

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

TERMOFİLİK *Geobacillus* sp. DF20 SUŞUNDAN ESTERAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra ÖZBEK

EYLÜL 2011

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK *Geobacillus* sp. DF20 SUŞUNDAN ESTERAZİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Esra ÖZBEK

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06.09.2011
Tezin Savunma Tarihi : 21.09.2011**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Trabzon 2011

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Esra ÖZBEK tarafından hazırlanan

**TERMOFİLİK *Geobacillus* sp. DF20 SUŞUNDAN ESTERAZİN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 06 /09 / 2011 gün ve 1420 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus* sp. DF20 Suşundan Esterazın 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 tanınmamda ve bu alanda çalışmayı seçmemde büyük katkıları olan; çalışmalarım süresince benden hiçbir yardımımı, desteğini esirgemeyen, çalışmalarım sırasında bana yön veren 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 ve Doktora öğrencisi Fulya ÖZ’e çok teşekkür ederim. Çalışmalarına olan değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Dr. Kadriye İNAN ‘a teşekkürü borç bilirim. Gerek özel hayatımda gerekse yüksek lisansım boyunca yanımda olup bana destek veren doğum günümü dahi paylaştığım biricik arkadaşım Leyla KONAK’a ve laboratuardaki çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Hepinizi iyi ki tanımışım.

Bugüne kadar bana olan güvenini, desteğini ve inancını hiç kaybetmeyen; her anımda yanımda olan babam Hasan ÖZBEK ve annem Taner ÖZBEK’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sizin gibi ailem olduğu için çok şanslıyım. Sizi çok seviyorum.

Esra ÖZBEK
Trabzon 2011

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Termofilik *Geobacillus* sp. DF20 Suşundan Esterazın 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. 06/09/2011

Esra ÖZBEK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
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 Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi	3
1.4. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları.....	5
1.5. Esteraz/Lipaz Katalizli Reaksiyonlar	8
1.6. Esteraz/Lipazların Bulunduğu Organizmalar	9
1.7. Termofiller ve Termofilik Bakteriler	10
1.8. Termofilik bir mikroorganizma olan <i>Geobacillus</i> 'lar	13
1.9. Esteraz/Lipazların Endüstrideki Yeri.....	14
1.10. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	18
2.1. Kullanılan Materyaller.....	18
2.1.1. Cihazlar	18
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	19
2.1.3. Kullanılan Mikroorganizma	19
2.1.4. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması	19
2.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	20
2.2. Deneysel Çalışmalar	23
2.2.1. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması.....	23
2.2.2. İyon Değişim Kromatografisi	24

2.2.3.	Enzim Aktivitesinin Tayini ve Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi	24
2.2.4.	Protein Tayini	25
2.2.5.	Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE).....	25
2.3.	Saf Enzimin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	27
2.3.1.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	27
2.3.2.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	27
2.3.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	27
2.3.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	28
2.3.5.	Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi.....	28
2.3.6.	Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	28
2.3.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	29
2.3.8.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerinin Etkisi	29
3.	BULGULAR.....	30
3.1.	Enzimin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması	30
3.2.	Enzimin Biyokimyasal Olarak Karakterizasyonu	31
3.2.1.	Enzimin Elektroforetik Olarak Karakterizasyonu	31
3.2.2.	Enzimin Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi	32
3.2.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	33
3.2.4.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	33
3.2.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi	34
3.2.6.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	35
3.2.7.	Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi	36
3.2.8.	Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....	37
3.2.9.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi	37
3.2.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerinin Etkisi.....	38
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	40
5.	ÖNERİLER.....	45
6.	KAYNAKLAR	47

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

TERMOFİLİK *Geobacillus* sp. DF20 SUŞUNDAN ESTERAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Esra ÖZBEK

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. Ahmet ÇOLAK
2011, 56 Sayfa

Bu çalışmada, Q-Sapharose iyon değişim kromatografisi ile termofilik *Geobacillus* sp. DF20 suşundan esteraz saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saflaştırılan enzim doğal PAGE' de çift bant halinde gözlemlendi ve substrat boyama ile bu bantların esteraz olduğu kanıtlandı. Enzim maksimum aktivitesini, substrat olarak *p*-nitrophenyl butirat (*p*NPB) kullanıldığında pH 7,0 ve 50 °C'de gösterdi. K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 0,120 mM ve 54,6 U/mg protein olarak hesaplandı. Enzimin +4°C, 50°C ve 70°C sıcaklıklarında yapılan kararlılık denemelerinde 5.saat sonunda 70°C'de aktivitesini tamamen kaybettiğini 72 saat sonunda ise +4°C'de aktivitenin %100 korunurken 50°C'deki aktivitenin azaldığı görülmüştür. pH kararlılık denemelerinde +4°C sıcaklıkta pH 5 ve pH 7'de yapılan denemelerde 5 günlük inkübasyonda enzim aktivitesinin düştüğü fakat pH 5'deki aktivitenin daha yüksek olduğu görülmüştür; optimum sıcaklık olan 50°C'de pH 5 ve pH 7'de yapılan kararlılık denemelerinde 2.gün sonunda pH 5'de hiç aktivite kalmazken pH 7'de ise aktivitenin 3.gün sonuna kadar %100 korunduğu gözlenmiştir. Bazı metal iyonu ve kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisi ayrıca incelenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler saflaştırılan esterazın bazı çözücüler varlığında aktivite göstermesi ve bunun yanında pH ve ısıl kararlı olması onu bazı endüstriyel uygulamalarda kullanışlı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Termofilik, Esteraz, *Geobacillus* sp. DF20, İyon Değişim Kromatografisi, Karakterizasyon, Saflaştırma

Master Thesis

SUMMARY

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ESTERASE FROM
A THERMOPHILIC BACTERIUM, *Geobacillus* sp. DF20

Esra ÖZBEK

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Ahmet ÇOLAK
2011, 56 Pages

The esterase from a thermophilic bacterium, *Geobacillus* sp. DF20, was purified using Q-Sepharose ion exchange column and characterized. Native polyacrilamid gel electrophoresis stained by *p*-naphtyl acetate and Fast Blue B indicated the presence of two active esterase. Enzyme show highest activity in presence of *p*-nitrophenyl butirate (*p*-NPB) as a substrate at pH 7.0 and 50 °C. The K_m and V_{max} values of the enzyme were calculated as 0.120 mM and 54.6 U/mg protein, respectively. The stability experiments of enzyme were carried out at +4°C, 50 °C and 70 °C. At the end of 5th hour, the enzyme lost the activity at 70° C. By the end of 72 hours, while the activity was protecting 100%, the activity had decreased at 50 °C.

