Cihazlar .....	14
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	15
2.1.3. Kullanılan Mikroorganizma .....	15
2.1.4. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması .....	15
2.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	16
2.1.5.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	16
2.1.5.2. Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler .....	16
2.1.5.3. Tampon Çözeltiler .....	17
2.1.5.4. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesinde Kullanılan Diğer Çözeltiler.....	18
2.1.5.5. Diğer Çözeltiler.....	18
2.2. Deneysel Çalışmalar .....	19

2.2.1.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanması.....	19
2.2.2.	Asetonla Çöktürme .....	19
2.2.3.	İyon Değişim Kromatografisi .....	20
2.2.4.	Enzim Aktivitesinin Tayini ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi .....	20
2.2.5.	Protein Tayini.....	21
2.2.6.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) .....	21
2.3.	Saf Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu .....	22
2.3.1.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	22
2.3.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	23
2.3.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	23
2.3.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	23
2.3.5.	Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi.....	24
2.3.6.	Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	24
2.3.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi .....	24
2.3.8.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerinin Etkisi .....	25
3.	BULGULAR.....	26
3.1.	Enzimin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması .....	26
3.2.	Enzimin Biyokimyasal Olarak Karakterizasyonu .....	27
3.2.1.	Enzimin Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu .....	27
3.2.2.	Enzimin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi.....	28
3.2.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	29
3.2.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	29
3.2.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	30
3.2.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	31
3.2.7.	Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi .....	32
3.2.8.	Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	32
3.2.9.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi .....	33
3.2.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerinin Etkisi .....	34
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	35
5.	ÖNERİLER.....	40
6.	KAYNAKLAR. ....	42

ÖZGEÇMİŞ

## Yüksek Lisans Tezi

### ÖZET

#### TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF17 SUŞUNDAN ESTERAZ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Çiğdem AYNA

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK  
2011, 50 Sayfa

Gerçekleştirilen bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Geobacillus sp.* TF17 suşundan esteraz enzimi iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saf enzim eluatında esteraz varlığı doğal PAGE ile tek bir bant halinde ortaya konuldu. *p*NPB substratı varlığında, enzimin optimum pH'sı 7,5, optimum sıcaklığı ise, 50 °C olarak belirlendi. Saf enzimin, 4 °C'de pH 4,0-9,0 aralığında 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda optimum pH değerindeki aktivitesini tamamen koruduğu gözlemlendi. Saf enzimin 30-80 °C arasındaki sıcaklıklarda yapılan kararlılık denemelerinde enzimin 70 ve 80 °C'de 4. saat sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği, buna karşılık 30, 40 ve optimum sıcaklığı olan 50 °C'de aktivitesini 3. günün sonunda %100 oranında koruduğu tespit edildi. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda, *p*NPB substratı varlığında hesaplanan  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0,056 mM ve 19,38 U/mg protein olarak belirlendi. Bazı genel organik çözücüler varlığında enzim aktivitesinin davranışları ortaya konulmuş olup, denenilen organik çözücülerden izopropanol ve asetonitrilin enzim aktivitesinin %60'dan fazlasını inhibe ettiği görüldü. Ayrıca bazı metal iyonlarının enzim aktivitesini farklı oranlarda etkilediği tespit edildi. Sonuç olarak, *Geobacillus sp.* TF17 esterazının oldukça pH ve ısı kararlı olduğu gözlemlenmiş ve ayrıca  $K_m$  değeri açısından literatürde bilinen esterazlardan bazı üstün özelliklere sahip olduğu,  $V_{maks}$  değerinin ise literatürle uyumlu olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen veriler dikkate alındığında enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Termofilik, Esteraz, *Geobacillus sp.* TF17, İyon Değişim Kromatografisi, Karakterizasyon, Saflaştırma



Master Thesis

SUMMARY

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ESTERASE FROM  
A THERMOPHILIC BACTERIUM, *Geobacillus sp.* TF17

Çiğdem AYNA

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program

Supervisor: Prof. Ahmet ÇOLAK  
2011, 50 Pages

In this study, an esterase was purified from a thermophilic bacterium, *Geobacillus sp.* TF17, by using a Q-Sepharose ion exchange column and characterized. The purified enzyme was observed as a single band on native polyacrylamide gel electrophoresis. In the presence of *p*NPB as a substrate, the optimum temperature and pH of the enzyme were found to be 7.5 and 50 °C, respectively. The purified enzyme was extremely stable, in the range of pH 4.0-9.0, in the optimum pH value after 72 hour incubation at 4°C. When the thermal stability profile of the purified enzyme was analyzed, it was determined that the enzyme was extremely stable in the range of 30-50 °C after 72 h incubation. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the purified enzyme were calculated as 0.056 mM and 19,38 U/mg protein, respectively, from the Lineweaver-Burk plot. The enzyme was inhibited more than about 60% of activity in the presence of some organic solvents such as isopropanol and acetonitrile. Additionally, it was detected that some metal ions affect the enzyme activity at different rates. As a result, *Geobacillus sp.* TF17 esterase had good pH and thermal stability. In addition this esterase has superior features than known in the literature in terms of  $K_m$ , the  $V_{max}$  values were shown to be compatible with the literature. Considering data obtained from this study, purified esterase has advantages for industrial or biotechnological applications in terms of especially its high thermal- and pH-stability.

**Key Words:** Thermophilic, Esterase, *Geobacillus sp.* TF17, Ion Exchange Chromatography, Characterization, Purification.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Esteraz/lipazların katalizlediği genel reaksiyon .....	3
Şekil 2. Doğal $\alpha/\beta$ hidrolaz katlanması .....	4
Şekil 3. Farklı açılardan esteraz/lipazın üç-boyutlu yapısının şematik gösterimi .....	4
Şekil 4. Lipaz hidroliz mekanizması .....	6
Şekil 5. Lipaz esterifikasyon mekanizması .....	7
Şekil 6. İyon değişim kromatografisi ile <i>Geobacillus sp.</i> TF17 esterazının saflaştırılması .....	26
Şekil 7. Doğal PAGE (A) Comassie boyama, (B) Substrat boyama .....	28
Şekil 8. pH'ın aktivite üzerine etkisi .....	29
Şekil 9. Sıcaklığın aktivite üzerine etkisi .....	30
Şekil 10. Protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi .....	30
Şekil 11. Enzimin substrat doygunluk eğrisi .....	31
Şekil 12. <i>p</i> NPB varlığında enzimin Lineweaver-Burk eğrisi .....	31
Şekil 13. Enzimin pH kararlılık grafiği .....	32
Şekil 14. <i>Geobacillus sp.</i> TF17 esterazının ısıl kararlılık grafiği .....	33

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar .....	10
Tablo 2. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları .....	10
Tablo 3. Kullanılan cihazlar .....	14
Tablo 4. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri .....	22
Tablo 5. Esteraz enzimine ait saflaştırma tablosu .....	27
Tablo 6. Enzime ait substrat özgünlüğü tablosu .....	28
Tablo 7. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	34
Tablo 8. Bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	34

## SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin serum albumin (Sığır Serum Albumini)
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EC	: Enzim komisyonu
kDa	: Kilodalton
$K_m$	: Michaelis-Menten sabiti
mA	: Miliamper
mM	: Milimolar
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<i>p</i> NP	: <i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> NPA	: <i>p</i> -nitrofenil asetat
<i>PNPB</i>	: <i>p</i> -nitrofenil butirat
<i>p</i> NPL	: <i>p</i> -nitrofenil laurat
<i>p</i> NPP	: <i>p</i> -nitrofenil palmitat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
U	: Ünite
$V_{maks}$	: Maksimum hız
$\mu$ g	: Mikrogram

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Enzimler, canlı hücrede meydana gelen metabolik reaksiyonların çoğunun hızını arttıran veya düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında, dış ortamlarda da etkilerini gösterebildiklerinden dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, bu enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi büyük önem taşımaktadır (Sökmen, 2005).

Günümüzde enzim katalizli süreçler, daha ekonomik, daha hızlı, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, klinik ve endüstriyel uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler. Enzim katalizli süreçlere duyulan bu ilgi sayesinde dünya genelinde bir enzim pazarı ortaya çıkmıştır. Bu olay, bu alanda yapılan çalışmaların artmasına da neden olmuştur. Gün geçtikçe artan talepler, artık daha iyi özelliklere sahip ya da özellikleri geliştirilmiş enzimlere duyulan ihtiyacı da gözler önüne sermektedir. Endüstriyel enzimlerin %60'ı Avrupa, geri kalan %40'luk bölümü ise Amerika ve Japonya tarafından üretilmektedir (Bhat, 2000).

Esterazlar (EC 3.1.1.1) ve lipazlar (EC 3.1.1.3); bitki, hayvan, mantar ve bakteri gibi çeşitli organizmalarda bulunan ve karboksil esterlerinin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipaz ve esterazların her ikisi de ester bağlarını hidrolizlemesine rağmen hidrolizledikleri substratların özelliklerine bakıldığında kinetik olarak bazı temel farklılıklar gösterirler (Jaeger vd., 1999). Esterazlar, kısa zincirli ester bağlarının (C8'den daha az) hidrolizini katalizler ve suda çözünebilen substratları tercih ederler. Lipazlar ise uzun zincirli esterleri ve trigliseridleri hidrolizleyen ve suda çözünmeyen substratları tercih eden enzimlerdir (Bornscheuer, 2002; Bornscheuer vd., 2002). Lipazlar, arayüz aktivasyonu göstermesiyle ve enzimin aktif bölgesini kaplayan hidrofobik bir kapağa sahip olmasıyla esterazlardan ayrılabilirler (Fojan vd., 2000). Lipaz ve esterazların her ikisinde çeşitli karakteristik özelliklere sahiptirler ki bunlar bölgesel seçicilik, substrat özgünlüğü

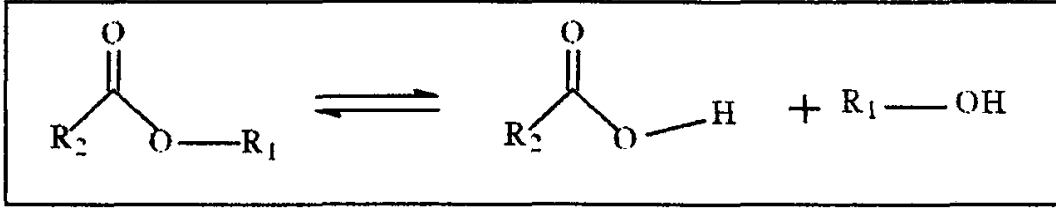
ve kiral seçiciliktir (Jaeger vd., 1994; Schmid ve Verger 1998). Bu nedenle, bu iki enzim tıp, gıda endüstrisi, deterjan endüstrisi, oleokimya endüstrisi, kağıt ve hamur endüstrisi ve kiral ilaçların ayrıştırılması gibi çeşitli biyokimyasal uygulamalar için çok önemlidir (Bornscheuer, 2002; Sharma vd., 2001; Jaeger ve Reetz, 1998; Willis vd., 1998; Quax ve Broekhuizen, 1994).

Endüstriyel süreçlerdeki uygulamalarda kullanılan enzimler, zorlu reaksiyon koşulları altında dayanıklı olmalıdırlar. Mezofilik organizmalardaki enzimler, aşırı reaksiyon şartlarındaki yüksek kararlılık noksanlığından dolayı çoğu kez elverişli değildirler. Bu sebepten dolayı, endüstriyel enzim alanlarında, yüksek termofilik mikroorganizmalardaki enzimler, mezofilik enzimlerden daha dikkat çekicidir (Demirjian vd., 2001; Niehaus vd., 1999; Sellek ve Chaudhuri, 1999).

Termofilik mikroorganizmalar, önemli özelliklere sahip bileşenler bulundurduklarından bu organizmalarla yapılan çalışmaların sayısında son yıllarda önemli bir artış gözlenmiştir. Örneğin; termofilik enzimler mezofilik olanlardan proteoliz ve kimyasal ajanların bozucu etkilerine karşı daha fazla ısıl kararlı ve dirençlidirler (Pantazaki vd., 2002). Bu nedenle biyokatalitik süreçlerde çok kullanışlı olabilirler. Ayrıca termofilik enzimlerin yapısı üzerine yapılan çalışmaların, genel olarak, ısıl kararlı enzimlerin üç boyutlu yapılarının belirlenmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Sellek ve Chaudhuri, 1999).

## **1.2. Esteraz/Lipazların Özellikleri ve Sınıflandırılması**

Esterazlar, organik çözücü ortamında ester bağlarının oluşumunu ve sulu ortamda ise bu bağların hidrolizini katalizler. Lipazlar ise organik çözücü-su ara yüzeyinde, suda çözünmeyen uzun karbonlu yağ asitlerini içeren triaçilgliserollerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 1). Bu özellik, lipazları esterazlardan ayırır. Lipazlardaki bu organik çözücü-su ara yüzeyindeki aktivite, ara yüzey aktivasyonu olarak bilinmektedir. Bazı durumlarda ise lipazlar, suda çözünen esterlere karşı da aktivite gösterebilir (Desnuelle, 1972; Schmid ve Verger, 1998).



Şekil 1. Esteraz/lipazların katalizlediği genel reaksiyon

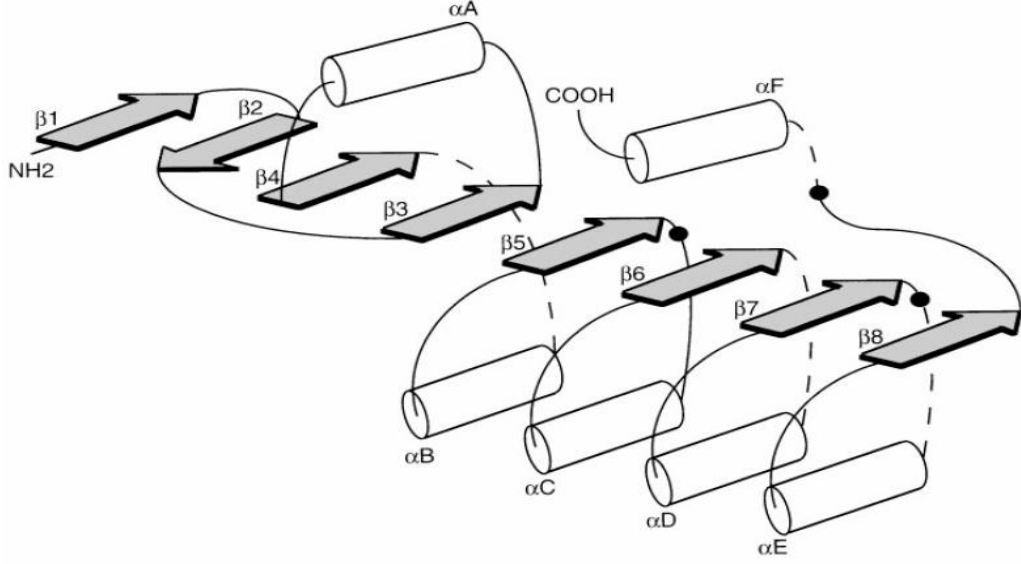
Lipazlar, maksimum aktiviteye ulaşmak için minimum substrat konsantrasyonuna ihtiyaç duyarken, esterazlar klasik Michaelis-Menten kinetiğine uyarlar. Yapısal çalışmalar, lipazların aktif bölgelerinin hidrofobik bazı amino asitler tarafından çevrildiğini ve bu yüzden de aktif bölgenin yalnızca minimum substrat konsantrasyonu ile etkileşebileceğini ortaya koymuştur (Fojan vd., 2000).