When the enzyme incubated in buffer solution pH 5.0 and 7.0 at 4 °C, the enzyme retained its original activity 70% and 50% respectively after 3 days. At 50 °C, the enzyme activity lost its activity at pH 5.0 after 2 days incubation and conserved 95% its activity after 3 days. The effects of metal ions and some chemicals on the activity were also investigated.

These data support that the esterase from *Geobacillus* sp. DF20 has some advantages for industrial or biotechnological applications.

Key Words: Thermophilic, Esterase, *Geobacillus* sp. DF20, Ion Exchange Chromatography, Characterization, Purification.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Esteraz/lipazların katalizlediği genel reaksiyon	2
Şekil 2. Doğal α/β hidrolaz katlanması	4
Şekil 3. Farklı açılardan esteraz/lipazın üç-boyutlu yapısının şematik gösterimi.....	4
Şekil 4. <i>Mucor Miehei</i> lipazının kapalı(A) ve açık (B) formları	6
Şekil 5. Lipaz hidroliz mekanizması	7
Şekil 6. Lipaz esterifikasyon mekanizması	8
Şekil 7. Lipaz/esteraz katalizli hidroliz reaksiyonu.....	8
Şekil 8. Lipaz/Esteraz katalizli esterifikasyon mekanizması	9
Şekil 9. İyon değişim kromatografisi ile <i>Geobacillus sp.</i> DF20 esterazının saflaştırılması	30
Şekil 10. Doğal PAGE (A) Comassie boyama, (B) Substrat boyama	32
Şekil 11. pH'nin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	33
Şekil 12. Sıcaklığın aktivite üzerine etkisi.....	34
Şekil 13. Protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi	34
Şekil 14. Enzimin substrat doygunluk eğrisi.....	35
Şekil 15. <i>p</i> NPB varlığında enzimin Lineweaver-Burk eğrisi	35
Şekil 16. +4 °C'de enzimin pH kararlılık grafiği.....	36
Şekil 17. 50 °C 'de enzimin pH kararlılık grafiği.....	36
Şekil 18. <i>Geobacillus sp.</i> DF20 esterazının ısı kararlılık grafiği.....	37

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Lipaz ve esterazları birbirinden ayıran özellikler	3
Tablo 2. Termofillerin sınıflandırılması	11
Tablo 3. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları	15
Tablo 4. Ticari olarak elde edilen bazı mikrobiyal lipazlar	16
Tablo 5. Kullanılan cihazlar	18
Tablo 6. Kullanılan çözeltiler	20
Tablo 7. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri	26
Tablo 8. Esteraz enzimine ait saflaştırma tablosu	31
Tablo 9. Enzime ait substrat özgünlüğü tablosu	32
Tablo 10. Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi	38
Tablo 11. Bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi	39

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>p</i> NPB	: <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) amino metan
U	: Ünite
V_{maks}	: Maksimum hız
μ g	: Mikrogram

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, canlı hücrede meydana gelen metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran veya düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, doğal ortamları dışında uygun koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilirler ve bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi ve enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Sistemik adı triaçilgliserol açilhidrolaz olan lipazlar, triaçilgliserollerin hidrolizini katalizleyerek di- ve monoaçilgliserollere ve gliserole dönüştürme (Veeraragavan 1990), lipid-su ara yüzeyinde triaçilgliserolleri hidrolizleme (Mogensen vd, 2005), susuz ortamda ise ester bağlarını sentezleme (Kim vd., 1996) yeteneğine sahiptirler. Lipaz enziminin lipolitik aktivitesinin enzim-lipid ara yüzeyinde gerçekleştiği bilinmektedir (Saxena vd., 2003).

Hidroliz, çeşitli esterleşme reaksiyonları, lipid sentezleri (Hong vd., 1998), biyotransformasyon, organik sentezler gibi çeşitli reaksiyonları katalizleyen ve yağ kimyası, deterjanlar, mandıracılık gibi endüstri alanlarında çok fazla kullanılan lipaz enzimi; insan ve diğer memelilerin pankreas ve bağırsaklarından, mantarlardan (Sagiroglu vd., 1993), mikroorganizmalardan (mantar ve bakteriyel), hayvansal ve bitkisel kaynaklardan farklı metodlarla izole edilmiş ve saflaştırılmıştır (Basch-Bierne I. vd., 1984; Yadav , 1998).

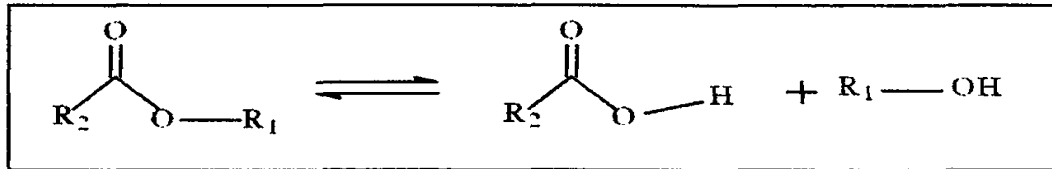
Lipazların biyoteknoloji alanında çok geniş uygulama alanları vardı (Rüa vd, 1993). Günlük endüstriyel üretimlerde, yağ işleminde, yüzey aktif maddelerin üretiminde, ilaç endüstrisinde, deterjan ve katkı maddelerinde ve çeşitli tekstil sentezlerinde ve organik kimyada çeşitli sentetik reaksiyonların biyokatalizörleri olarak lipazlar kullanılmaktadır (Mohamed, 2000).

Sıcaklık endüstride vazgeçilmez bir unsurdur. Biyokatalizör olarak enzimlerin en bilinen dezavantajı yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve dolayısıyla aktivitelerini kaybetmeleridir. Ancak bazı mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda büyüebilmesi; bu

sistemlerde mevcut enzim bileşenlerinin bu sıcaklarda bile yapılarını korumaları ve dolayısıyla aktivite gösterebilmelerinden kaynaklanır. Termofilik bakteriler bu türden, sıcaklığa dayanıklı enzimleri içeren ve endüstrilerde kullanılacak potansiyel enzim kaynaklarını oluştururlar. Bu enzimlerin termofilik mikroorganizmalardan elde edilmesi ve özelliklerinin araştırılması kuşkusuz bu enzimlerin kullanım alanlarını daha da genişletecektir (Janssen vd., 1994; Shao ve Weigel, 1995).

1.2. Esteraz/Lipazların Özellikleri ve Sınıflandırılması

Lipazlar, organik çözücü-su ara yüzünde, suda çözünmeyen uzun karbonlu yağ asitlerini içeren triaçilgliserollerin ester bağlarının hidrolizini katalizlerken, esterazlar ise sulu ortamda ester bağlarının hidrolizini katalizleyip organik çözücü ortamında da bu bağların oluşumunu sağlamaktadırlar (Şekil 1). Bu, lipazları esterazlardan ayıran bir özelliktir. Lipazlarda görülen bu organik ara yüzeydeki aktivite ara yüzey aktivasyonudur ve bazı durumlarda lipazlar suda çözünen esterlere karşı da aktivite gösterebilmektedirler (Desnuelle, 1972; Schmid ve Verger, 1998).



Şekil 1. Esteraz/lipazların katalizlediği genel reaksiyon

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). Dolayısıyla lipazlar maksimum aktiviteye ulaşmak için minimum substrat konsantrasyonuna ihtiyaç duyarken esterazlar klasik Michaelis-Menten kinetiğine uyarlar.

Esteraz ve lipazlar amino asit sıralarına, katalizledikleri ester bağlarının türüne ve substrat tercihlerine göre sınıflara ayrılırlar. Bunlar:

1- Amino grup asit dizisi benzerliğine göre 3'e ayrılır.(Hemila vd.,1994); kolinesteraz ve mantar kökenli lipazları içeren grup C, lipoprotein ve bakteriyel lipazları

içeren grup L ve hormona duyarlı lipazlar olarak adlandırılan ilk olarak Vaughen ve arkadaşları tarafından keşfedilen Grup H 'dır. Grup H ve HSL benzer sekansa ait proteinler içerir (Vaughan vd.,1964; Manco vd.,1997).

2- Hidrolizledikleri ester bağlarına bağlı olarak esterazlar birçok alt birime ayrılır; karboksil ester hidrolazlar (E.C 3.1.1.x), tiyoesterazlar (EC 3.1.2.x), fosforik monoester hidrolazlar (EC 3.1.3.x), fosfodiester hidrolazlar (EC 3.1.6.x), difosforik monoesteraz (EC 3.1.7.x) ve fosforik triester hidrolazlar (EC 3.1.8.x). Bu enzimler insan, hayvan ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Schmid vd., 1998). Bakteriler tarafından üretilen karboksil ester hidrolazların (EC 3.1,1.x) iki önemli sınıfı mevcuttur. Bunlar: uzun zincirli suda çözünmeyen ($C \geq 12$) açığliseritleri hidrolizleyen lipazlar (EC 3.1.1.3) ve kısa zincirli karboksilik asit esterlerini ($C \leq 12$) hidrolizleyen karboksili esterazlardır (EC 3.1.1.1). Her iki enzimin üç boyutlu yapısı karakteristik α/β -hidrolazların katlanması ile oluşur (Eggert vd., 2002).

3- Substrat tercihlerine göre esterazlar; asetil esterazlar, aril esterazlar, karboksil esterazlar ve kolin esterazlardır (Çakır ve Yamanel, 2005).

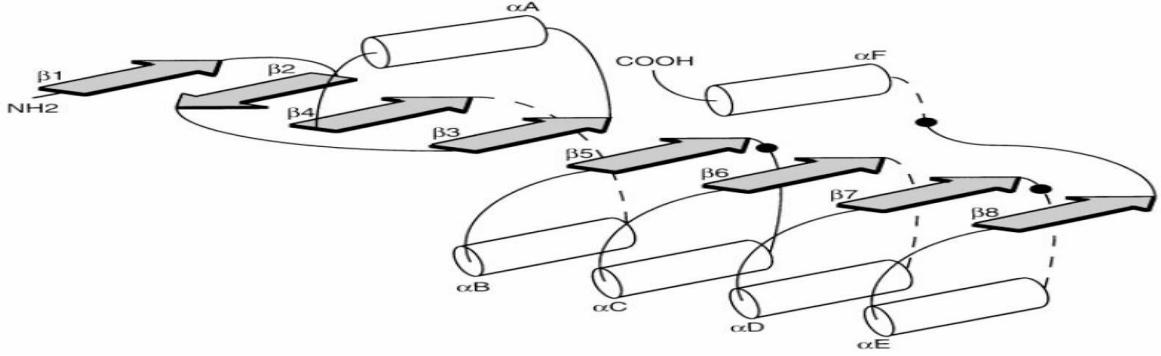
Tablo 1. Lipaz ve esterazları birbirinden ayıran özellikler

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

1.3. Esteraz /Lipazların Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

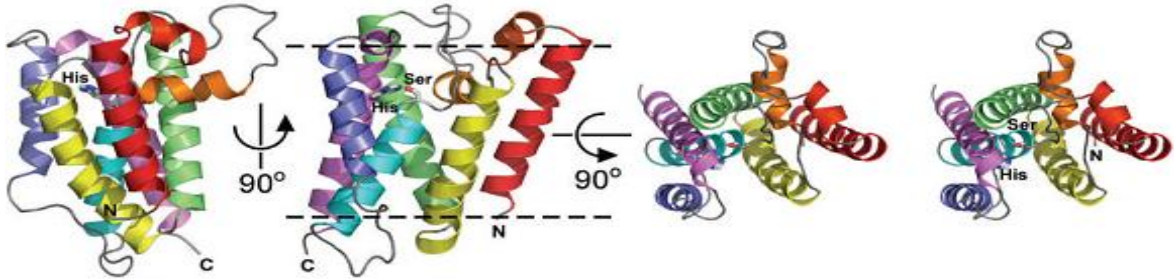
Esteraz ve lipazların molekül ağırlıkları 19-60 kDa arasında değişiklik gösterebilir (Bano vd., 2003) ve 3 boyutlu yapıları α -sarmal ve β -katlanmış yapılardan oluşmuş olup, bu enzimler karakteristik α/β hidrolaz ailesinin birer üyesidir (Ollis vd., 1992). α/β -hidrolaz enzim ailesi ilk olarak Ollis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

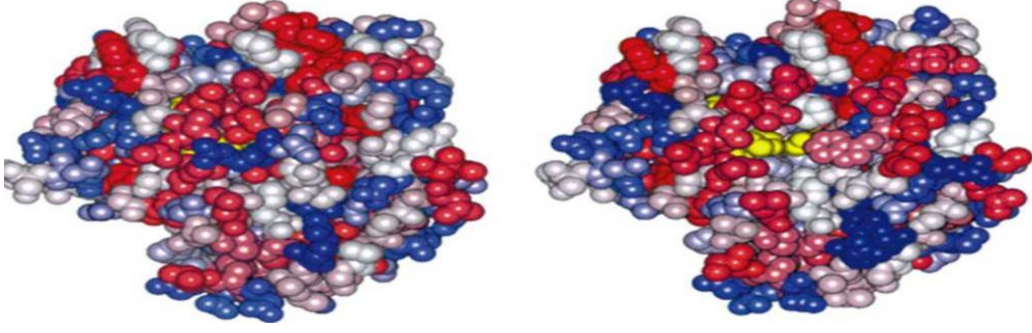
Katalitik mekanizma, bütün enzimlerde korunmuş olan Ser-His-Asp(Glu) katalitik üçlüsü tarafından gerçekleştirilir. Aktif bölgedeki serin amino asidi tüm enzimlerde korunmuş olan Gly-X-Ser-X-Gly yapısında yer almaktadır (Ollis vd., 1992). Şekil 3, bir esteraz/lipazın üç boyutlu yapısını göstermektedir.