Esterazlar, hidrolizledikleri ester bağlarına bağlı olarak, 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 monoesterazlar (EC 3.1.7.x) ve fosforik triester hidrolazlar (EC 3.1.8.x) gibi birçok alt sınıfa ayrılırlar. Bu enzimler hayvan, insan ve mikroorganizmalarda bulunabilmektedir (Schmid ve Verger, 1998). Karboksil ester hidrolazların (EC 3.1.1.x) iki önemli sınıfı vardır. Bunlar; lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve gerçek esterazlardır (EC 3.1.1.1, karboksil esterazlar) (Eggert vd., 2002).

Karboksil ester hidrolazlar için alternatif bir sınıflandırma, amino asit dizisi benzerliği temel alınarak yapılabilir. Bu kriterlere göre karboksil ester hidrolazlar grup C, L ve H olmak üzere üçe ayrılabilir (Simone vd., 2004). C grubu, omurgalı ve omurgasız hayvanlardan elde edilen kolinesterazları ve mantar lipazları, L grubu, omurgalı hayvanlardan ve bakterilerden elde edilen lipazları, lipoprotein lipazları ve farklı organizmalardan lesitin-kolesterol açıl transferazları içerir (Simone vd., 2001). H grubu, ise hormona duyarlı lipazlar olarak isimlendirilir (Jung vd.,2003; Vaughan vd., 1964).

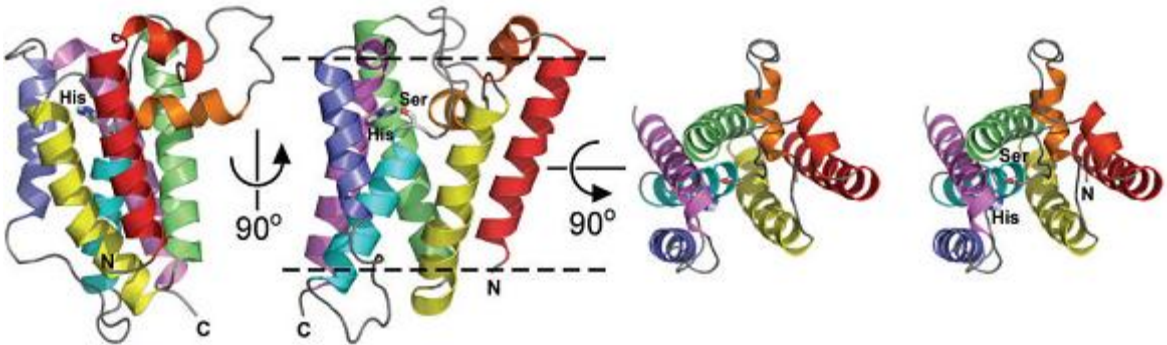
Esteraz ve lipazların molekül ağırlıkları 19-60 kDa arasında değişiklik gösterebilir (Bano vd., 2003). 3 Boyutlu yapıları  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$ -katlanmış yapılardan oluşmuş olup, bu enzimler karakteristik  $\alpha/\beta$ -hidrolaz ailesinin birer üyesidirler (Ollis vd., 1992). Bu grupta yer alan tüm enzimler, 8 farklı  $\beta$ -zinciri içeren merkezi  $\beta$ -zincir yapısıyla, bu yapılarla bağlantılı 5-8  $\alpha$ -sarmal yapı bulunduran  $\alpha/\beta/\alpha$  sandviç modeli oluştururlar (Şekil 2).  $\alpha/\beta$ -hidrolaz enzim ailesi ilk defa Ollis vd. (1992) tarafından ortaya konulmuştur. Aynı

kıvrımlı ve katalitik mekanizmalı diğer enzimler; esteraz benzeri asetil kolin esterazlar, kütinazlar, karboksil esterazlar, arilesterazlar, fosfolipazlar A1, kolinesterazlar ve *hem* grubu içermeyen peroksidazlardır (Pleiss ve Fischer, 2002).



Şekil 2. Doğal  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanması

Katalitik mekanizma, bütün enzimlerde korunmuş olan Ser-His-Asp(Glu) katalitik üçlüsü tarafından gerçekleştirilir. Aktif bölgedeki serin amino asidi tüm enzimlerde korunmuş olan Gly-X-Ser-X-Gly yapısında yer almaktadır (Ollis vd., 1992). Şekil 3, bir esteraz/lipazın üç boyutlu yapısını göstermektedir.



Şekil 3. Farklı açılardan esteraz/lipazın üç-boyutlu yapısının şematik gösterimi (Ben-Shem vd., 2007).



### 1.3. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları

Yüzeylearası aktivasyon ve kapak yapısı lipazları esterazlardan ayıran en belirgin özelliklerdir. Lipazların büyük bir çoğunluğu aktif bölgelerini örten bir helikal parçaya (kapak/lid) sahiptir. Lipid kümelerinin varlığında bu kapak açılır ve yüzeylearası aktivasyon gerçekleşir. Yüzeylearası aktivasyon göstermeyen lipazlarda kapağın olmadığı ya da kapak-domaininde delesyon bulunduğu gözlemlenmiştir. Ancak *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* B ve *Burkholderia glumae* lipazları kapak yapısına sahip olmalarına karşın, yüzeylearası aktivasyon göstermezler. Sulu ortamda lipazlar için baskın konformasyon kapalı formdur. Aktif bölge, kapak yapısını oluşturan bir ya da daha fazla düğüm tarafından çözücüden korunmuştur. Kapağın dış parçası hidrofildir. Bu konformasyon elektrostatik etkileşimler aracılığıyla kararlı kılınmıştır. Bir su-yağ emülsiyonunda kapağın açılması, substratların aktif bölgeye girişine izin verir (açık konformasyon). Kapağın açılmasıyla, nükleofilik serin birimi büyük hidrofobik yüzeyler ile etkileşir ve lipaz enziminin aktif forma geçmesi sağlanır (Verger, 1997; Schmid ve Verger, 1998; Jaeger ve Reetz, 1998; Houde vd., 2003). Birçok lipazda kapağın hareketiyle ayrıca bir oksiyon boşluk oluşmaktadır. Bu boşluk substrata yapılacak nükleofilik saldırı sırasında oluşan negatif yükleri kararlı kılan elektrofilik bir çevre sağlar (Jaeger ve Reetz, 1998).

Hidrolaz sınıfına ait olan gerçek esterazlar (Karboksil esterazlar, EC 3.1.1.1.) suda çözünen substratların ester bağlarının oluşumunu ya da hidrolizini katalizlerler. Çoğu esterazın hidrolitik mekanizmaları, lipazların hidrolitik mekanizmalarına benzerdir. Her iki enzim de serin hidrolaz olarak değerlendirilebilir (Ollis vd., 1992).

Lipazlar biyolojik sistemler için önemli bir enzim sınıfıdır. Son zamanlarda hem esterazlar hem de lipazlar düşük su içerikli ortamlarda başarı ile kullanılmaktadırlar. Böylece bu enzimler, esterifikasyon ve trans-esterifikasyon gibi reaksiyonlarında katalizlerler (Balcao vd., 1996; Villeneuve vd., 2000).

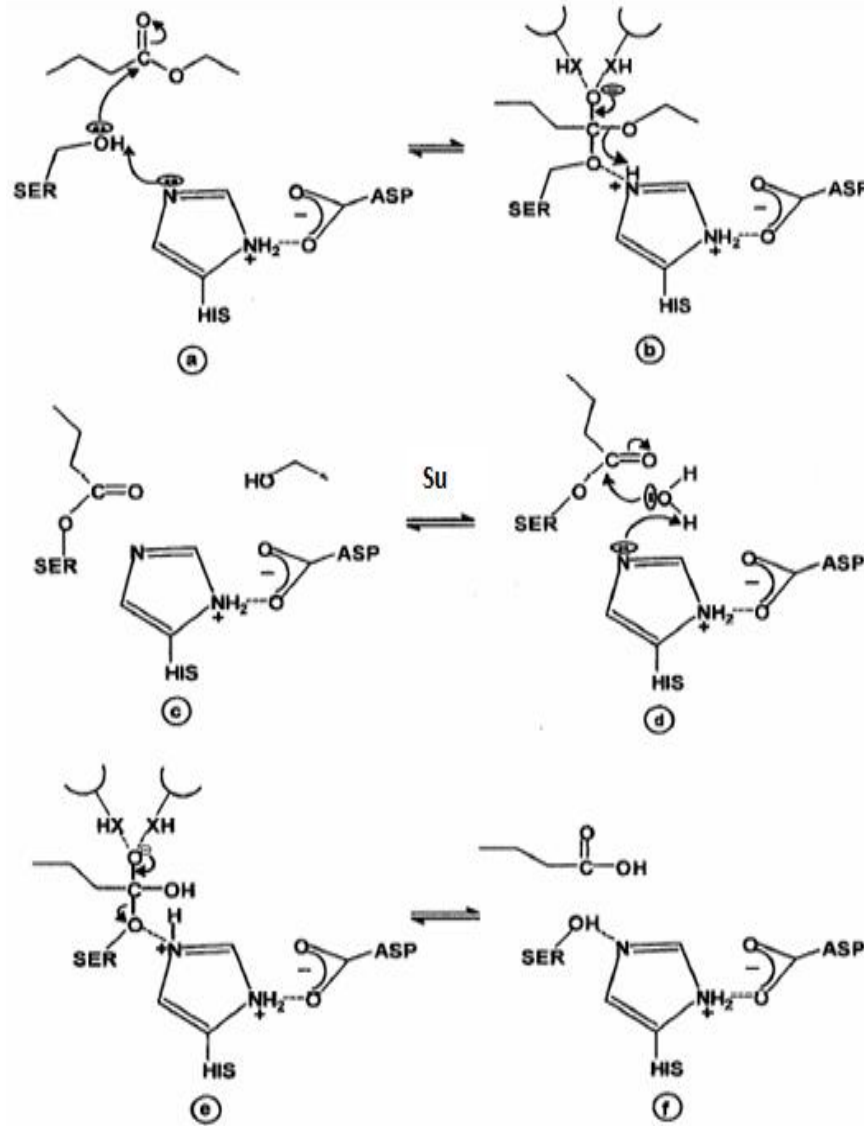
Genel olarak,  $\alpha/\beta$ -hidrolaz enzim ailesi esterazları, tipik serin hidrolaz mekanizmasını kullanırlar. Bu serin proteazların mekanizmasına benzerdir. Ester hidrolizi ve oluşumu reaksiyonları esterazlar için benzerdir ve dört adımdan oluşur (Şekil 4 ve 5) (Bornscheuer, 2002).

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

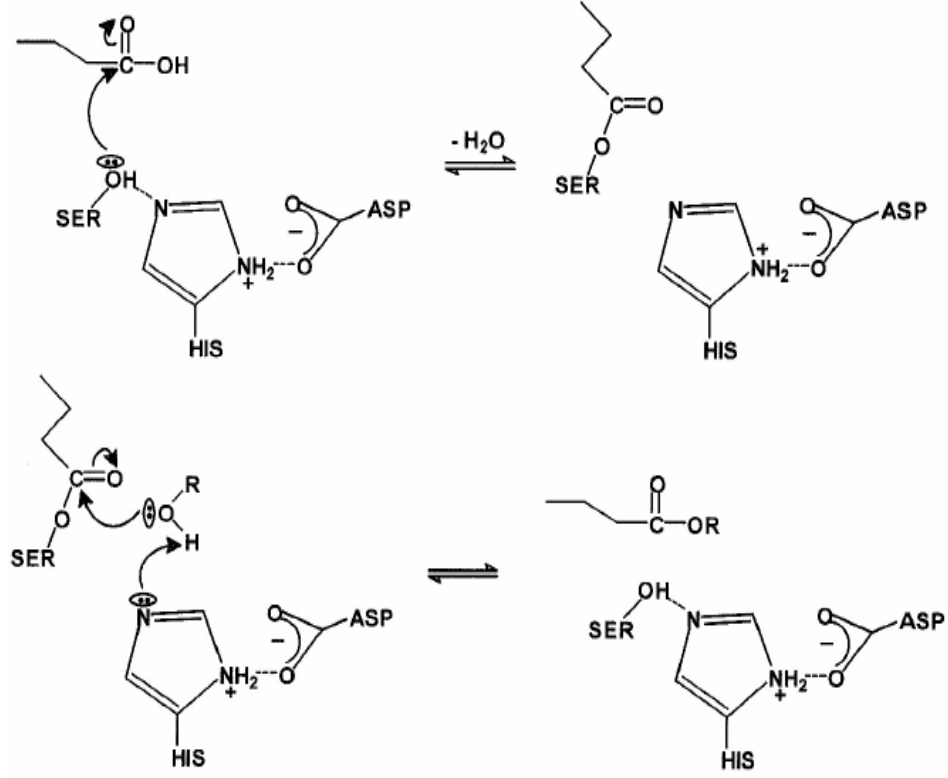
2- İkinci adımda alkol salınır ve açıl-enzim kompleksi oluşur.

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).



Şekil 4. Lipaz hidroliz mekanizması (Akkuş, 2006).



Şekil 5. Lipaz esterifikasyon mekanizması (Akkuş, 2006).

#### 1.4. Esteraz/Lipazların Bulunduğu Organizmalar

Endüstriyel uygulamalar için gerekli olan enzim miktarı oldukça fazladır. 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 (Faiz, 2005).

Son zamanlarda mikrobiyal lipolitik enzimler oldukça önemli hale gelmişlerdir ve pahalı memeli enzimleri için iyi birer alternatif olmuşlardır (Long vd., 1988; Winkler vd., 1990). Birçok mezofilik ve termofilik organizmalardan esterazlar ve lipazlar saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Bunlardan bazıları; *Pseudomonas cepacia* (Shum ve Markovetz, 1974; Sugihara vd., 1992), *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer vd., 1986), *Arthrobacter globiformis* (Nishizawa vd., 1993), *Candida cylindracea* (Rua vd., 1993), *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hespell ve O'Bryan-Shah, 1988), *Acinetobacter calcoaceticus* (Sherwani ve Fixter, 1989), *Brevibacterium linens* (Lambrechts ve Galzy, 1995), *Pseudomonas*

*fluorescens* (Nakagawa vd., 1984; Suguira vd., 1997), *Bacillus subtilis* (Meghji vd., 1990; Lesuisse vd., 1993) *Aspergillus niger* (Fukumoto vd., 1963; Okumura vd., 1983), *Thermus thermophilus* (Fucinos vd., 2011), *Picrophilus torridus* (Hess vd., 2008) ve *Melanocarpus albomyces*'dir (Kontkanen vd., 2006)

Ticari olarak kullanılan birçok lipaz aslında mikrobiyal kaynaklıdır. Lipaz üreten mikroorganizmalar farklı ortamlarda bulunabilmektedir ki bunlar; endüstriyel atıklar, süt ürünleri, petrol veya yağ ile kirletilmiş topraklar, bitki yağı işleme fabrikaları ve sıcak su kaplıcaları şeklinde sıralanabilir. Lipaz üreten mikroorganizmalar; bakteriler, mantarlar, mayalar ve aktinomisitler olarak sınıflandırılmaktadır (Sharma vd., 2001).

### **1.5. Termofilik Bir Mikroorganizma Olan *Geobacillus*'lar**

Yeryüzü veya toprak basilleri anlamını ifade eden *Geobacillus* cinsi, şu an sistematiği yapılmış 16 türü içermektedir. Toprakta, kaplıcalarda ve okyanuslarda bulunurlar. 30-70 °C arasındaki sıcaklıklarda büyürler ve tip türü *Geobacillus stearothermophilus*'dur. Bu cinsin üyeleri Gram pozitif veya değişken, hücreleri çubuk şeklinde, hareketli, elips veya silindirik şeklinde terminal veya subterminal spora sahiptir. Koloni morfolojisi ve büyüklüğü değişkendir. Bu cinsin %G+C içeriği, %48, 2-58 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub> ve iso-C<sub>17:0</sub>'dir.