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

1.4. Esteraz/Lipaz Reaksiyon Mekanizması

Lipazlar oldukça karmaşık katalitik mekanizmalara sahiptirler. Sulu homojen çözeltilerde lipazlar; aktif bölgedeki katalitik üçlünün hidrofobik bir kapak tarafından kapatıldığı kapalı (aktif olmayan) form ve kapağın açıldığı (açık) form olmak üzere iki konformasyonel durum arasında dengededir (Van Tilbeurg vd., 1992; Van Tilbeurg vd., 1993; Derewenda vd., 1994; Derewenda vd., 1992) (Şekil 4). Lipid varlığında aktif bölgedeki kapak açılarak yüzeyler arası aktivasyonun gerçekleşmesi sağlanır. Yüzeyler arası aktivasyon göstermeyen lipazlarda kapağın olmadığı ya da kapak-domaininde delesyon bulunduğu gözlemlenmiştir. Buna rağmen *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* B ve *Burkholderia glumae* lipazlarının kapak yapısına sahip olmalarına karşın, yüzeylerarası aktivasyon göstermezler. Sulu ortamda lipazlar için kapalı form baskın konformasyondur ve aktif bölge, kapak yapısını oluşturan bir ya da daha fazla düğüm tarafından çözücüden korunmuştur. Kapağın dış parçası hidrofiliktir. Bu konformasyonun kararlılığının sebebi elektrostatik etkileşimlerdir. Bir su-yağ emülsiyonunda kapağın açılması, substratların aktif bölgeye girişine izin verir (açık konformasyon). Böylece 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 oksianyon boşluk oluşmaktadır. Substrata yapılacak olan nükleofilik saldırı sırasında oluşan negatif yüklerin kararlılığını sağlayan elektrofilik çevrenin sağlanması bu boşluk sayesinde gerçekleşir (Jaeger ve Reetz, 1998).



Şekil 4. *Mucor miehei* lipazının kapalı (A) ve açık (B) formlarının yapısı. Sarı alanlar katalitik üçlüyü temsil etmektedir. "Kapak" yapısının açılması ile (B) katalitik bölgeye (sarı) erişilebilmektedir (Schmid ve Verger, 1998).

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 reaksiyonları da katalizlemektedir (Balcao vd., 1996; Villeneuve vd., 2000).

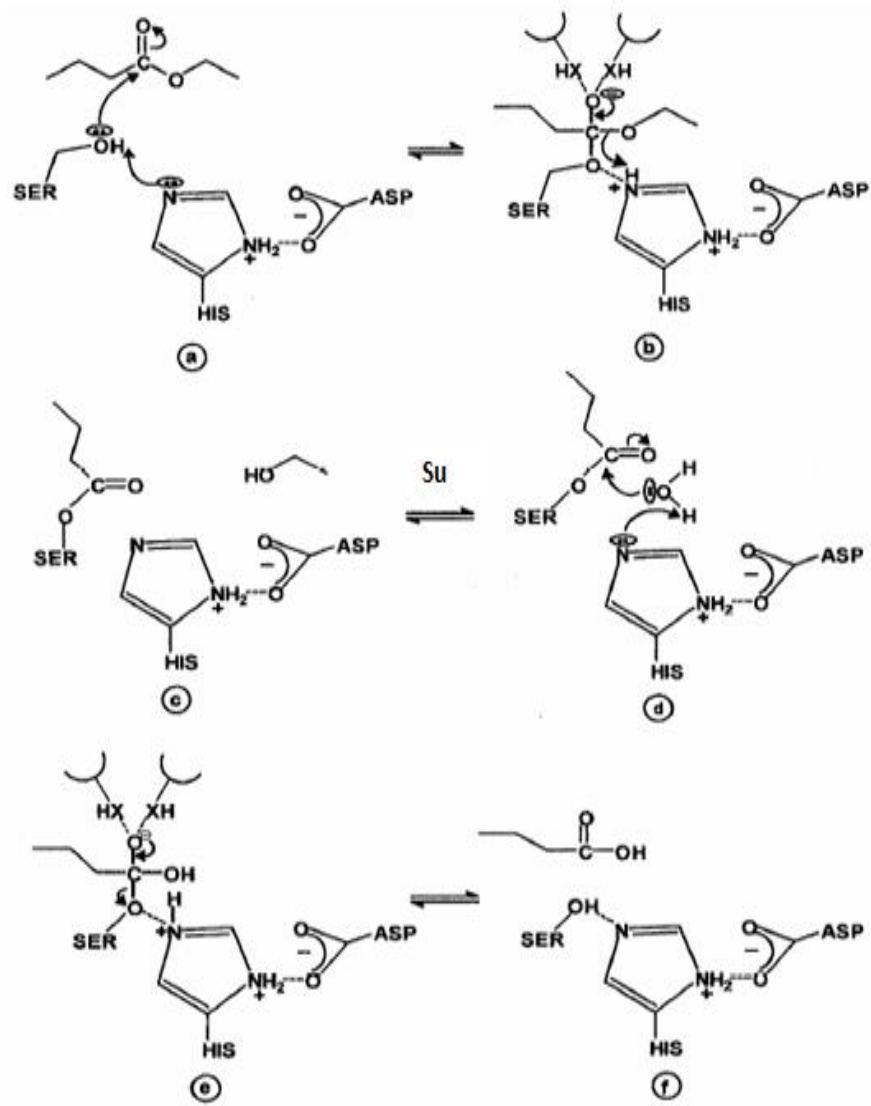
Hidrolaz sınıfına ait olan karboksil esterazlar (gerçek esterazlar EC 3.1.1.1.), suda çözünen substratların ester bağlarının oluşumunu ya da hidrolizini katalizlerler. α/β -hidrolaz enzim ailesi, esterazların serin hidrolaz mekanizmasını kullanırlar ve serin proteazların mekanizmasına benzerdir. Bu mekanizma dört adımdan oluşur (Şekil 5ve 6) (Bornscheuer vs., 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.

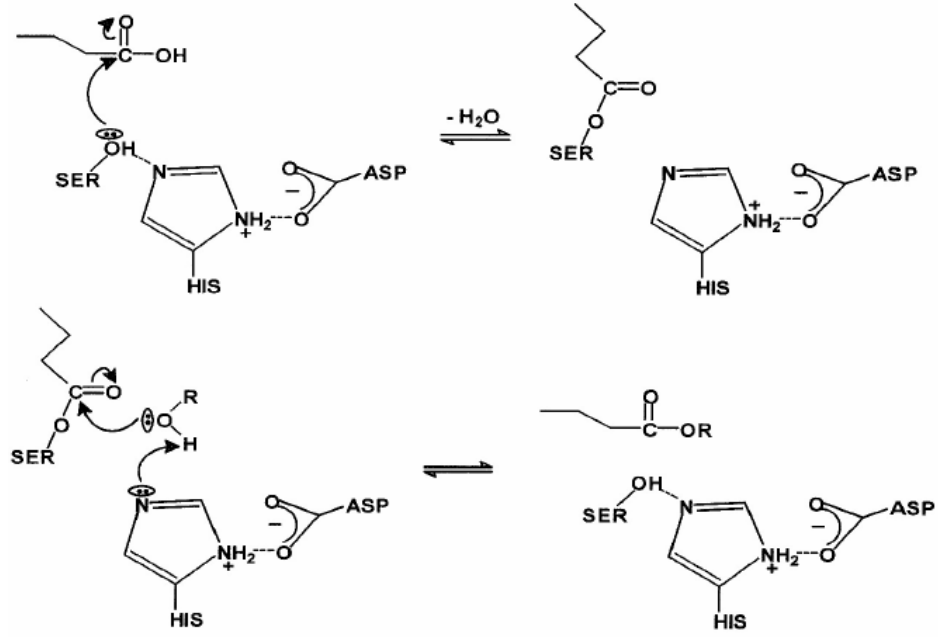
2- İkinci adımda alkol salınır ve açıl-enzim kompleksi oluşur.

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).



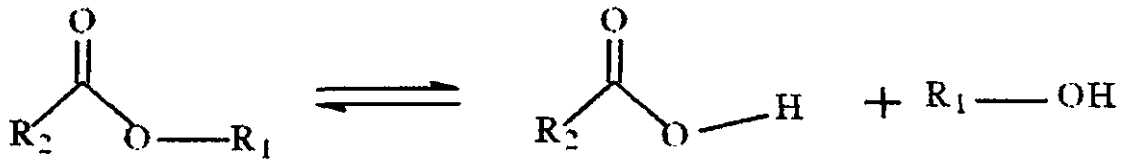
Şekil 5. Lipaz hidroliz mekanizması (Akkuş, 2006).



Şekil 6. Lipaz esterifikasyon mekanizması (Akkuş, 2006).

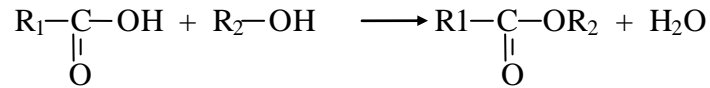
1.5. Esteraz/Lipaz Katalizli Reaksiyonlar

Esterazlar (EC 3.1.1.1 ve EC 3.1.1.2) sulu çözeltilerde sadece kısa yağ asit zincirlerinden oluşan trigliseritleri hidroliz edebilir. Lipazlar, (EC 3.1.1.3 triaçilgliserol hidrolazlar) emülsiyonlarda lipid-yağ ara yüzeylerinde serbest yağ asitleri ve gliserolleri serbest bırakmak için trigliseritlerde karboksil ester bağlarının hidrolizini katalizler ve uzun yağ asit zincirlerinden oluşan trigliseritler gibi suda çözünmez substratları tercih ederler (Jaeger ve Reetz, 1998)



Şekil 7. Lipaz/esteraz katalizli hidroliz reaksiyonu

Az miktarda su içeren ortamlarda esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları hem esterazlar (EC 3.1.1.1) hem de lipazlar (EC 3.1.1.3) tarafından katalizlenir (Kawamoto vd., 1987). Bu reaksiyonlar; ilaç endüstrisinde önemli kimyasalların sentezinde kullanılan kiral maddeleri hazırlamada, rasemik karışımları çözmede, gıda endüstrisi için tat verici esterlerin sentezinde, katı ve sıvı yağ endüstrisinde ise trigliseritlerin fizikokimyasal özelliklerinin modifikasyonunda kullanılır.



Şekil 8. Lipaz/Esteraz katalizli esterifikasyon mekanizması

Özellikle C₂ - C₈ karbona sahip karbona yağ asitlerinin etil esterleri çığ sütte ve peynirde bulunur. Yağ asitlerinin ve alkollerin esterazlar ile esterifikasyonu peynirde ester oluşum mekanizması ile ilgilidir (Bills vd., 1965; Morgen vd., 1967).

Alkoliz üzerinden ester sentezi, şekerleri, yağ asidi türevlerini ve gliseritlerin yağ açıl gruplarını alkollere dönüştürmekte ve sulu biyolojik sistemlerde yaygın olarak görülmektedir.

1.6. 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 faktörler 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, insan ve hayvanların sindirim sistemi ve dokuları, bitkilerin tohum ve meyveleri, bitki yağı işleme fabrikaları ve sıcak su kaplıcaları şeklinde sıralanabilir. Lipaz üreten mikroorganizmalar; bakteriler, mantarlar, mayalar ve aktinomisitler olarak sınıflandırılmaktadır (Sharma vd., 2001).

1.7. Termofiller ve Termofilik Bakteriler

Bakteriyolojinin hemen hemen ilk dönemlerinde, termofilik bakterilerin varlığı bilinmiyordu. *Thermus aquaticus* ilk karakterize edilen hiper termofilik bakteridir (Voytek vd., 2001). Termofilik bakteriler ilk kez 1879 yılında Miquel tarafından 72 °C 'de çoğalabilen bakteriler olarak izole edildi. Miquel bu bakterileri nehir, çamur, toprak, toz ve kanalizasyon numunelerinden elde etmiştir (Joseph Jenkins,1999). Günümüzde ekstremofilik mikroorganizmalar volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3,0 veya pH 10,0-12,0) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarındaki (%5-30) yaşama adapte oldukları bilinmektedir (Gül Güven., 2007). Sıcaklık çevremizdeki en önemli değişkenlerden biridir. Yaşayan organizmaların sınıflandırılması onların sıcaklıkla olan ilişkilerine dayalıdır. Bundan dolayı biyolojik sistematığın en temel elementlerinden biri olarak kabul edilirler. Mikroorganizmalar genel olarak psikrofil, mezofil ve termofil olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Kristjonsson ve Stetter, 1991). Termofilik organizmalar yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olup kendi aralarında ılımlı termofiller (45-65 °C) ve hipertermofiller (85 °C) şeklinde ayrılırlar (Tablo 2) (Demirjian vd., 2001).