*Gebacillus* cinsinin kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği %97'den daha fazla olduğu için, 16S rRNA gen dizi analizi *Gebacillus* cinsine ait türlerin ayırımında yeterli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli rol oynar.

Literatürde *Geobacillus* cinsiyle yapılan birçok enzim çalışması mevcut olup, gün geçtikçe sayıları artmaktadır. Bunlardan bazıları, D-amino asid aminotransferaz (Lee vd., 2006), ksiloz izomeraz (Faiz vd., 2011),  $\alpha$ -glukozidaz (Cihan vd., 2011), ksilenaz (Wu vd., 2006), proteaz (Zhu vd., 2007), maltojenik amilaz (Kolcuoğlu vd., 2010), termoalkalofilik esteraz (Tekedar ve Mohamed, 2011), 1,3-özgün lipaz (Ebrahimpour vd., 2011) şeklindedir.

## 1.6. Esteraz/Lipazların Endüstrideki Yeri

Enzimler, kimyasal reaksiyonları büyük bir spesifiklikle ve hızını artırarak katalizlerler. Enzimler tarafından katalizlenen bu reaksiyonlar, canlı organizma metabolizmasının temelini oluşturur. Endüstrideki biyokatalitik değişim uygulamaları için enzimlerin kullanımı, reaksiyonların randımanlı ve ekonomik olmasını sağlar (van Beilen ve Li, 2002). Günümüzde enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda prosesi, ziraat, tekstil, deri sektörü, birçok endüstriyel malzemenin üretimi ve işlenmesi, çeşitli toksik maddelerin etkisizleştirilmesi gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Telefoncu, 1997; Karademir vd., 2002). Endüstriyel enzim pazarında büyük paya sahip olan hidrolitik enzimler içinde yer alan lipazlar, anahtar enzimler olarak ortaya çıkmakta ve endüstriyel uygulamalarda fazla miktarlarda kullanılmaktadırlar (Jaeger vd., 1994, 1999; Pandey vd., 1999).

Enzimlerin, endüstriyel uygulamalarının çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilmektedir (Telefoncu, 1986). Sulu olmayan ortamlarda enzimolojinin gelişimiyle, lipazın uygulama alanları büyük ölçüde artmıştır. Geçtiğimiz yıllarda lipazlar organik sentez ve yağ modifikasyonu gibi yeni kullanım alanları bulmuştur. Organik ortamda lipazlar tarafından, esterifikasyon, transesterifikasyon ve interesterifikasyonu (katı ve sıvı yağlardaki doğal yağ asit dağılımının değiştirilmesi) içine alan çeşitli reaksiyonlarla ürünlerdeki değişiklikler gözlenmiştir ve bu ürünlerin yüksek oranlarda sentezlenmesi sağlanmıştır (Gao vd., 2000).

Modern endüstride lipazlar, potansiyel olarak hem sulu hem de organik sistemlerde çeşitli endüstriyel uygulama alanlarına sahiptirler (Lin vd., 1996; Ghosh vd., 1996; Sharma vd., 2001). Lipazlar, organik kimyasal işlem, deterjan formülasyonu, biyosüpfaktanların sentezi, oleokimyasal endüstri (katı ve sıvı yağların ve bunların komponentlerinin kimyasal değişimini içerir), süt endüstrisi, agrokimyasal (tarım kimyası) endüstri, kağıt yapımı, besin, kozmetik ve ilaç prosesinde umut verici uygulama alanları bulmaktadır. Lipaz teknolojisindeki gelişmelerle birlikte yeni bileşiklerin sentezi için bu enzimlerin kullanımları hızla artmaktadır (Sharma vd., 2001).

Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları ve bu uygulamalarda katalizledikleri işlemler, elde edildikleri bazı mikroorganizmalar ve ticari firmalar Tablo 1 ve 2'de özetlenmektedir.

Tablo 1. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar (Jaeger ve Reetz, 1998).

Tip	Kaynak	Uygulama alanı	Üretici firma
Fungal	<i>C. rugosa</i>	Organik sentez	Amano, Biocatalysts, Boehringer, Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>C. antarctica</i>	Organik sentez	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosus</i>	Deterjan katkısı	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>R. miehei</i>	Gıda işlenmesi	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bakteriyal	<i>B. cepacia</i>	Organik sentez	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>P. mendocina</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>Ch. Viscosum</i>	Organik sentezler	Asahi, Biocatalysts

Tablo 2. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları (Akkuş, 2006).

Endüstri	Görevi	Ürün ya da uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin çıkarılması
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi Peynirin olgunlaştırılması, tereyağ modifikasyonu	Peynir, süt ve tereyağdaki tatlandırıcı ajanların geliştirilmesi
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, nemlendiriciler
Kağıt	Hidroliz	Geliştirilmiş kalitede kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
İlaç	Transesterifikasyon	Sindirimi kolaylaştırıcı düzenleyiciler
	Hidroliz	Özel lipidler
Yağ	Transesterifikasyon Hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol, mono ve diaçil gliseroller
İçecek	Aroma geliştirilmesi	İçecekler
Ekmek	Tat geliştirilmesi	Raf ömrünün uzatılması

Yağları hidroliz etmelerinden dolayı lipazlar, endüstriyel temizlik alanlarında ve evde kullanılan deterjanlarda geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Deterjan lipazlarında özellikle dikkat edilen hususlar, ilk olarak, yağ lekelerini oluşturan trigliseritlerdeki çeşitlilik nedeniyle substrata spesifik olması, ikinci olarak, sert yıkama koşullarında (pH 10,0-11,0 30-60 °C) enzim kararlılığının devamlılığı ve son olarak da sürfaktan ve proteazlar gibi katkı maddelerinin neden olduğu proteolitik degradasyondan etkilenmemesidir (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001).

Ağacın hidrofobik içeriği olarak tanımlanan 'pitch' (trigliseritler ve mumlar), kağıt hamuru ve kağıt yapımında sorun yaratmaktadır. Lipazlar kağıt yapımı için kullanılan kağıt hamurundan belirtilen maddelerin uzaklaştırılması için kullanılır (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001)

Yağlar, gıdalarda oldukça önemlidir (Sharma vd., 2001). Gliserol iskeletinde yağ asidinin pozisyonu, yağ asidinin zincir uzunluğu ve doymamış yağ oranı gibi faktörler, trigliseritin fiziksel yapısını ve besinsel değerini önemli oranda etkilemektedir (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001). Lipazlar, gliseritteki yağ asit zincirlerinin konumunun değiştirilmesi ve bir veya daha fazla yağ asidinin yeni bir tane ile yer değiştirilmesiyle lipidlerin özelliklerinin farklılaşmasına imkan sağlar. Bu yolla diğerlerine nazaran daha ucuz ve daha kaliteli yağlar elde edilir (Sharma vd., 2001).

Geleneksel olarak bakteriyel lipazlar tat gelişimini sağlayan gıda sistemlerinde, *in situ* olarak üretilmektedir. Pastörizasyon prosesi ve peynir olgunlaştırılması esnasında sütte bulunan *Pseudomonas*, bunun yanı sıra *Alcaligenes* ve *Achromobacter* gibi bakteri türlerinin ve bazı italyan sosislerinin olgunlaştırılmasında lipolitik laktik asit bakterilerinin ürettiği lipazların tat gelişimine etkisi olduğu bilinmektedir (Jaeger vd., 1994). Lipazlar, hamurlu gıdalar ve içeceklere lezzet katmak, et ve balık ürünlerinden yağları uzaklaştırmak amacıyla da kullanılmaktadırlar (Sharma vd., 2001).

Organik sentezde katalizör olarak kullanılan lipazlar, substrat farklılıklarına göre etki göstermelerinden dolayı sentetik kimya için büyük avantaj sağlamaktadırlar (Ghosh vd., 1996). Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır (Sharma vd., 2001).

Esterazlara başvuru endüstri kollarından biri, gıda sanayiidir. 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). Gliserol-ester bağlı yağ

asitlerinin salıverilmesi gibi hidrolitik değişimler, bakteriyal lipaz ve esterazlardan kaynaklanır (Lopes vd., 1999).

Esterazların insan sağlığı açısından incelenmesi çok fazla çalışılmış bir konu değildir. Yine de bazı çalışmalarda karboksil esterazların, kolesterol biyosentezi (Benayoud vd., 2000) ve A vitamininin hepatik kullanımı (Harrison, 1998, 2000) üzerinde rol oynayabilecekleri belirtilmiştir. Karboksil esterazlar, amit ve ester bağı içeren birçok tedaviye ait maddenin farmokinetik davranışlarının belirlenmesinde temel olarak kullanılan belirleyicidirler (Oliver vd., 2000). Bazen de karboksil esterazların inhibe edilmesi tedavi amaçlı olarak kullanılabilir. Örneğin Alzheimer ilaçlarında karboksil esterazlar mevcuttur. Bu ilaçlarda butirilkolün esterazın inhibe edilmesinde karboksil esterazlar kullanılmaktadır (Yu vd., 2001).

Esterazların endüstride uygulama buldukları alanlardan biri de tarımdır. Karboksil esterazlar tarım kimyasallarının üç sınıfını oluşturan organofosfatlar, karbomatlar ve piretroidlerle etkileşerek tarım kimyası ve detoksifikasyonu üzerinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Kao vd., 1985).

Yağ rafinerisi, sabun ve deri üretimi gibi birçok endüstriyel işlemler sırasında lipid bakımından zengin atıklar oluşur. Termofilik organizmalar bu tür endüstriyel atıkların iyileştirilmesi amacıyla kullanılabilir (Markossian vd., 2000). Bu uygulamanın birçok avantajı vardır. Bunlardan bir tanesi de 50 °C üzerinde hidrofobik substratların, enzim ve organizmalar için uygunluğunun artmasıdır (Becker vd., 1997 ve 1999). Yapılan bu çalışmalarla, esterazların, evre temizliği konusunda da yer edindiği görülmektedir.

### **1.7. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi**

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların hızını arttıran ve bu sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki biyokatalizörlerdir. Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamların dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır (Sökmen, 2005).

Doğal olarak, organizmalar tarafından üretilen enzimler, oldukça spesifiktirler ve sadece tek bir stereospesifik ürün oluşturmak üzere, reaksiyonları katalizlenmemiş reaksiyona 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 enzimler varlığında reaksiyonlar ılımlı şartlarda (oda sıcaklığı ve basıncı, fizyolojik pH vb) gerçekleştirilir, böylece büyük oranda enerji tasarrufu sağlanmış olur. Başlıca bu özelliklerinden dolayı, günlük hayatımızda kullandığımız pek çok üründe ve bu ürünlerin fabrikasyon aşamalarında enzimler önemli bir yer tutmaya başlamışlardır (Faiz, 2005).

Endüstride süregelen aşamalarda, yukarıda açıklanan birçok nedenden dolayı enzimlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Özellikle endüstriyel şartlara dayanabilen enzimlerin eldesi günümüzde ilgi duyulan bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bu enzimlerin elde edilebileceği kaynaklara bakıldığında mikrobiyal olanları öne çıkmaktadır. Yapılan birçok araştırmaya göre mikrobiyal kaynakların içerisinde termofilik özellik gösterenler, artı bir önem kazanmaktadır. Termofilik bakteriler, bunlardan elde edilen proteinlerin yüksek sıcaklıklarda kararlılık göstermeleri, aktif olmaları, pH kararlılığı vb. özelliklerinden dolayı gıdadan tekstile, kozmetikten ilaç endüstrisine kadar birçok alanda kullanılacak potansiyel enzim kaynakları haline gelmişlerdir.

Günümüzde, esterazların çeşitli endüstrilerde kullanıldığı yapılan araştırmalarca ortaya konmaktadır.

Esteraz enziminin termofilik bakterilerden izole edilip, saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi endüstriyel alanlarda kullanılacak gelişmiş ve uygun özelliklere sahip bir enzimin mikrobiyal kaynaklardan üretilmesini mümkün kılacaktır. Bu şekilde halen faaliyet gösteren birçok endüstriyel kuruluşta esteraz kullanımının artması söz konusudur. Ayrıca optimum şartların belirlenmesi ve detaylı analizi ile yeni ve geniş kararlılık aralığına ve özelliklere sahip esterazlar üretilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, endüstriyel öneme sahip esteraz enziminin *Geobacillus sp.* TF17 suşundan izole edilip, saflaştırılması ve karakterize edilmesidir. Endüstride kullanıma uygun ve daha üstün özelliklere sahip mikrobiyal kaynakların ortaya çıkarılmasıdır. Karakterizasyon çalışmaları süresince, optimum sıcaklık ve pH, ısı ve pH kararlılığı, aktiviteye metal iyonlarının ve çeşitli kimyasalların etkisi, substrat ve protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi parametrelerinin belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Böylece kullanılan termofilik bakterinin esterolitik enzim kaynağı olarak endüstriyel işlemlerde ya da diğer alanlarda ki uygulamalar için uygun olup olmadığı ortaya konabilecek ve yeni bir enzim, kinetik özellikleriyle birlikte endüstriye ve/veya literatüre kazandırılacaktır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Materyaller

#### 2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma	Model
UV-Vis Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Protein Elektroforezi	Owl Separation Systems	P8DS
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Mikrotüpler İçin Termal Sallayıcı	Boeco	TS-100 Thermo Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Sonikatör	Bandelin	Sonopuls HD3100
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Isıtıcı/Magnetik Karıştırıcı	HS31	Chiltren
Otoklav	Tomy	SX-700E
Güç Kaynağı	Thermo	EC 1000XL
Degaz Pompası	Vacuubrand	2C
Kollektör	Retriever	500
UV Dedektör	Retriever	UA-6
Peristaltik Pompa	Tris	--
Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific	U410
Steril Kabin	JSR	JSCB-1200SB

### 2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Bovin serum albumin (BSA) , *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL), *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP), sodyum potasyum tartarat, sodyum dodesil sülfat (SDS), nitrilotriasetikasit, kalsiyum klorür hegzahidrat, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED), gliserol, sodyum molibdat dihidrat, çinko sülfat monohidrat, borik asit, kalsiyum sülfat dihidrat, magnezyum sülfat heptahidrat ve Q-Sepharose fast flow kimyasalları Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA) firmasından, sodyum asetat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum hidroksit, bakır (II) sülfat pentahidrat, merkaptotanol, hidrojen klorür, etanol, Tris, glisin, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> iyonlarının klorür tuzları, metanol, aseton, bakto tripton, mangan sülfat monohidrat, sodyum karbonat, disodyum hidrojenfosfat dodeka hidrat ve bromofenol mavisi kimyasalları Merck A.G. (Darmstadt, Germany) firmasından, akrilamid, Tris, Coomassie Brilliant Blue R-250 ve Amonyumpersulfat (APS) kimyasalları Fluka firmasından, maya ekstrağı Lab M firmasından ve asetonitril kimyasalı Carlo Erba Reagent firmasından temin edilmiştir.

### 2.1.3. Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada kullandığımız termofilik mikroorganizma (*Geobacillus sp.* TF17) Biyoloji Bölümü araştırmacılarının (Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ ve araştırma grubu) kültür stoklarından temin edilmiştir. Çalışılan mikroorganizma adı geçen araştırma grubu tarafından İzmir ve Aydın illerindeki bazı kaplıçalardan izole edilmiş ve çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle sistematığı yapılmış olup, 16S rRNA analizleri ile yeni bir *Geobacillus sp.* suşu olduğu ortaya konmuştur.