Tablo 2. Termofillerin Sınıflandırılması

Mikroorganizma	Minimum °C	Optimum °C	Maksimum °C
Psikrofiller	-5-5	15-30	19-35
Mezofiller	10-15	30-45	35-47
Fakültatif Termofiller	37	45-55	70
Zorunlu Termofiller	40-45	55-75	60-80
Ekstrem Termofiller	60	75-80	85-115

Termofilik bakteri suşlarının optimum büyüebilme sıcaklıkları 55 °C ‘den 105 °C ‘nin üstüne kadar değiştiği bilinmektedir. Bu şekilde çok yüksek sıcaklıklarda yaşayan termofilik mikroorganizmalar aşırı termofiller veya çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadır ve bu organizmaların optimum büyüme sıcaklıkları 80 °C ‘nin üzerindedir. Termofilik bakteriler tabii olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda, çöplerde ve bazı belli başlı yerlerde bulunurlar (Çanakçı, 2003).

Termofilik mikroorganizmalar yüksek sıcaklıkta büyüebilme yeteneğine sahip tek hücreli canlılardır (Madigan ve Nariş, 1997). Gerçekte, yüksek sıcaklık, yaşam için gerekli birçok makromolekülün denatürasyonuna neden olmasından dolayı birçok mikroorganizma için tehlike oluşturur (Cowan, 1992). Termofillerin durumu ve orijini uzun süre tartışma konusu olmuştur. 1927 yılında, Arrhenius, termofiliklerin güneşten gelen radyasyon basıncı ile Venüs gezegeninden yeryüzüne geldiklerini ileri sürmüştür (Babich ve Stotzky, 1987). İlk izolasyonu yapılan termofilik organizma, *Sulfolobus acidocaldarius* olup, 75°C'de optimum gelişme göstermektedir (Huber vd., 1992). Bunun yanında ilk termofilik *Bacillus* ise, 1888 yılında Paris Seine nehrinden, 70°C'de Miquel tarafından izole edilmiştir. Miquel termofilik bakterileri topraktan, çöplerden, dışkı ve pisliklerden, kanalizasyon ve nehir çamurlarından izole etmiştir (Miquel, 1888).

Termofiller, aerobik, anaerobik veya fakültatif anaerobik olup, genellikle Gram(-) mikroorganizmalar olarak bilinirler. Hücre duvarında glikoprotein ve protein miktarı yüksek olduğundan Gram (-) sonuç vermektedir (Tolner vd., 1997).

Termofilik mikroorganizmalar yapısal ve moleküler olarak mezofilik mikroorganizmalara göre farklılık gösterirler. Termofillerin yüksek sıcaklığa adaptasyonunu; membran yağ bileşimleri, membran proteinlerinin yüksek termostabilitesi, transdüksiyon enzimlerinin yüksek devinim oranları ve enerji transferinde bağlanma iyonları olarak protonlar yerine sodyum iyonlarını kullanmaları sağlamaktadır (Tolner vd., 1997).

Termofilik canlıların DNA yapısına bakıldığında, yüksek sıcaklıktaki DNA'nın denatürasyonuna karşı, sitoplazmanın sahip olduğu iyon içeriği ve düşük su aktivitesiyle korunduğu düşünülmektedir (Dülger, 2003). Bununla birlikte birçok mikroorganizma DNA'sı negatif süper sarmal iken, termofiliklerin DNA'sının pozitif süper sarmal olduğu görülür. Bu özellik ve DNA'ya bağlanan histon ve benzeri proteinler, DNA'nın denatürasyonuna karşı direnç sağlar (Kristjansson, 1992).

Termofilik bakterilerin protein ve enzim yapıları da yüksek sıcaklığa dayanıklı özel katlanmalar yapmaktadır. Bu proteinler bazı kritik aminoasitlerce zengindir. 1996 yılında yapılan bir çalışmada, termal kararlılığı artıran en az 13 tane farklı fiziksel ve kimyasal faktörün varlığı belirlenmiştir. Bu faktörlerden önemli olanlar; tuz köprüleri, hidrojen bağları, kısa halkalar, halkalarda bulunan prolin miktarı fazlalığı ve glisin miktarının azlığı şeklindedir. Bu faktörler üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Termofilik özellik gösteren *Thermus aquaticus* ve *Thermococcus litoralis*'den elde edilen termofilik enzim DNA polimeraz olup, PCR reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalardan izole edilen enzim yüksek sıcaklığa dayanıklı olup, DNA çift zincirini birbirine bağlayan zayıf hidrojen bağlarını kırabilecek özelliğe sahiptir. Bu sayede DNA'nın tek zincirini kalıp olarak kullanarak polimerizasyon zincir reaksiyonunu tamamlar (Aguilar, 1996).

Termofilik enzimlerden bazıları son zamanlarda saflaştırılmış ve başarılı bir şekilde klonlanıp, mezofilik bakterilere aktarılmıştır. Bu enzimler: Amilazlar, Ksilenzazlar, Proteazlar, Lipazlar, Selülozlar olup gıda, kimya ve farmakoloji endüstrilerinde ve çevresel biyoteknolojide kullanılan enzimlerdir (Aguilar, 1996). Bu enzimlerden proteazlar özellikle deterjanlar, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentez ve atıklara muamelede kullanılmaktadır (Banerjee vd., 1999). Amilaz enzimi ise ticari olarak ilk kullanılan enzim olma özelliği taşımaktadır (Aira vd., 1983). Bu enzim kâğıt ve tekstil endüstrisinde,

nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmek, glikoz ve fruktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermantasyonunda kullanılmaktadır (Kıran vd., 2006).

Doğası gereği yüksek sıcaklıklarda kararlı ve aktif olan termofilik ve hipertermofilik enzimler mezofilik veya sakrofilik türlerden elde edilen enzimlere oranla çok büyük biyoteknolojik avantajlara sahiptirler:

1. Bu enzimler mezofilik bir konakçada ekspres edildiklerinde ısı muamelesi ile saflaştırılmaları çok kolaydır.
2. Çözücüler veya guanidinyum hidroklorür gibi, denatüre edici kimyasallara karşı oldukça dirençlidir.
3. Enzimatik reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi ile yüksek konsantrasyonda substrat kullanımı, daha düşük viskozite, daha az mikrobiyal kontaminasyon riski ve genellikle daha yüksek reaksiyon hızları elde edilebilmektedir (Vieille ve Zeikus, 2001)

Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonların ilgi çekici olmasının temelinde,

- a) Reaksiyon hızı artar
- b) Ortam viskozitesi düşer
- c) Substrat çözünürlüğü artar
- d) Kontaminasyon ihtimali düşüktür
- e) Termofilik ve hipertermofilik enzimler sıcaklığa tabii tutularak daha kolay saflaştırılabilirler gibi sebepler bulunur (Stetter, 1996, 1999).

Isıl kararlılıktan başka termofillerden elde edilen enzimlerin organik çözücü içinde denatürasyona karşı dayanıklılıkları onların sudaki ısıl kararlılıkları ile ilişkilidir (Owusu ve Cowan, 1989). Bu nedenle ısıl kararlı enzimler sadece sulu ortamda değil, organik ortamda da kullanılmak için cezp edicidir.

1.8. 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 sporlara

sahiptir. Koloni morfolojisi ve büyüklüğü değişkendir. Bu cinsin %G+C içeriği, %48, 2–58 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0} ve iso-C_{17:0}'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), α -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.

1.9. Esteraz/Lipazların Endüstrideki Yeri

Günümüzde bilinen birçok enzim vardır ve bunların yarısına yakını ticari olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal kökenli enzimlerin birçoğu endüstriyel olarak kullanılmaktadır. 1960'dan önceki yıllara baktığımızda yıllık enzim satışı sadece birkaç milyon dolarla sınırlı olduğu görülmektedir. Fakat günümüzdeki enzim pazarına bakıldığında pazar hacmi hızla büyümüş ve bu hacim yüzlerce milyon dolara kadar ulaşmıştır (Godfrey ve West, 1996; Wike, 1999).

Esterazlar, doğal materyallerin, tahıl atıklarının, plastikler ve diğer toksik kimyasallar gibi endüstriyel kirleticilerin bozunmasında önemli rol oynar. Esterazlar optikçe saf bileşiklerin, parfümler ve antioksidanların sentezinde de kullanılır (Panda ve Gowrishankar, 2005).

Lipaz ve esterazlar substrat spesifitesi, bölge spesifitesi ve kiral seçicilik gibi karakteristik benzerlikler içeren enzimlerdir (Jaeger vd., 1994; Schmid ve Verger, 1998). Yüksek lipoliz çeşitli peynirlerin üretiminde zorunlu olduğu için lipaz enziminin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Peynir yapımında kullanılan renninin kütesinde, proteolitik enzimler ve lipazlar mevcuttur. Lipazlar çikolata endüstrisinde, tereyağına aroma kazandırmada, kremalarda, karamellerde kullanılmaktadır. Aynı zamanda lipazlar margarinler, fırın ürünleri ve bitkisel ürünlerde, lipazlarla modifiye edilmiş tereyağ ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır. Lipazlar kozmetik, parfümeri ve deri sanayi gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998).

Ayrıca kirli suların temizlenmesinde, biyosüpfaktan olarak deterjan üretiminde, karbonhidrat ve aminoasit türevlerinin eldesinde ve hayati önem arz eden enantiyomerik olarak saf ilaçların hazırlanması gibi biyoteknolojik uygulamalarda da sıkça kullanılmaktadırlar (Jaeger ve Reetz, 1998; Arpigny ve Jaeger, 1999). Çeşitli endüstriyel kullanım amaçları için hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan bir çok lipaz saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve pek çok mikrobiyal lipaz klonlanmıştır (Schmidt, 1998; Choi vd., 2000; Rua vd.,1998). Lipazlar üzerinde yapılan çalışmaların %90'ı bazı avantajlarından dolayı mantar veya bakteri orijinlidir ve ticari olarak çeşitli özelliklere sahip lipazlar mevcuttur. Son zamanlarda endüstrinin ihtiyacından dolayı sıcaklığa dirençli lipazlar üzerinde çalışmalara başlanmıştır (Dharmstithi ve Luchai, 1999; Nawani ve Kaur, 2000; Kademi vd., 2000; Lee vd., 2001). Özellikle termofilik bakterilerde mevcut lipazların yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olması endüstride kullanımını arttırmıştır.

Mikrobiyal lipazların endüstride uygulamaları ve katalizledikleri işlemler, elde edilen mikroorganizmalar ve ticari firmalar Tablo 3 ve 4 de özetlenmektedir.

Tablo 3. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları (Vulfson, 1994).

Endüstri	Katalizlenen İşlem	Ürün ya da Uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Kirlerin uzaklaştırılması
Mandıra ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaşması, tereyağının modifikasyonu	Süt, yağ ve peynirde lezzet artırıcı bileşenlerin geliştirilmesi
Fmn ürünleri	Lezzet artırımı	Raf ömrünün uzatılması
Meşrubatlar	Atoma artırımı	Meşrubat
Sağlık besinleri	Transesterifikasyon	Sağlık besinleri
Et ve balık	Lezzet artırımı	Et ve balık ürünleri
Kimyasallar	Enantiyoseçicilik, sentez	Kiral yapı blokları
Kozmetik	Sentez	Emülsifiyer, nemlendirici
Kâğıt	Hidroliz	Kalitesi artırılmış kâğıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri

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

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

Esterazlar mandıra ürünlerinde, meyve sularında, bira, şarap ve çeşitli alkol üretiminde kullanılır. Düşük değerdeki yağları daha değerli yağlara dönüştürme işlemi için transesterifikasyon katalizörü olarak hem esterazlar hem de lipazlar kullanılır.

Kolesterol esterazlar ve poliüretnaz'lar ise insan yapımı kirleticiler olarak bilinen plastikler, poliüretanlar, poliesterler, polietilen glikol adipate vb. malzemeleri parçalamak için kullanılır (Jahangir vd., 2003).

1.10. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Enzimler, canlı hücrede meydana gelen metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran veya düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilirler ve bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir (Sökmen, 2005).

Enzim endüstrisi, modern biyoteknolojinin araçlarının kullanılmasıyla birçok üretim işlemini geliştirmek üzere önemli derecede gelişme kaydetmektedir. Daha az miktarda enerji, su ve hammadde tüketimi ile daha az atık ve çevresel kirlilik bu teknolojinin hedef yararları arasındadır (Yıldırım, 2009).

Termofiliklerin üzerinde yapılan çalışmalar, termofil enzim moleküllerinin sıcaklığa dirençli olduğunu göstermiş ve dirençli yeni proteinlerin bulunmasına olanak sağlamıştır. Bu proteinlerin yüksek sıcaklıklarda kararlılıklarını korumaları, aktif olmaları ve yüksek basınçlarda dahi termal kararlılıklarını koruyabilmeleri endüstriyel açıdan bu enzimleri cazip kılmıştır. Gıda, temizlik, ilaç ve tekstil endüstrisinde oldukça büyük bir pazara sahip olan bu enzimlerin kullanılması ile hem daha düşük maliyetlerde yüksek saflıkta ve bol miktarda ürün eldesi gerçekleşir hemde çevre kirliliğine sebep olan atık ürünlerin miktarı azalır.