### 2.1.4. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Mineral Besiyeri: 2,5 g maya ekstrağı, 2,5 g bakto tripton, 1,0 g nitrilotriasetikasit, 0,4 gr kalsiyum sülfat dihidrat, 2,0 g magnezyum sülfat heptahidrat, 15 mL 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 10 mL 0,2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mL 0,01 M demir (III) sitrat pentahidrat ve

5 mL eser element çözeltisi yaklaşık 900 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'a ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanarak 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi.

Eser element çözeltisi: 0,22 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,05 g  $ZnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,05 g  $H_3BO_3$ , 2,5 mg  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 2,5 mg  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  ve 0,46 mg  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  saf suda çözülüp hacmi saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

## 2.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

### 2.1.5.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (w/v)  $Na_2CO_3$ ): 0,4 g NaOH ve 2,0 g  $Na_2CO_3$  saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C' de saklandı.
- Lowry B Çözeltisi (%1  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  çözeltisi): 1,0 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K tartarat çözeltisi): 2,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Lowry D Çözeltisi: 1 kısım Lowry B ve 1 kısım Lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
- Sığır Serum Albümin (BSA) Çözeltisi (1 mg/mL): 5,0 mg BSA saf su ile çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- 0,1 N NaOH içinde %0,1 (w/v) SDS Çözeltisi: 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.

### 2.1.5.2. Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris, 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 8,8'e ayarlanarak hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yığma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris, 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 6,8'e ayarlanarak, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1,0 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.

- TEMED: Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10,0 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
- Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL %0,1 bromofenol mavisi, 250 µL %80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 490 mL saf suda çözüldükten sonra pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1,0 g Coomassie Brilliant Blue R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.
- β-Naftil Asetat Çözeltisi (30 mM): 11,4 mg β-naftil asetat 2 mL aseton ile çözülüp hacmi 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponuyla 100 mL'ye tamamlandı.

### 2.1.5.3. Tampon Çözeltiler

- A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 5,253 g sitrik asit monohidrat bir miktar saf su ile çözülüp, hacmi 250 mL'ye tamamlandı.
- B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat): 8,90 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O saf su ile çözülüp hacmi 250 mL'ye tamamlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 4,0): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karışımından 18,1 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karışımından 16,6 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 6,0): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karışımından 15,3 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,0): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karışımından 13,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 7,5): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 7,5'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,3028 g Tris yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 9,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

#### 2.1.5.4. Substrat Çözeltileri ve Enzim Aktivitesinde Kullanılan Diğer Çözeltiler

- *p*-Nitrofenil Asetat Çözeltisi (10 mM stok): 1,8 mg *p*NPA'nın dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Butirat Çözeltisi (10 mM stok): 1,78 µL *p*NPB'nin hacmi asetonitril ile 1 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Palmitat Çözeltisi (10 mM stok): 3,7 mg *p*NPP'nin asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- *p*-Nitrofenil Laurat Çözeltisi (10 mM stok): 3,2 mg *p*NPL'nin asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.

#### 2.1.5.5. Diğer Çözeltiler

0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O: 7,16 g bileşik bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2,72 g bileşik bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,01 M Demir (III) sitrat pentahidrat: 0,245 g bileşik bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

0,6 M NaCl: 8,775 g NaCl tartıldı. Bir miktar 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponunda çözüldü ve aynı tamponla hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

2 M NaCl: 29,25 g NaCl tartıldı. Bir miktar 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponunda çözüldü ve aynı tamponla hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

## **2.2. Deneysel Çalışmalar**

### **2.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması**

Katı besiyerinden alınan bakteri steril kabin içerisinde 3 mL mineral besiyerine ekildi ve gece kültürü hazırlandı. Bu kültürden 200-300  $\mu\text{L}$  alınarak 500 mL kadar mineral besiyerine aktarıldı. 55 °C'deki hava banyolu çalkalayıcıda bir gece büyütüldü. Büyütülen kültür, 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Toplanan hücreler, 8 mL 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponunda süspansiyone edilip, süspansiyona 10 mg/mL içerecek şekilde lizozim ilave edildi. Karışım, 37 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra, %80 şiddetinde, 1 devirde 5 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakılarak hücreler patlatıldı. Daha sonra 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant ham enzim özütü olarak kullanıldı.

### **2.2.2. Asetonla Çöktürme**

Hazırlanan ham enzim özütü, aseton çöktürmesi için 1 hacim özüt, 1 hacim soğuk asetonla karıştırılarak 4 °C'de 5 dak 9.000 rpm'de santrifüjlendi. Elde edilen çökelek, aseton artığının uzaklaşması için 4 °C'de 1 gece bekletildi. Asetonu uzaklaştırılan çökelek, 5 mL kadar 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponunda çözüldü ve çözünmeyen kısmın uzaklaşması için 4 °C'de 5 dak 8.000 rpm'de santrifüjlendi. Elde edilen çözelti iyon değişim kromatografi kolonuna yüklenene kadar – 20 °C'de saklandı.

### 2.2.3. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi için 30 cm x 1,5 cm ebadında bir kolon ve dolgu malzemesi olarak Q-Sepharose fast flow kullanıldı (Kongruang vd., 2002). Vakum pompası kullanılarak kolon dolgu malzemesi ve kullanılan tüm çözeltilere degaz işlemi uygulandı. Dolgu malzemesi bir pastör pipeti kullanılarak dikkatlice kolona paketlenildi. Kolon, 20 mM dengeleme tamponunun absorbansı ile eluat absorbansı aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine maruz bırakıldı. Kolonun akış hızı 1 mL/dak olacak şekilde ayarlandı. Dengeleme işleminden sonra ham enzim özütü kolona yüklendi ve tutunmayan proteinler uzaklaşana kadar 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu geçirildi. Kolonun NaCl konsantrasyonu sıfırdan başlayarak 0,6 M'a kadar yükseltildi. Bunun için 0-0,6 M NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Bu köprü iki beher içerisine ayrı ayrı 200 mL tampon konulması ve bu beherlerden birine konsantrasyonu 0,6 M olacak şekilde NaCl ilave edilmesi ile hazırlandı. Beherler arası tampon geçişi ince bir U cam boru ile sağlandı. Bu şekilde tuz konsantrasyonu dereceli olarak artırıldı. Kolondan çıkan eluatlar yaklaşık 4 mL olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirildi. Eluatlardaki protein miktarı, 280 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri ile belirlendi ve ayrıca tüm eluatlarda esteraz aktivitesine bakıldı. Elde edilen değerlerle absorbans-tüp numarası grafiği çizildi. Aktivitenin yüksek olduğu tüplerden elektroforez yapılarak benzer profil gösterenler birleştirildi. Toplanan enzim eluatları Amicon Ultracel Membrane 10.000 MWCO Milipore kullanılarak konsantre edildi.

### 2.2.4. Enzim Aktivitesinin Tayini ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

Hangi substrat varlığında en yüksek enzim aktivitesinin gözlemlendiğini belirlemek için Lee ve arkadaşları (1999) tarafından kullanılan yöntemle *p*NPA, *p*NPB, *p*NPL ve *p*NPP substratları ile aktivite tayinleri yapıldı. Bunun için substratların 10 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Daha sonra 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon (20 mM Tris-HCl, pH 8,0) karışımları hazırlandı. Bu karışımdan 1100 µL alınıp üzerine 100 µL saf enzim ilave edilerek 50 °C'de 20 dakika bekletildi. Süre sonunda, tüpler, buz içine alınarak reaksiyon durduruldu ve 405 nm'de absorbans okundu. 1 U enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µmol *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.



### 2.2.5. Protein Tayini

Örneklerdeki protein miktarı Lowry metoduyla belirlendi (Lowry vd., 1951). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon grafiği için bir seri serum albumin çözeltisi hazırlandı. Tayinin gerçekleştirilmesi için aşağıdaki işlemler yapıldı.

- Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltisinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL ilave edildi. Bu şekilde BSA'nın son konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olmaktadır.
- Saf enzim eluatından 5 µL başka bir deney tüpüne ilave edildi.
- Standartlara ve örneğe son hacimler 500 µL olacak şekilde 0,1 N NaOH içerisinde hazırlanan %0,1 (w/v) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi.
- 1 mL Lowry E çözeltisi her bir tüpe ilave edilip vortekslendi. Sonrasında oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
- Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktifi'nden 100 µL ilave edildi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- 650 nm'de absorbanlar okundu. Çıkan sonuçlara göre kalibrasyon grafiği çizilerek protein konsantrasyonu hesaplandı.

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

Ham enzim özütündeki ve eluatlardaki esteraz enziminin varlığı doğal poliakrilamid jel elektrofrez ile ortaya konuldu. Doğal elektrofrez, sodyum dodesil sülfat (SDS) içermeyen ortamda ve 10x10 cm ebadındaki elektrofrez jeli kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem için, %5'lik yığıma ve %10'luk ayırma jeli kullanıldı. Elektrofrezde kullanılan çözeltiler ve hacimleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Yığıma Jeli (%5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (%10, pH 8,8)
Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	0,5 mL	--
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	--	2,5 mL
%30 Akrlamid/Bisakrlamid	0,67 mL	3,3 mL
dd H <sub>2</sub> O	2,74 mL	4,1 mL
%10 (APS)	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

Hazırlanan jel donduktan sonra tanka yerleştirildi ve tank doğal elektroforez yürütme tamponu ile dolduruldu. Doğal elektroforez yükleme boyası ile 1:1 oranında karıştırılan örnekler Hamilton şırınga ile kuyucuklara yüklendi. Tank, buz dolu bir kap içine yerleştirildi. Boya, yığıma jelinden çıkana kadar yaklaşık olarak 20 dakika 20 mA'de, daha sonra da ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar 1-1,5 saat 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden dikkatlice çıkartılarak boyama işlemine geçildi.

Saf enzimin varlığının ortaya konulması için yapılan doğal elektroforez sonrası jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası ve substrat boyama çözeltisi ile ayrı ayrı boyandı. Jel, protein bantlarını görüntülenebilir hale getirmek için Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisi içerisinde yaklaşık olarak 10-15 dakika çalkalanarak bekletildi. Süre sonunda, boyanan jel boyama uzaklaştırma çözeltisiyle 2-3 saat çalkalandı.

Substrat boyaması için ise jel, 15 dakika 50 °C'de 50 mL Tris tamponunda (50 mM, pH 8,0) inkübe edildi. Tampon ortamdan uzaklaştırılarak, jel, 2 mL 30 mM  $\beta$ -naftil asetat içeren 100 mL Tris tamponu (50 mM, pH 8,0) içine alındı ve 15 dakika bekletildi. 40 mg Fast Blue B tuzunun ilave edilmesi ile esteraz bantları görünür hale getirildi (Zhou vd., 2004).

### 2.3. Saf Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu

#### 2.3.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla 10 mM'lık stok *p*NPB çözeltisi kullanılarak farklı pH'larda tampon çözeltilerle 1:4:95 (v/v/v) oranında

substrat:etanol:tampon karışımları hazırlandı. Bunun için 50 mM konsantrasyonunda hazırlanan Mcilvaine (pH 4,0-7,0) ve Tris-HCl (7,5-9,0) tamponları kullanıldı. Saf enzim eluatından uygun miktarda ilave edildikten sonra enzim aktivitesi her bir reaksiyon karışımı için belirlendi. Daha sonra Bağlı aktivite (%)-pH grafiği çizilerek *Geobacillus sp.* TF17 esterazının optimum pH'sı belirlendi.

### **2.3.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

Aktivite üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 10 mM'lık stok *p*NPB çözeltisi ve Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,5) kullanılarak 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat:etanol:tampon karışımı hazırlandı. Bu karışımdan alınan 1100 µL'lik kısımlara ayrı ayrı 100 µL saf enzim eklenerek reaksiyon karışımları hazırlandı ve 10 °C'lik artışlarla birlikte 20-80 °C arasındaki sıcaklıklarda 20 dakika bekletildi. Daha sonra bu karışımlardaki aktiviteler tayin edildi ve optimum sıcaklık belirlendi.

### **2.3.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi**

Bu denemede substrat konsantrasyonu sabit tutularak, daha önceden belirlenen optimum şartlar altında ve nihai olarak 0,5-50 µg/mL saf enzim eluatı içerecek şekilde hazırlanan her bir reaksiyon karışımında ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek optimum enzim konsantrasyonu belirlendi.

### **2.3.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Protein miktarı sabit tutularak optimum sıcaklık ve pH değerlerinde yapılan bu çalışmada, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,5) içinde 0,005-0,5 mM son konsantrasyonda *p*NPB içeren etanol:tampon karışımları hazırlandı ve enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlara göre substrat doygunluk eğrisi ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak, optimum substrat konsantrasyonu,  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplandı.

### 2.3.5. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

Saf enzimin pH kararlılığının incelenmesi amacıyla, 50 mM konsantrasyonunda hazırlanan Mcilvaine (pH 4,0-7,0) ve Tris-HCl (7,5-9,0) tamponları kullanıldı. Tampon çözeltileri ve saf enzim eluatı 1:1 oranında karıştırıldı. Enzim-tampon karışımları 4 °C'de ayrı ayrı 1, 2 ve 3 gün boyunca inkübe edildi ve belirtilen sürelerin sonunda, optimum şartlar altında, aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı şekilde hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim - tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri hesaplandı ve bu değerler %100 olarak kabul edilerek inkübe edilen enzimin farklı pH'larda % kalan aktiviteleri hesaplandı.

### 2.3.6. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,5) içindeki saf enzim eluatı, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'de ayrı ayrı 1, 4, 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon işleminin sonunda enzim çözeltisi buz içine alınarak 5 dakika bekletildi ve buzdan çıkartılıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Daha sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Isı ile muamele edilmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, inkübe edilen enzimlerin % kalan aktiviteleri hesaplandı (Kolcuoğlu vd., 2010).

### 2.3.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini incelemek amacıyla; Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. Son konsantrasyonda 1 ve 10 mM metal iyonu içerecek şekilde hazırlanan reaksiyon karışımları ile optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak alınıp metal iyonu ilavesi durumunda % kalan aktiviteler hesaplandı (Hess vd., 2008).

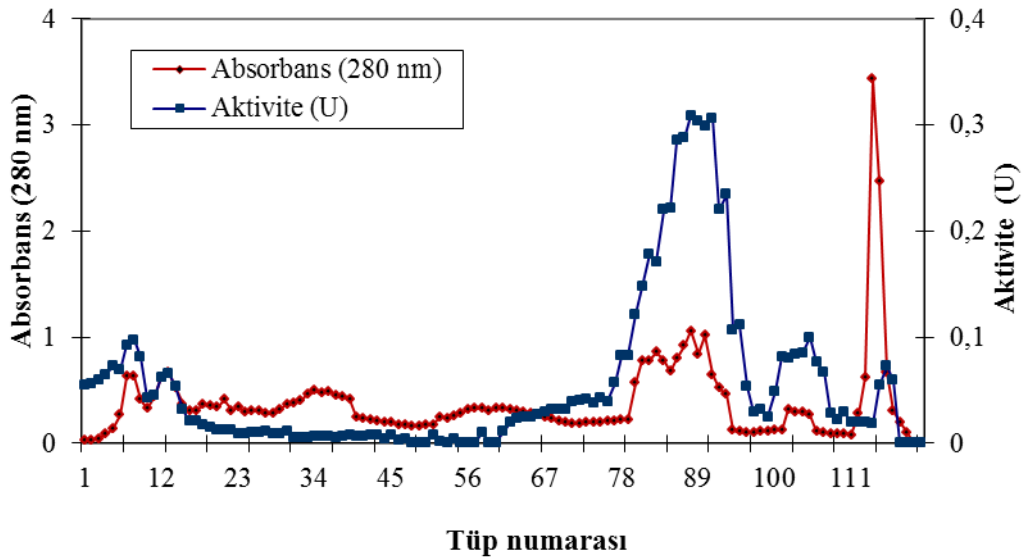
### **2.3.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi**

Aktivite üzerine bazı organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla, reaksiyon karışımlarına nihai konsantrasyonları %10 olacak şekilde metanol, etanol, izopropanol ve asetonitril ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Çözücü içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip % kalan aktiviteler hesaplandı (Nawani vd., 2006).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Enziminin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

*Geobacillus sp.* TF17 suşundan elde edilen ham özütünü saflaştırmak için iyon değişim kromatografisi uygulandı ve uygun şartlar altında tuz köprüsü ile kademeli olarak toplanan fraksiyonların geldiği tüplerde spektrofotometrik olarak, 280 nm’de protein tayini ve 405 nm’de enzim aktivitesi tayini yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen saflaştırma grafiği Şekil 6’da verilmiştir.



Şekil 6. İyon değişim kromatografisi ile *Geobacillus sp.* TF17 esterazının saflaştırılması

1’den 120’ye kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine eluatlar, 4’er mL halinde toplandı. 405 nm’de spektrofotometrik olarak yapılan aktivite tayini sonucuna göre saf enzim içeren fraksiyonlar (85-89 numaralı tüpler) birleştirilerek oluşturulan saf enzim eluatında, ham enzim özütünde ve aseton çöktürmesi sonrası elde edilen süspansiyon çözeltide Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bu tayin sonucunda saf enzim eluatında 0,2 mg/mL, ham enzim özütünde 5,3 mg/mL ve aseton çöktürmesi sonrası elde edilen çözeltide ise 7,6 mg/mL protein miktarı belirlendi. Bu değerler kullanılarak hesaplanan

spesifik aktivite değerlerine göre enzim kaç kat saflaştırıldığı tespit edildi. Tablo 5’de görüldüğü gibi ham enzim özütünde enzim spesifik aktivitesi 0,58 U/mg protein iken, saf enzimdeki spesifik aktivite 33,15 U/mg protein olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlara göre enzim 57,1 kat saflaştırılmış olduğu belirlendi.

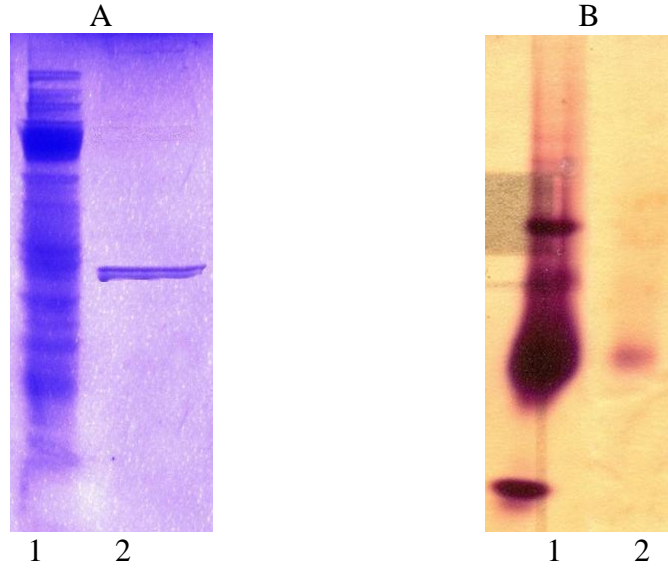
Tablo 5. Esteraz enzimine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımı	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivite (U)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (U/mg Protein)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim zt	8	5,3	0,305	24,4	0,58	100	1
Asetonla ktrme	5	7,6	0,474	23,7	0,62	97,1	1,1
Q Sepharose Fast Flow	3	0,2	0,663	19,9	33,15	81,6	57,1

### 3.2 Enzim Biyokimyasal Olarak Karakterizasyonu

#### 3.2.1. Enzim Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu

Hazırlanan ham enzim özütünde ve saf enzim eluatında esterolitik enzimlerin varlığını ortaya koymak için poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Doğal PAGE’de saf enzimin yrtlp Comassie Brilliant Blue R-250 ile boyanması sonucunda (şekil 7A) tek bir bant gözlendi. Tek bandın gözlenmesi enzimin başarılı bir şekilde saflaştırılabildiğini desteklemektedir. Aynı yöntemle elde edilen ikinci bir jel,  $\beta$ -naftil asetat ve Fast Blue B tuzu ile muamele edildi ve esteraz bantları görünür hale getirildi (şekil 7B). Yapılan alışmalar sonucunda Comassie Brilliant Blue R-250 boyaması ile enzimin saflaştırıldığı, substrat boyama ise saf enzimin esterolitik aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 7. A. Doğal PAGE (Comassie boyama); 1. Ham enzim özüt  
2. Saf enzim eluatı B. Doğal PAGE (Substrat boyama);  
1. Ham enzim özütü 2. Saf enzim eluatı

### 3.2.2. Enzimin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

Enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak, saf enzimin en yüksek aktiviteyi hangi substrat varlığında gösterdiği incelendi. Bunun için *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) substratları ile aktivite tayinleri yapıldı. Saflaştırılan enzimde, aktivite en fazla kısa zincirli *p*-nitrofenol esteri olan *p*NPB varlığında gözlemlendi (Tablo 6). Yapılan tüm biyokimyasal karakterizasyon işlemlerinde substrat olarak *p*NPB kullanıldı.

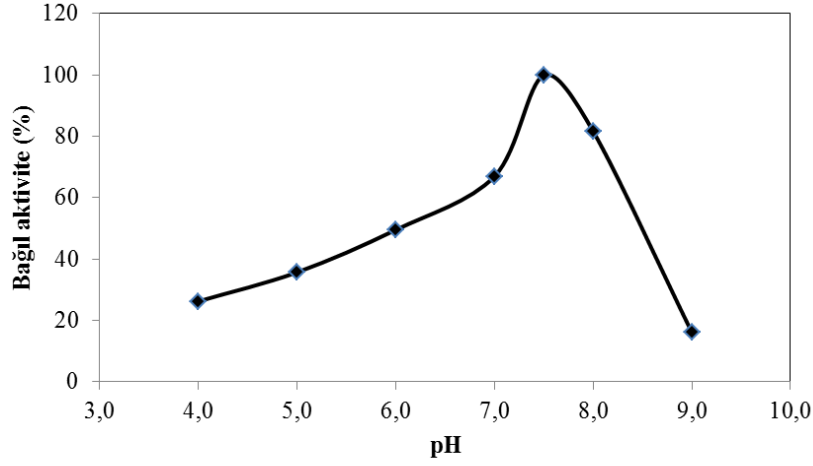
Tablo 6. Enzime ait substrat özgünlüğü tablosu

Substratlar	Bağıl aktivite (%)
<i>p</i> NPB	100
<i>p</i> NPA	61,65
<i>p</i> NPL	2,33
<i>p</i> NPP	0



### 3.2.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

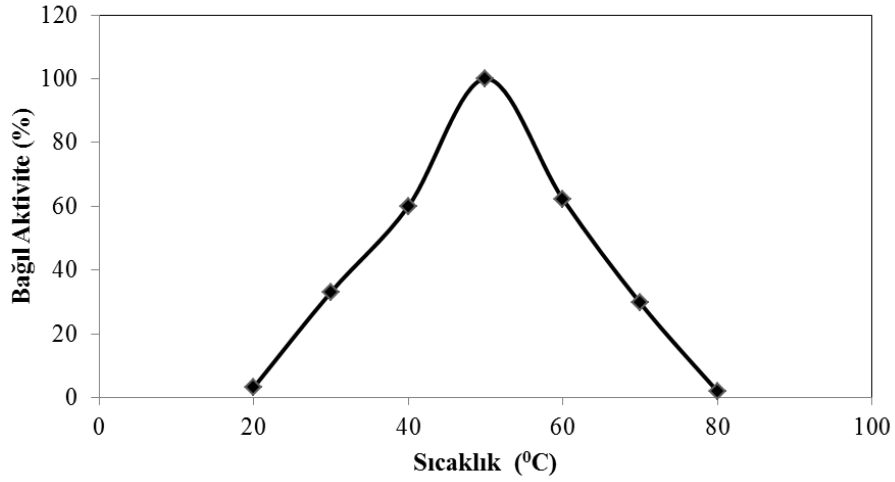
Enzimin etkin olduğu optimum pH değerini belirleyebilmek için *p*NPB substratı varlığında farklı pH (4,0-9,0) değerlerindeki tamponlar kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerler kullanılarak % bağıl aktivite-pH grafiği çizildi (Şekil 8). Elde edilen verilerden enzimin optimum pH değerinin 7,5 olduğu belirlendi. Grafik göz önünde bulundurulduğunda, pH 8,0'da, enzim aktivitesini, %80'e yakını mevcutken, pH 7,0'da, enzim aktivitesinin %70'ini gösterebilmiştir. pH 4,0, pH 5,0 ve pH 9,0'da enzim aktivitesinin belirgin şekilde düştüğü görülmektedir.



Şekil 8. pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi

### 3.2.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

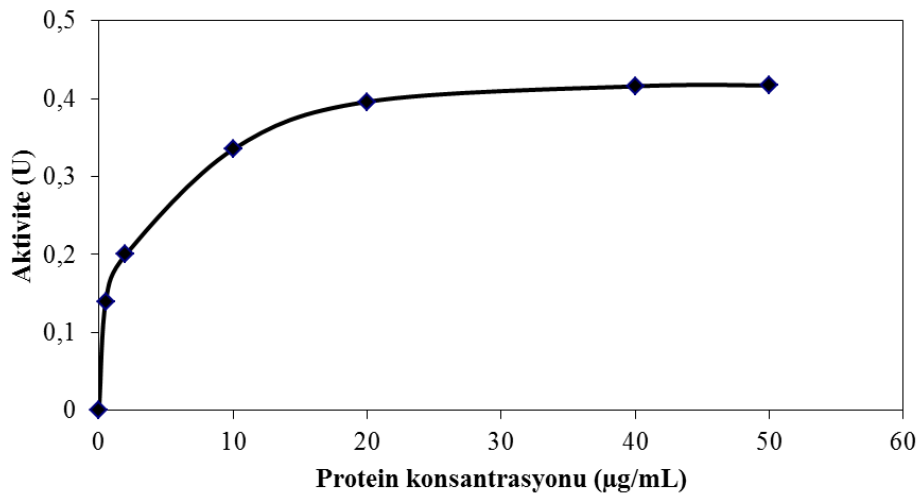
Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek için 10 °C'lik artışlar sağlanarak 20-80 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler, %bağıl aktivite-sıcaklık grafiğine aktarıldı (Şekil 9). Çizilen grafikten saf enzimin en yüksek aktiviteyi 50 °C'de gösterdiği belirlendi. 20 °C'deki aktivitenin hemen hemen sıfır olduğu ancak sıcaklık arttıkça aktivitenin arttığı görülmektedir. 50 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda enzimin aktivitesini kaybetmeye başladığı, 70 °C'de enzimin aktivitesinin %70'ini, 80 °C' de ise tamamını kaybettiği görülmektedir.



Şekil 9. Sıcaklığın aktivite üzerine etkisi

### 3.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

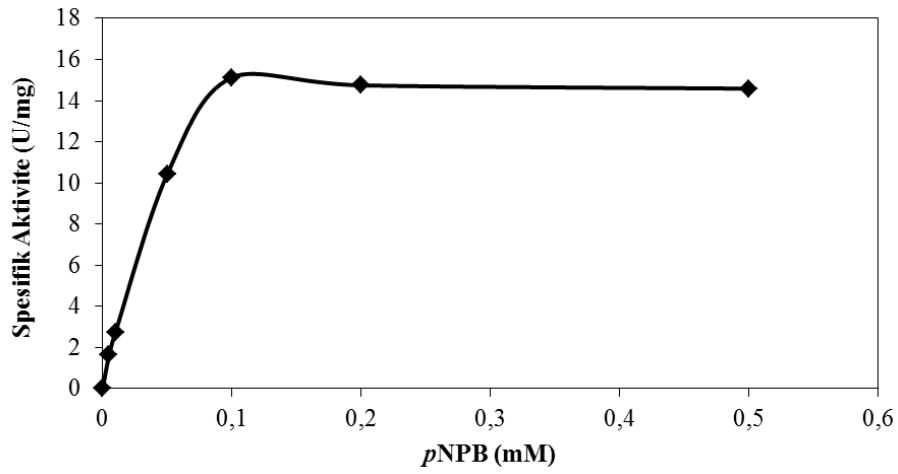
Enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisini incelemek üzere substrat konsantrasyonu sabit tutularak farklı protein konsantrasyonlarında reaksiyon karışımlar, hazırlandı. Reaksiyon karışımlarında, 0,5-50  $\mu\text{g/mL}$  son konsantrasyonda protein içerecek şekilde enzim çözeltileri kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Ölçülen aktivite değerlerine karşı protein konsantrasyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 10). Elde edilen hiperbolik eğriden, belirtilen şartlarda ve substrat konsantrasyonunda optimum enzim konsantrasyonu 20  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlendi.



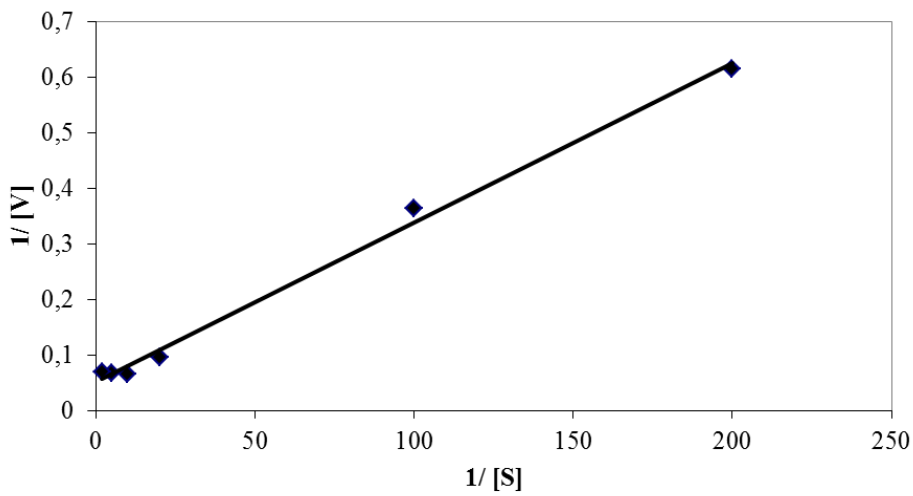
Şekil 10. Protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

### 3.2.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile daha önceden belirlenen optimum şartlarda ve sabit protein konsantrasyonunda farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden substrat doygunluk eğrisi (Şekil 11) ve Lineweaver-Burk (Şekil 12) grafiği çizilmiştir. Grafiklerden yola çıkarak, optimum substrat konsantrasyonu 100  $\mu\text{M}$ ,  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0,056 mM ve 19,38 U/mg protein olarak tespit edildi.



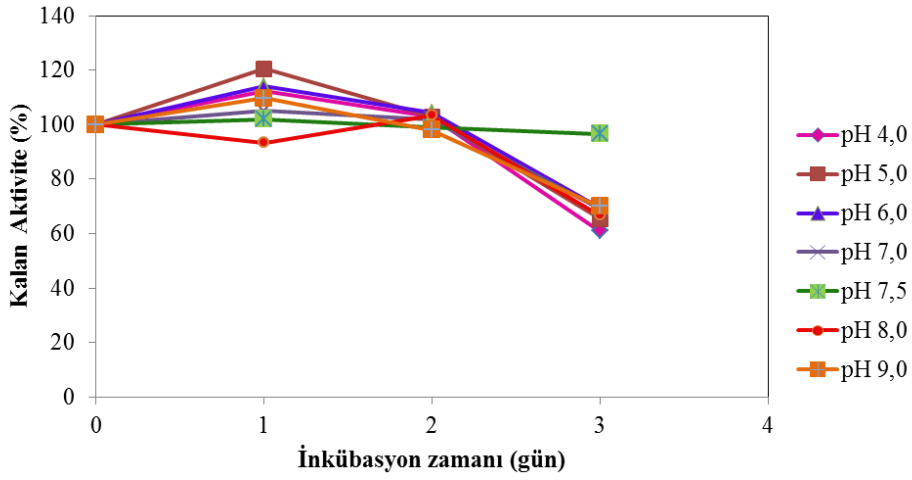
Şekil 11. Enzimin substrat doygunluk eğrisi



Şekil 12. pNPB varlığında enzimin Lineweaver-Burk eğrisi

### 3.2.7. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

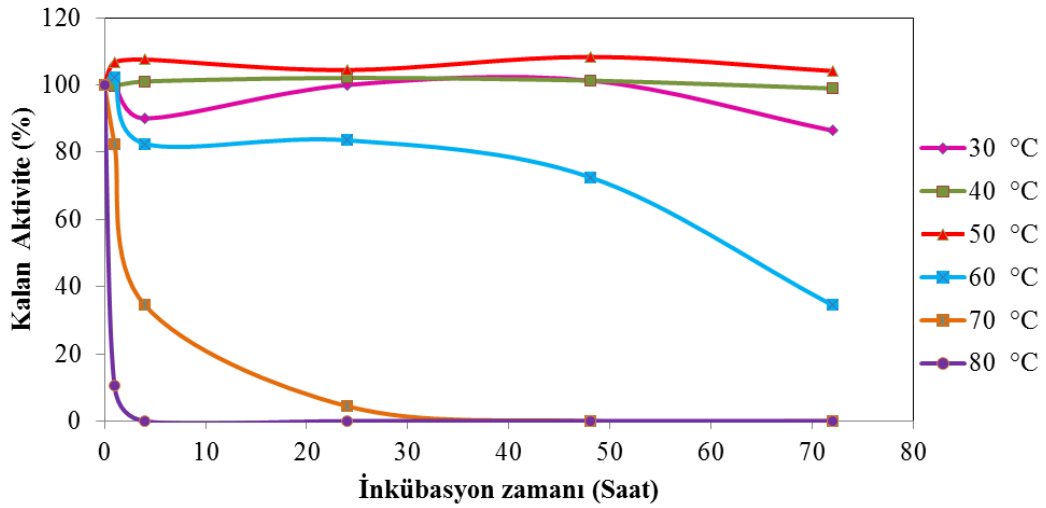
Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim eluatı, pH 4,0-9,0 arasındaki tamponlarla karıştırılarak 4 °C'de 1, 2 ve 3 gün boyunca bekletildikten sonra, önceden belirlenen optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen verilerden kalan aktiviteye karşı inkübasyon zamanı grafiği çizildi (Şekil 13). Grafikten de anlaşılacağı üzere, enzimin farklı pH'lardaki tamponlar içinde 4 °C'de bekletilmesiyle aktivitesini, 2. günün sonunda tamamını, 3. günün sonunda ise pH 7,5'da %100'ünü koruduğu, diğer pH değerlerinde ise yaklaşık %60'ını koruduğu görülmektedir.



Şekil 13. Enzimin pH kararlılık grafiği

### 3.2.8. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla yapılan çalışmalar, 10 °C'lik artışla 30-80 °C sıcaklık aralığında ve 1, 4, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde gerçekleştirildi. Her bir deneme tüpünden alınan örnekler optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Gözlenen kalan aktiviteler, inkübasyon zamanına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 14). Grafik incelendiğinde 80 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonucunda enzimin aktivitesinin %90'ını kaybettiği görülmüştür. 4. saatin sonunda, 80 °C'deki aktivitenin tamamen sıfırlandığı, 70 °C'deki aktivitenin %70, 30 ve 60 °C'deki değerlerin yaklaşık %20 azaldığı gözlemlenmiştir. 72 saatlik sürenin sonunda 40 ve 50 °C'de aktivite tamamen korunmuştur. 60 °C'de enzimin aktivitesini %30 oranında koruduğu, 30 °C'de ise bu değerlerin %90 olduğu görülmüştür.



Şekil 14. *Geobacillus* sp. TF17 esterazının ısıl kararlılık grafiği

### 3.2.9. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. Reaksiyon karışımındaki metal iyonlarının son konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM olacak şekilde düzenlendi ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve iyon varlığındaki aktivite % kalan aktivite olarak hesaplanarak tablo haline getirildi (Tablo 7). Tabloda görüldüğü gibi 1 mM nihai konsantrasyonda  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Na}^+$  varlığında esteraz aktivitesinde kayda değer bir değişim gözlenmedi.  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  varlığında yaklaşık %25-30 arasında bir inhibisyon gözlemlendi. Konsantrasyon 10 mM olduğunda ise  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  ve  $\text{Mg}^{2+}$  varlığında enzim yaklaşık %80 aktif bulunmuştur.  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  varlığında aktivitenin %45-60'ı mevcut iken,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  kullanıldığında enzim, aktivitesinin tamamına yakını kaybetmiştir.

Tablo 7. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Metal İyonu	Kalan aktivite (%) (Son konsantrasyon 1 mM)	Kalan aktivite (%) (Son konsantrasyon 10 mM)
Yok	100	100
Mn <sup>2+</sup>	98	60
Co <sup>2+</sup>	95	46
Na <sup>+</sup>	91	79
Li <sup>+</sup>	87	81
Mg <sup>2+</sup>	87	78
Ca <sup>2+</sup>	83	55
Cu <sup>2+</sup>	78	9
Zn <sup>2+</sup>	72	1

### 3.2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla ile, reaksiyon karışımlarına son konsantrasyonları %10 olacak şekilde metanol, etanol, izopropanol, asetonitril, ilave edilerek optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Çözücü içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip, % kalan aktivite hesaplandı (Tablo 8). Metanol ve etanolün enzim aktivitesi üzerinde %35 oranında inhibisyona sebep olduğu gözlemlendi. İzopropanol, enzim aktivitesini %64 oranında inhibe ederken, asetonitril, % 82 oranında inhibisyona neden olmuştur.

Tablo 8. Bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Organik çözücü	Kalan aktivite (%) (Son konsantrasyon % 10)
Yok	100
Etanol	65
Metanol	64
İzopropanol	36
Asetonitril	18

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Geobacillus sp.* TF17' de esteraz enziminin varlığı tespit edilmiş, iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmış ve saf enzim biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Enzimin biyokimyasal ve kinetik özellikleri araştırılıp, elde edilen veriler diğer organizmalarda çalışılan esterazlar ile karşılaştırılmıştır.

*Geobacillus sp.* TF17 suşundan ham enzim özütü hazırlandı ve ön saflaştırma işlemi olarak soğuk asetonla çöktürme yapıldı. Bu işlem sonunda elde edilen enzim özütü Q-Sepharose Fast Flow kolonuna tatbik edildi ve böylece enzimin iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirildi (Şekil 6). Ham enzim özütünde, enzimin spesifik aktivitesi 0,58 U/mg protein, iyon değişim kromatografisi sonucu saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi ise 33,15 U/mg protein olarak bulunmuştur (Tablo 5). Bu sonuçlara göre enzim, 57,1 kat saflaştırılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda esteraz enziminin iyon değişim kromatografisi ile termoasidofilik *arkeon*'dan Q-Sepharose jeli ile 12,5 kat (Kim ve Lee, 2004), bir *Bacillus* türünden 42,7 kat (Sana vd., 2007), *Melanocarpus albomyces*' ten 52 kat (Kontkanen vd., 2006), *Bacillus licheniformis* S-86'dan 76,7 kat (Torres vd., 2008), *Sparassis crispa* mantarından 73 kat (Chandrasekaran vd., 2011) saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

İyon değişim kromatografisi ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminden sonra elde edilen saf enzim eluatı elektroforetik olarak analiz edilmiştir. Hazırlanan %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edilen ham enzim özütünün substrat boyaması sonucunda ( $\beta$ -naftilasetat - Fast Blue B), esterolitik aktivitenin varlığını gösteren 4 bant gözlenmiştir. Bu sonuca göre ham enzim özütünde esterolitik aktiviteden sorumlu farklı proteinlerin varlığından veya izoenzimlerin mevcudiyetinden söz edilebilir. Ancak saf enzim eluatını içeren elektroforez jelinin Comassie brilliant blue R-250 ve ayrıca substrat boyaması sonucu gözlenen tek bir bant başarılı bir saflaştırma işleminin gerçekleştirildiğini desteklemektedir (Şekil 7A ve 7B). Literatürde birden fazla esteraz izoenzimlerinin varlığı, *Acetobacter pasteurianus* (Kashima vd., 1998), *Streptococcus thermophilus* (Liu vd., 2001), *Cucurbita pepo* cv "Eskandrani" (Fahmy vd., 2008), *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553 (Monti vd., 2008) gibi daha önce yapılan birçok çalışmada da ortaya konmuştur.

*Geobacillus sp.* TF17'ye ait özütün sahip olduğu esterolitik aktivitenin substrat özgünlüğünü ortaya koymak amacıyla, içerdikleri karbon sayıları farklı, değişik

uzunluktaki *p*-nitrofenol esterleri (*p*NPA, *p*NPB, *p*NPL ve *p*NPP) kullanıldı ve kısa zincirli *p*NPB substratı varlığında esterolitik aktivitenin en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir (Tablo 6). Bu sonuç *Geobacillus sp.* TF17'den saflaştırılan hidrolitik aktiviteden sorumlu enzimin kısa zincirli esterlerin hidrolizini katalizleyen bir esteraz olabileceğini göstermektedir ki benzer sonuçlar farklı organizmalarda yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Tao vd., 2011; Fu vd., 2011; Chuang vd., 2011). Bu nedenle saflaştırmadan sonraki karakterizasyon çalışmalarında *p*NPB enzim substratı olarak kullanılmıştır.

pH, enzimlerin aktivitelerinin ifadesinde belirleyici bir faktördür. Literatürde, esterazların genellikle nötral pH'ya yakın değerlerde maksimum aktivite gösterdikleri görülmüştür. *Geobacillus sp.* TF17'den saflaştırılan enzimin sergilediği esterolitik aktivitenin pH'ya bağımlılığı pH 4,0-9,0 aralığında incelendi. Enzimin asidik ve bazik pH değerlerinde düşük aktivite gösterdiği, pH 7,5'ta ise aktivitenin maksimum değere ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 8). Bu sonuç, saflaştırılan enzimin hidrolitik aktivitesinin pH değerinin literatürle uyum içerisinde olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar; Rattray ve Fox'un (1997) *Brevibacterium linens* ATCC 9174'den ve Fucinos vd.'nin (2011) *Thermus thermophilus* HB27'den elde ettiği esterolitik enzim üzerinde yaptığı çalışmalarda (optimum pH 7,5) bulunurken, Torres vd.'nin (2009) *Bacillus licheniformis* S-86'dan ve Chandrasekaran vd.'nin (2011) *Sparassis crispa* mantarından elde ettikleri enzimin optimum pH değeri 8,0 olarak rapor edilmiştir.

*Geobacillus sp.* TF17'den saflaştırılan esteraz enziminin aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 20-80 °C aralığında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 9). Enzimin aktivitesi 40 °C ve 60 °C'de %70 oranında mevcutken, 20 °C ve 80 °C'de ise enzim aktivitesini tamamen kaybettiği gözlenmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen esterazların optimum sıcaklıkları şu şekildedir; bir *Bacillus* türünde (Sana vd., 2007) 45 °C, *Bacillus licheniformis* S-86 (Torres vd., 2009)'da 60 °C, *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 (Yu vd., 2010)'de 75 °C ve *Sparassis crispa* mantarında ise (Chandrasekaran vd., 2011) 50 °C.

*Geobacillus sp.* TF17 esterazının pH kararlılığı, saf enzimin farklı pH'lardaki tamponlar içinde 4 °C'de 1-3 gün boyunca inkübasyona bırakılmasıyla incelendi. Gerçekleştirilen bu işlemlerle, birinci günün sonunda pH 8,0 dışındaki değerlerde aktivitede %20'ye varan artış görüldü. 2 günlük inkübasyon sonrasında enzim aktivitesini tüm pH değerlerinde tamamen korumuştur. 3 gün boyunca farklı pH değerlerindeki tampon çözeltiler içinde inkübe edilen enzimin, optimum pH değerinde, orijinal aktivitesinde



herhangi bir kayıp gözlenmezken, diğer pH değerlerinde aktivitenin yaklaşık %30 oranında kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 13). Ateşlier ve Metin'in (2006) çalışmasında ki *Bacillus* sp. 4'den elde edilen esterazın aktivitesini 10 saatlik inkübasyonu sonucunda, pH 4,0 ve 8,0 aralığında, %80'den fazla koruduğu, pH 10,0'da ise %45 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Vafiadi vd.'nin (2009) yaptığı çalışmada, saflaştırılan esteraz enzimin pH 8,0'da 430 ve 286 dakikalık inkübasyon sonucunda, sırasıyla 50 °C ve 55 °C'de, aktivitesinin %50'sini koruduğu bildirilmiştir. Elde edilen bu veriler *Geobacillus* sp. TF17'den elde edilen esterazın oldukça pH kararlı bir enzim olduğunu göstermektedir.

Enzimin ısı kararlılığını belirlemek amacıyla, saf enzim 72 saat boyunca 30-80 °C arasındaki sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 48 saatlik inkübasyon sonunda 60 °C'de aktivitenin %70'inin korunduğu görülmektedir. 72 saat sonunda, 60 °C'de aktivitenin %40'ının, 30-50 °C'de ise aktivitenin neredeyse tamamının korunduğu Şekil 14'ten anlaşılmaktadır. *P. furiosus* esterazi, 75 °C'de iki saat bekletildiğinde aktivitesinin tamamını korumakta, 100 °C'de ise aktivitesini hemen kaybetmektedir (Almeida vd., 2006). *Bacillus* sp. Esterazı 65 °C'de 10 saat inkübe edildiğinde aktivitesini %50 oranında korumuştur (Ateşlier ve Metin, 2006). *P. torridus* EstA ve EstB esterazlarının, 90 °C'de, sırasıyla 21 ve 10 saat inkübe edilmeleri sonucunda aktivitelerinin %50'sini kaybettikleri bildirilmiştir (Hess vd., 2008). *Thermus thermophilus* HB27 esterazının 85 °C'de 10 saatlik inkübasyondan sonra oldukça kararlı olduğu rapor edilmiştir (Fucinos vd., 2011). Literatürde verilen bu bilgiler dikkate alındığında, *Geobacillus* sp. TF17 esterazının 30-50 °C aralığında 72 saatlik inkübasyonu sonucunda ısı kararlılığının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

*Geobacillus* sp. TF17 esteraz aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla, son protein konsantrasyonu 0,5-50 µg/mL olan reaksiyon karışımlar hazırlandı ve bu karışımlarda aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde, protein konsantrasyonu 20 µg/mL'ye ulaşıncaya kadar aktivitenin hızlı bir şekilde arttığı ve bu değer yukarıdaki konsantrasyonlarda aktivitenin protein miktarından bağımsız olduğu ortaya konmuştur (Şekil 10).

Esteraz enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla protein miktarı sabit tutularak, farklı substrat konsantrasyonlarında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 19,38 U/mg protein ve 0,056 mM olarak bulunmuştur (Şekil 11 ve 12). Daha önce yapılan çalışmalarda esteraz aktivitesi için bulunan  $K_m$  değerleri,

*T. maritima*, *Bacillus* sp., *G. thermoleovorans* YN, pirinç kepeği esterazları için sırasıyla 0,148 mM, 0,06 mM, 6,74 mM ve 0,027 mM olarak bildirilmiştir (Levisson vd., 2007; Ateşlier ve Metin, 2006; Soliman vd., 2007; Chuang vd, 2011). Fu vd.'nin (2011) yaptığı bir çalışmada saflaştırılan rekombinant bir esterazın  $K_m$  değeri ise 0,46 mM olarak bulunmuştur. Birçok endüstriyel enzimin  $K_m$  değerinin 0,01 mM ile 100 mM arasında olduğu bildirilmiştir (Fullbrook, 1996). Bu nedenle, *Geobacillus* sp. TF17 esterazının ilgili endüstriyel alanlarda kullanılabileceği açıktır.

Bir çok enzim, etkinlik gösterebilmek için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyar. Metal iyonları farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olmaları gibi sebeplerle, proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucu olarak da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock vd., 1999; Di Tusa vd., 2001). *Geobacillus* sp. TF17'den saflaştırılan enzim üzerine  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  iyonlarının etkisi 1 mM ve 10 mM nihai konsantrasyonlarda olacak şekilde incelendi (Tablo 7). Son konsantrasyonu 1 mM olan metal iyonları karışımlarının aktivite üzerindeki etkileri incelendiğinde,  $Zn^{2+}$  iyonu varlığında, aktivite %70 oranında korunmuşken, diğer metal iyonları varlığında yaklaşık %80-90 oranında aktivite korunmuştur. 10 mM'lık karışımlar incelendiğinde ise  $Na^+$ ,  $Li^+$  ve  $Mg^{2+}$  iyonları varlığında aktivitenin yaklaşık %80'inin korunduğu,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  varlığında aktivitenin %45-60 oranında korunduğu,  $Zn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  kullanıldığında ise aktivitenin tamamına yakınının kaybolduğu gözlenmiştir. Benzer sonuçlar,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$  ve  $Al^{3+}$  varlığında *Lycoperdon perlatum* esterazında (Colak, vd., 2009),  $Na^+$  ile *P. torridus* EstA ve EstB esterazlarında (Hess vd., 2008),  $Mn^{2+}$  ile ise *Ralstonia* sp. M1 esterazı (Quyen vd., 2007) durumunda elde edilmiştir. Bir başka çalışmada ise *Sparassis crispa* mantarından saflaştırılan esterazın, 5mM  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $K^+$  varlığında aktivitesini %40 oranında kaybettiği ve ayrıca  $Ca^{2+}$  dışındaki tüm metal iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiğini ortaya konmuştur (Fu vd., 2011).

*Geobacillus* sp. TF17'den saflaştırılan esterazın, aktivitesinin, bazı organik çözücüler mevcudiyetinde, ne şekilde değiştiğini gözlemek amacıyla bir dizi reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Son konsantrasyonu %10 olarak hazırlanan metanol, etanol, izopropanol ve asetonitril içeren reaksiyon karışımları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, metanol ve etanol durumunda, aktivitenin yaklaşık %65'i korunurken, bu değer izopropanol için %36 ve asetonitril için %18 olarak tespit edilmiştir (Tablo 8).

Termoasidofilik *arkeon*'dan elde edilen esterazların organik çözücüler içerisindeki aktiviteleri incelendiğinde, etanol varlığında aktivitede %10'luk bir artışın gözlemlendiği, metanol ve izopropanol varlığında aktivitenin neredeyse tamamının inhibe olduğu, asetonitril durumunda ise %60'lık bir inhibisyonun gerçekleştiği ortaya konmuştur (Kim ve Lee, 2004). *Kluyveromyces marxianus* CBS 15532'den saflaştırılan esterazın metanol ve etanol varlığındaki aktivitesi sırasıyla %82 ve %76 oranında korunmuştur (Monti vd., 2007). Fu vd.'nin (2011) yaptığı çalışmada klonlanan esterazın metanol ve etanol varlığındaki kalan aktivite değerleri sırasıyla %96 ve %70 olarak bulunmuştur. *Geobacillus sp.* TF17 suşundan elde edilen esterazın organik çözücülere karşı davranışının literatürle uyum içerisinde olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, *Geobacillus sp.* TF17 suşundan saflaştırılan esterolitik aktiviteye sahip bir enzimin, bazı organik çözücülere ve metal iyonlarına karşı duyarlı, pH ve ısıl kararlı olduğu gözlemlenmiş ve ayrıca  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri açısından literatürde bilinen esterazlardan bazı üstün özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen veriler dikkate alındığında enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir bir potansiyele sahip olduğu açıkça görülmektedir.

## 5. ÖNERİLER

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları yüksek verim ve yüksek hızda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörlerdir ve bu özelliklerinden dolayı hem biyoteknolojik hem de endüstriyel işlemlerde enzimlerin kullanımının gün geçtikçe arttığı bilinmektedir. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle endüstriyel enzimler ile ilgili alanda yapılan çeşitli araştırmalar giderek önem kazanmaktadır.

Endüstrinin ihtiyaç duyduğu enzimlerin bir grubunu oluşturan lipaz ve esterazların, gıda, deri, deterjan ve ilaç sanayi gibi pek çok alanda kullanılmaya başlanması bu enzimlerle ya da bu enzimleri üreten organizmalarla ayrıntılı çalışmaların yapılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Doğal bazı enzimlerin yüksek maliyete ve düşük kararlılığa sahip olması, aynı zamanda seçiciliği ve aktiviteleri endüstriyel teknolojide kullanımını engellemektedir. Termofilik bakterilerle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen enzimlerin ise aktif olmaları, yüksek sıcaklıklarda kararlılık göstermeleri ve hatta yüksek basınçlı ortamlarda termal kararlılıklarını sürdürebilmeleri endüstriyel açıdan bu tür enzimleri cazip kılmıştır. Esteraz/lipaz enzimlerinin termofilik bakterilerden izole edilip, saflaştırılması ve ileri derecede karakterize edilmesi son zamanlarda bu alanda yapılan birçok çalışmanın temelini oluşturmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulardan yararlanılarak ilgili endüstri alanları için daha gelişmiş ve uygun özelliklere sahip türlerin farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilmesi yeni yapılacak araştırmalar için yol gösterici olacaktır. Ayrıca bu enzimlerin kaynağı olan mikroorganizmaların, genetik mühendisliği, biyokimyasal ve biyoteknolojik yöntemler yardımıyla modifiye edilmesi, özel ihtiyaçlara cevap verebilecek enzim üreten mikroorganizmaların elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Son zamanlarda enzim üretimini daha verimli hale getirebilmek için çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlardan biri rekombinant DNA teknolojisidir. Bu teknoloji sayesinde enzimleri kodlayan genleri izole etmek ve bu genlerin üzerinde çalışmak, özellikle genetik mutasyonlar yapmak, günümüzde artık olanaklı hale gelmiştir. Bunun gibi ileri teknolojik yöntemlerle lipaz/esteraz enziminin daha kontrollü ve daha bol üretilmesi sağlanabilir. Bu sebeple, *Geobacillus sp.* TF17 esterazının uygun bir konakçıya klonlanarak, bol miktarda ekspres edilmesi ve saflaştırma

işleminin daha kolay hale getirilmesi sağlanabilir. Bunun yanında çeşitli mutasyon teknikleri kullanılarak enzim davranışındaki değişimler incelenebilir.

Yaygın olarak kullanılan teknolojilerden bir diğeri ise enzimin kararlılığını artıran ve ürünün reaksiyon ortamından uzaklaştırılıp enzimin tekrar kullanılabilirliğini kolaylaştıran immobilizasyon tekniğidir. Bu teknikle, *Geobacillus sp.* TF17 esterazı, endüstriyel uygulamalarda, özellikle tekrar kullanılabilirliğini sağlamak amacıyla immobilize edilebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akkuş, P., 2006. Lipaz Kullanılarak Şeker Esteri Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, G.Y.T.E., Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Almeida, R.V., Alqueres, S.M.C., Larentis, A.L., Rössle, S.C., Cardoso, A.M., Almeida, W.I., Bisch, P.M., Alves, T.L.M. ve Martins, O.B., 2006. Cloning, Expression, Partial Characterization and Structural Modeling of a Novel Esterase from *Pyrococcus furiosus*, Enzyme and Microbial Technology, 39, 1128-1136.
- Ateşlier, Z.B.B. ve Metin, K., 2006. Production and Partial Characterization of a Novel Thermostable Esterase from a Thermophilic *Bacillus sp.*, Enzyme and Microbial Technology, 38, 628-635.
- Balcao, V.M., Paiva, A.L. ve Malcata, F.X., 1996. Bioractors with Immobilized Lipases: State of the Art, Enzyme and Microbial Technology, 18, 392-416.
- Bano, 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, Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular And Cell Biology of Lipids, 1632, 55-61.
- Becker, P., Abu-Reesh I., Markossian, S., Antranikian, G. ve Markl, H., 1997. Determination of the Kinetic Parameters During Continious Cultivation of the Lipase-Producing Thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 on Olive Oil, Applied Microbiology And Biotechnology, 48, 184-190.
- Becker, P., Köster, D., Popov, MN., Markossian, S., Antranikian, G. Ve Markl, H., 1999. the Biodegradation of Olive Oil and the Yreatment of Lipit-Rich Wool Scouring Wastewater Under Aerobic Thermophilic Conditions, Water Research, 33, 653-660.
- Benayoud, F., Abouabdellah, A., Richard, C., Bonnet-Delpon, D., Begue, J.p., Levasseur, D., Boutaud, O. ve Schuber, F., 2000. Trifluoronethyl Ketones Derived from Squalene: Inhibition of the Cholesterol Biosynthesis in HepG2 Cells, Tetrahedron Letters, 41, 6367-6370.
- Ben-Shem, A., Fass, D. ve Bibi, E., 2007. Structural Basis for Intramembrane Proteolysis by Rhomboid Serine Proteases, Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 462-466.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, Biotechnology Advances, 18, 355-383.
- Bock C.W., Katz, A.K., Markham, G.D. ve Glusker, J.P., 1999. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions, Journal of the American Chemical Society, 121, 7360-7372.

- Bornscheuer, U.T. ve Kazlauskas, R.J., 1999. *Hydrolases in Organic Synthesis-Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Bornscheuer, U.T., 2002. Microbial Carboxyl Esterases: Classification, Properties and Application in Biocatalysis, FEMS Microbiology Reviews, 26, 73-81.
- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R. ve Krishna, S.H., 2002. Optimizing Lipases and Related Enzymes for Efficient Application, Trends in Biotechnology, 20, 433-437.
- Chandrasekaran, G., Kim, G.J. ve Shin, H.J., 2011. Purification and Characterisation of an Alkaliphilic Esterase from a Culinary Medicinal Mushroom, *Sparassis crispa*, Food Chemistry, 124, 1376-1381.
- Chuang, H.H., Chen, P.T., Wang, W.N., Chen, Y.T., ve Shaw, J.F., 2011. Functional Proteomic Analysis of Rice Bran Esterases/Lipases and Characterization of a Novel Recombinant Esterase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 2019-2025.
- Cihan, A.C., Ozcan, B., Tekin, N. ve Cokmus, C., 2011. *Geobacillus thermodenitrificans* Subs. Calidus, Subs. Nov., a Thermophilic and  $\alpha$ -Glucosidase Producing Bacterium Isolated from Kizilcahamam, Turkey, Journal of General and Applied Microbiology, 57, 83-92.
- Colak, A., Camedan, Y., Faiz, Ö., Sesli, E. ve Kolcuoğlu, Y., 2009. An Esterolytic Activity from a Wild Edible Mushroom, *Lycoperdon perlatum*, Journal of Food Biochemistry, 33, 482-499.
- Demeyer, D., Hooze, J. ve Mesdom, H., 1974. Specificity of Lipolysis During Dry Sausage Ripening, Journal of Food Science, 39, 357-362.
- Demirjian, D.C., Moris-Varas, F. ve Cassidy, C.S., 2001. Enzymes from Extremophiles, Current Opinion in Chemical Biology, 5, 144-151.
- Desnuelle, P., 1972. *The Lipases: The Enzymes*, 37. New York, Academic Press, 575.
- DiTusa, C.A., Christensen, T., McCall, K.A., Fierke, C.A. ve Toone, E.J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding. 1. Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 5338-5344.
- Ebrahimpour, A., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M. ve Salleh, A.B., 2011. High Level Expression and Characterization of a Novel Thermostable, Organic Solvent Tolerant, 1,3-regioselective Lipase from *Geobacillus sp.* Strain ARM, Bioresource Technology, 102, 6972-6981.
- Eggert, T., Pouderoyen, G.V., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, E., Dijkstra, B.W. ve Jeager, K., 2002. Biochemical Properties and Three Dimensional Structures of Two Extracellular Lipolytic Enzymes from *Bacillus subtilis*, Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 26, 37-46.

- Fahmy, A.S., Abo-Zeid, A.Z., Mohamed, T.M., Ghanem, H.M., Borai, I.H. ve Mohamed, S. A., 2008. Characterization of Esterases from *Cucurbita pepo* cv. "Eskandrani", Bioresource Technology, 99, 437-443.
- Faiz, Ö., 2005. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, Hücre dışı Lipaz/Esteraz Yeteneğinin İncelenmesi ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Faiz, Ö., Colak, A., Kolcuoğlu, Y. ve Ertunga, N.S., 2011. Cloning, Expression and Characterization of Xylose Isomerase from Thermophilic *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4 Strain, Turkish Journal of Biochemistry, 36, 1,6-14.
- 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.
- Fu, C., Hu, Y., Xie, F., Guo, H., Ashforth, E. J., Polyak, S. W., Zhu, B. ve Zhang, L., 2011. Molecular Cloning and Characterization of a New Cold-Active Esterase from a Deep-Sea Metagenomic Library, Applied Microbiology and Biotechnology, 90, 961-970.
- Fucinos, P., Atanes, E., Lopez, O.L., Cerdan, M.E., Siso, M.I.G., Pastrana, L. ve Rua, M.L., 2011. Production and Characterization of Two N-terminal Truncated Esterases from *Thermus thermophilus* HB27 in a Mesophilic Yeast: Effect of N-terminus in Thermal Activity and Stability, Protein Expression and Purification, 10.1016/j.pep.2011.04.002.
- Fucinos, P., Pastrana, L., Sanroman, A., Longo, M.A., Hermoso, J.A. ve Rua, M.L., 2011. An Esterase from *Thermus thermophilus* HB27 with Hyper-Thermoalkalophilic Properties: Purification, Characterisation and Structural Modelling, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 70, 127-137.
- Fukumoto, J., Iwai, M. ve Tsujisaka, Y., 1963. Studies on Lipase I. Purification and Crystallisation of a Lipase Secreted by *Aspergillus niger*, Journal of General and Applied Microbiology, 9, 353-361.
- Fullbrook, P.D., 1996. Practical Applied Kinetics. In: Godfrey, T., West, S. (Editors). Industrial Enzymology. Second Edition, Stockholm Pres, New York.
- Gao, X.G., Cao, S.G. ve Zhang, K.C, 2000. Production, Properties and Application to Nonaqueous Enzymatic Catalysis of Lipase from a Newly Isolated *Pseudomonas* Strain. Enzyme and Microbial Technology, 27, 74-82.
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P. ve Davidson, S. 1996. Microbial Lipases: Production and Applications, Science Progress, 79,2, 119-157.
- Harrison, E.H., 1998. Lipases and Carboxylesterases Possible Roles in the Hepatic Metabolism of Retinol, Annual Review of Nutrition, 18, 259-276.



- Harrison, E.H., 2000. Lipases and Carboxylesterases Possible Roles in the Hepatic Utilization of Vitamin A, Journal Nutrition, 130, 340-344.
- Hespell, R.B. ve O'Bryan-Shah, P.J., 1988. Esterase Activities in *Butyrivibrio fibrisolvens* Strains, Applied Environmental Microbiology, 54, 1917-1922.
- Hess, M., Katzer, M. ve Antranikian, G., 2008. Extremely Thermostable Esterases from the Thermoacidophilic Euryarchaeon *Picrophilus torridus*, Extremophiles, 12, 351-364.
- Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberté, S. ve Sarhan F., 2003. Immunolocalization of Freezing-Tolerance-Associated Proteins in the Cytoplasm and Nucleoplasm of Wheat Crown Tissues, The Plant Journal, 8, 583-593.
- İnan K., 2011. İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıcalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazının Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M. ve Misset, O., 1994. Bacterial Lipases, FEMS Microbiology Reviews, 15, 29-63.
- Jaeger K.E. ve Reetz, M.T., 1998. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology, Trends in Biotechnology, 16, 396-403.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. ve Reetz, M.T., 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures and Biotechnological Applications of Lipases, Annual Reviews Microbiology, 53,1, 315-351.
- Jung, J.J., Lee, J.K., Sung, C.G., OH, T.K. ve Kim, H.K., 2003. Nonionic Detergent-Induced Activation of an Esterase from *Bacillus megaregium* 20-1, Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 26, 233-229.
- 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 Pyrethroid Insecticides, Pesticide Biochemistry and Physiology, 23, 66-73.
- Karademir, A., Akgül, M. ve Tutus, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). K.S.Ü. Fen Mühendislik Dergisi, 5, 1, 61-71.
- Kashima, Y., Iijima, M., Okamoto, A., Koizumi, Y., Udaka, S. ve Yanagida, F., 1998. Purification and Characterization of Intracellular Esterases Related to Ethylacetate Formation in *Acetobacter pasteurianu*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 85, 584-588.
- Kim, S. ve Lee, S.B., 2004. Thermostable Esterase from a Thermoacidophilic Archaeon: Purification and Characterization for Enzymatic Resolution of a Chiral Compound, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 68, 2289-2298.

- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Faiz, O. ve Belduz, A.O., 2010. Cloning, Expression and Characterization of Highly Thermo- and pH- Stable Maltogenic Amylase from a Thermophilic Bacterium *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4, Process Biochemistry, 45, 821-828.
- Kongruang, S., Bothwell, K.M., Mcguire, J., Zhou, M. ve Haugland, R.P., 2002. Assaying the Activities of *Thermomonospora fusca* E5 and *Trichoderma reesei* CBHI Cellulase Bound to Polystyrene, Enzyme and Microbial Technology, 32, 539-545.
- Kontkanen, H., Tenkanen, M. ve Reinikainen, T., 2006. Purification and Characterisation of a Novel Steryl Esterase from *Melanocarpus albomyces*, Enzyme and Microbial Technology, 39, 265-273.
- Lambrechts, C. ve Galzy., P., 1995. Esterase Activities of *Brevibacterium sp.* R312 and *Brevibacterium linens* 62, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 59, 1464-1471.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. ve Pyun, Y., 1999. Isolation and Characterization of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiology Letters, 179, 393-400.
- Lee, S.G, Hong, S.P., Song, J.J., Kim, S.J., Kwak, M.S. ve Sung, M.H., 2006. Functional and Structural Characterization of Thermostable D-Amino Acid Aminotransferases from *Geobacillus spp.*, Applied and Environmental Microbiology, 72, 1588-1594.
- Lesuisse, E., Schanck, K. ve Colson., C., 1993. Purification and Preliminary Characterization of the Extracellular Lipase of *Bacillus subtilis* 168, an Extremely Basic pH- Tolerant Enzyme, European Journal of Biochemistry, 216, 155-160.
- Levisson, M., Oost, J.V. D. ve Kengen, S.W.M., 2007. Characterization and Structural Modeling of a New Type of Thermostable Esterase from *Thermotoga maritima*, FEBS Journal, 274, 2832-2842.
- Lin, S.F., Chiou, C.M., Yeh, C. ve Tsai, Y.C., 1996. Purification and Partial Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111, Applied Environmental Microbiology, 62, 1093-1095.
- Liu, S.Q., Holland, R. ve Crow, V.L., 2001. Purification and Properties of Intracellular Esterases from *Streptococcus thermophilus*, International Dairy Journal, 11, 27-35.
- Long., R.M., Satoh., H., Martin, B.M., Kimura, S., Gonzalez, F.J. ve Pohl, L.R., 1988. Rat Liver Carboxylesterase: cDNA Cloning, Sequencing, and Evidence for a Multigene Family, Biochemical and Biophysical Research Communications, 156, 866-873.

- 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*, Applied Microbiology and Biotechnology, 51, 249-254.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, Journal of Biological Chemistry, 193, 265-375.
- Markossian, S., Becker, P., Markl, H. ve Antranikian, G., 2000. Isolation and Characterization of Lipid-Degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an Ocelandic Hot Spring, Extremophiles, 4, 365-371.
- Meghji, K., Ward, O.P. ve Araujo, A., 1990. Production, Purification and Properties of Extracellular Carboxyl Esterases from *Bacillus subtilis* NRRL 365, Applied Environmental Microbiology, 56, 3735-3740.
- Monti, D., Ferrandi, E.E., Righi, M., Romano, D. ve Molinari, F., 2008. Purification and Characterization of the Enantioselective Esterase from *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553, Journal of Biotechnology, 133, 65-72.
- Nakagawa, A., Tsujita, T. ve Okuda, H., 1984. Purification and Some Properties of Intracellular Esterase from *Pseudomonas fluoresce*, Journal of Biochemistry, 95, 1047-1054.
- Nawani, N., Singh, R. ve Kaur, J., 2006. Immobilization and Stability Studies of a Lipase from Thermophilic *Bacillus sp*: The Effect of Process Parameters on Immobilization of Enzyme, Electronic Journal of Biotechnology, 9, 559-565.
- Niehaus, N., Bertoldo, C., Kahler, M. ve Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Application, Applied Microbiology and Biotechnology, 51, 711-729.
- Nishizawa, M., Gomi, H. ve Kishimoto, F., 1993. Purification and Some Properties of Carboxylesterase from *Arthrobacter globiformis*; Stereoselective Hydrolysis of Ethyl Chrysanthemate, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 57, 594-598.
- Okumura, S., Iwa, M. ve Tsujisaka, Y., 1983. Studies on Microbial Esterases 2. Properties and Substrate Specificities of Four Esterases from *Aspergillus niger* NRLL-337, Agricultural and Biological Chemistry, 47, 1869-1872.
- 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.
- Ollis, D.L., Shea, E., Cygler, M.B., Dijkstra, B. ve Frolow, F., 1992. The  $\alpha/\beta$ Hydrolase Fold, Protein Engineering, 5, 197-211.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol C.R., Nigam, P., Krieger, N. ve Soccol, U.T., 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology, Biotechnology and Applied Biochemistry, 29, 119-131.

- Pantazaki, A.A., Pritsa, A.A., ve Kyriadakis, D.A., 2002. Biotechnologically Relevant Enzymes from *Thermus thermophilus*, Applied Microbiology and Biotechnology, 58, 1-12.
- Pleiss, J. ve Fischer, M., 2002. The Lipase Engineering Database: a Navigation and Analysis Tool for Protein Families, Nucleic Acids Research, 31, 319-321.
- Quax, W.J. ve Broekhuizen, C.P., 1994. Development of a New *Bacillus* Carboxyl Esterase for Use in the Resolution of Chiral Drugs, Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 425-431.
- Quyên, D.T., Dao, T.T. ve Nguyen, S.L.T., 2007. A Novel Esterase from *Ralstonia sp.* M1: Gene Cloning, Sequencing, High-Level Expression and Characterization, Protein Expression and Purification, 51, 133-140.
- Rattray, F.P. ve Fox, P.F., 1997. Purification and Characterization of an Intracellular Esterase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174, International Dairy Journal, 7, 213-278.
- Rua, M.L., Diaz- Maurino, T., Fernández, V.M., Otero, C. ve Ballesteros, A. 1993. Purification and Characterization of Two Distinct Lipases from *Candida cylindracea*, Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 1156, 181-189.
- Sana, B., Ghosh, D., Saha, M. ve Mukherjee, J., 2007. Purification and Characterization of an Extremely Dimethylsulfoxide Tolerant Esterase from a Salt-Tolerant *Bacillus* species Isolated from the Marine Environment of the *Sundarbans*, Process Biochemistry, 42, 1571-1578.
- Schmid, R.D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, Angewandte Chemie-International Edition, 37, 1608-1633.
- Sellek, G.A. ve Chaudhuri, J.B., 1999, Biocatalysis in Organic Media Using Enzymes from Extremophiles, Enzyme and Microbial Technology, 25, 471-482.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C., 2001. Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases, Biotechnology Advances, 19, 627-662.
- Sherwani, M.K. ve Fixter, L.M., 1989. Multiple Forms of Carboxylesterase Activity in *Acinetobacter calcoaceticus*, FEMS Microbiology Letters, 58, 75-80.
- Shum, A.C. ve Markovetz, A.J., 1974. Purification and Properties of Undecyl Acetate Esterase from *Pseudomonas cepacia* Grown on 2-tridecanone, Journal of Bacteriology, 118, 880-889.
- Simone, G., Menchise, V., Manco, G., Mandrich, L., Sorrentino, N., Long, D., Rossi, M., ve Pedone, C., 2001. The Crystal Structure of a Hyper-Thermophilic Carboxylesterase from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, Journal of Molecular Biology, 314, 3, 507-518.

- Simone, G., Giuseppina., Menchise, V., Alterio, V., Mandrich, L., Rossi, M., Manco, G. ve Pedone, C., 2004. The Crystal Structure of An EST2 Mutant Unveils Structural Insights on the H Group of the Carboxylesterase/Lipase Family., Journal of Molecular Biology, 343, 137-146.
- Soliman, N.A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y.R., Schmid, R.D. ve Lange, S., 2007. Molecular Cloning and Characterization of Thermostable Esterase and Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN Isolated from Desert Soil in Egypt, Process Biochemistry, 42, 1090-1100.
- Sökmen, B.B., 2005. Kayısı (*Armeniaca vulgaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, Doktora Tezi, İ.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Stuer, W., Jaeger, K.E. ve Winkler, U.K., 1986. Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Bacteriology, 168, 1070-1074.
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. ve Tominaga, Y., 1992. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*, Journal of Biochemistry, 112, 598-603.
- Sugaira, M., Oikawa, T., Hirano, K. ve Inukai, T., 1997. Purification, Crystallisation and Properties of Triacylglycerol Lipase from *Pseudomonas fluorescens*, Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 488, 353-358.
- Tao, W., Lee, M.H., Wu, J., Kim, N.H. ve Lee, S.W., 2011. Isolation and Characterization of a Family VII Esterase Derived from Alluvial Soil Metagenomic Library, The Journal of Microbiology, 49, 178-185.
- Tekedar, H.C. ve Mohamed, G.Ş., 2011. Molecular Cloning, Over Expression and Characterization of Thermoalkalophilic Esterases Isolated from *Geobacillus sp.*, Extremophiles, 15, 203-211.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çesme, İzmir-Türkiye, 326p.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji. Lisansüstü Yaz Okulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın-Türkiye, 446p.
- Torres, S., Baigori, M.D., Pandey, A. ve Castro, G.R., 2008. Production and Purification of a Solvent-Resistant Esterase from *Bacillus licheniformis* S-86, Applied Biochemistry and Biotechnology, 151, 221-232.
- Torres, S., Baigori, M.D., Swathy, S.L., Pandey, A. ve Castro, G.R., 2009. Enzymatic Synthesis of Banana Flavour (Isoamyl Acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 Esterase, Food Research International, 42, 454-460.

- Vafiadi, C., Topakas, E., Biely, P. ve Christakopoulos, P., 2009. Purification, Characterization and Mass Spectrometric Sequencing of a Thermophilic Glucuronoyl Esterase from *Sporotrichum thermophile*, FEMS Microbiology Letters, 296, 178-184.
- van Beilen, J.B. ve Li, Z., 2002. Enzyme Technology: An Overview, Current Opinion in Biotechnology, 13, 338-344.
- Vaughan, M., Berger, E.J. ve Steinberg, D., 1964. Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activitic's in Adipose Tissue, Journal of Biological Chemistry, 229, 401-409.
- Verger, R., 1997. Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts, Trends in Biotechnology, 15, 32-38.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graile, J. ve Haas, M.J., 2000. Customizing Lipases for Biocatalysis: A Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 9, 113-148.
- Willis, W.M., Lencki, R.W. ve Marangoni, A.G., 1998. Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38, 639-674.
- Winkler, F.K., D'arcy, A. ve Hunziker, W., 1990. Structure of Human Pancreatic Lipase, Nature, 343, 771-774.
- Wu, S., Liu, B., ve Zhang, X., 2006. Characterization of a Recombinant Thermostable Xylanase from Deep-Sea Thermophilic *Geobacillus sp.* MT-1 in East Pacific, Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 1210-1216.
- Yu, Q.S., Holloway, H.W., Flippen-Anderson, L.L., Hoffman, B., Brossi, A. ve Greig, N. H., 2001. Methyk Analogues of the Experimental Alzheimer Drug Phenserine: Synthesis and Structure and Structure/Activity Relationships for Acetil- and Butyrylcholinesterase Inhibitory Action, Journal of Medicinal Chemistry, 44, 4062-4071.
- Yu, S., Zheng, B., Zhao, X. ve Feng, Y., 2010. Gene Cloning and Characterization of a Novel Thermophilic Esterase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 42, 288-295.
- Zhou, X., Scharf, M.E., Sarath, G., Meinke, L.J., Chandler, L.D. ve Siegfrieda, B.D., 2004. Partial Purification and Characterization of a Methyl-Parathion Resistance-Associated General Esterase in *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), Pesticide Biochemistry and Physiology, 78, 114-125.
- Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q. ve Shen, P., 2007. Purification and Characterization of a Thermostable Protease from a Newly Isolated *Geobacillus sp.* YMTC 1049, Enzyme and Microbial Technology, 40, 1592-1597.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1985 yılında İstanbul'un Bakırköy ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Tekirdağ'ın Çorlu ilçesinde tamamladı. 2003-2008 yılları arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fatih Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü'nde lisans eğitimi gördü. 2008 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başlamış olup, iyi derecede İngilizce bilmektedir.