Bu çalışmanın amacı, endüstriyel öneme sahip esteraz enziminin termofilik *Geobacillus* sp. DF20 suşundan izole edilip, saflaştırılması ve karakterize edilmesidir. Böylelikle endüstride kullanıma uygun ve daha üstün özelliklere sahip mikrobiyal kaynakların ve yeni enzimlerin ortaya çıkarılması sağlanacaktır. Karakterizasyon çalışmaları süresince, optimum sıcaklık ve pH, ısıl ve pH kararlılığı, aktiviteye metal iyonlarının ve çeşitli kimyasalların etkisi, substrat ve protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi gibi çeşitli araştırmalar 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 5’de verilmiştir.

Tablo 5. 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

Bovine 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'-Tetrametiletilediamin (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, merkaptoetanol, hidrojen klorür, etanol, tris, glisin, Na⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının klorür tuzları, metanol, aseton, bakto tripton, mangan sülfat monohidrat, sodyum karbonat, disodyum hidrojenfosfat dodeka hidrat ve bromofenol mavisi Merck A.G. (Darmstadt, Germany) firmasından, akrilamid, tris, Coomassie Brilliant Blue R-250 ve Amonyumpersulfat (APS) Fluka firmasından, maya ekstrağı Lab M firmasından ve asetonitril Carlo Erba Reagent firmasından temin edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada kullandığımız termofilik mikroorganizma (*Geobacillus* sp. DF 20) Biyoloji Bölümü araştırmacılarının (Prof.Dr. Ali Osman BELDÜZ ve araştırma grubu) kültür stoklarından temin edilmiştir. Çalışılan mikroorganizma adı geçen araştırma grubu tarafından Aydın iline bağlı Germencik - Ömerbeyli jeotermal sahasından izole edilmiş ve çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle sistematigi 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 Na₂HPO₄.12H₂O, 10 mL 0,2 M KH₂PO₄, 0,5 mL 0,01 M demir (III) sitrat pentahidrat ve 5 mL eser element çözeltisi yaklaşık 850 mL saf su ilave edilip çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'a ayarlanıp ardından çözeltinin hacmi saf su ile 1000 mL'ye

tamamlanarak 121 °C’de ve 1 atm basınç altında 20 dakika sterilizasyon işlemine maruz bırakıldı

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

Tablo 6. Kullanılan Çözeltiler

Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	Hazırlanışı
Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na_2CO_3)	1,0 g NaOH ve 10,0 g Na_2CO_3 saf su ile çözülüp hacmi 250 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’ de saklandı
Lowry B Çözeltisi (% 1 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ çözeltisi)	2,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ saf su ile çözülüp hacmi 250 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı
Lowry C Çözeltisi (% 2 Na-K tartarat çözeltisi)	3,0 g Na-K tartarat saf su ile çözülüp hacmi 150 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı
Lowry D Çözeltisi	1:1 oranında Lowry B ve 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 SDS Çözeltisi(w/v)	0,6 g NaOH ve 0,15 g SDS saf su ile çözülüp hacmi 150 mL’ye tamamlandı ve 4 °C’de saklandı.

Tablo 6 'nın devamı

Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	Hazırlanışı
Ayrırma 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
Yığıma 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)	2,0 g APS saf suda çözülüp hacmi 20 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 Mavisini (%0,1)	10,0 mg bromofenol mavisini 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 mavisini, 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

Tablo 6'nın devamı

Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	Hazırlanışı
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
Tampon Çözeltiler	Hazırlanışı
Glisin-HCl (50mM pH: 3,0)	1,9 g glisin bir miktar saf su ile çözülüp 1M HCl çözeltisi ile pH 'ı ayarlanıp hacmi saf suyla 500 mL'ye tamamlandı
Sodyum Asetat Tamponu (50 mM pH: 4,0- 5,0)	4,1 g sodyum asetat bir miktar suda çözülerek 1M asetik asit çözeltisi ile pH 'ı ayarlanıp 1L 'ye saf suyla tamamlandı
Fosfat Tamponu (50 mM pH: 6,0- 7,0)	8,7 g K_2HPO_4 'ün 1L suda çözülmesi ve 6,8 g KH_2PO_4 'ün 1L sudaki çözeltisiyle titre edilerek istenilen pH 'larda ayarlandı
Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 7,0)	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
Substrat Çözeltileri	Hazırlanışı
<i>p</i> -Nitrofenil Asetat Çözeltisi (10 mM stok)	1,8 mg <i>p</i> NPA'nın dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı
<i>p</i> -Nitrofenil Butirat Çözeltisi (10 mM stok)	1,78 μ L <i>p</i> NPB'nin hacmi asetonitril ile 1 mL'ye tamamlanarak hazırlandı
<i>p</i> -Nitrofenil Palmitat Çözeltisi (10 mM stok)	3,7 mg <i>p</i> NPP'nin asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı

Tablo 6'nın devamı

<i>p</i> -Nitrofenil Laurat Çözeltisi (10 mM stok)	3,2 mg <i>p</i> NPL'nin asetonitril ile çözülüp hacminin 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı
Diğer Çözeltiler	Hazırlanışı
0,2 M Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	7,16 g bileşik bir miktar saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı
0,2 M KH ₂ 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 µL alınarak 500 mL kadar mineral besiyerine aktarıldı. 55 °C'deki hava banyolu çalkalayıcıda bir gece büyütüldükten sonra kültür, 4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Toplanan hücreler, 8 mL 20 mM Tris-HCl (pH 7,0) tamponunda süspansiyon 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. 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). Kullanılan kolon dolgu malzemesi ve saflaştırma işlemindeki tüm çözeltiler vakum pompası kullanılarak degaz işlemine maruz bırakıldı ve dolgu malzemesi bir pastör pipeti yardımı ile dikkatlice kolona paketlenildi. Kolon, 20 mM dengeleme tamponunun absorbanı ile eluat absorbanı 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 7,0) tamponu geçirildi. Daha sonra 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 sağlanarak bu şekilde tuz konsantrasyonu dereceli olarak artırıldı. Kolondan çıkan eluatlar yaklaşık 3 mL olacak şekilde cam tüpler içerisinde biriktirilip eluatlardaki protein miktarı, 280 nm dalga boyunda absorban ölçümleri ile belirlendi. Ayrıca tüm eluatlarda 405 nm'de esteraz aktivitesine bakıldı. Elde edilen değerlerle absorban ve aktivite değişim grafiği çizildi. Aktivitenin yüksek olduğu tüplerden alınan örneklerle elektroforez yapılarak benzer profil gösterenler birleştirildi. Toplanan enzim eluatları Amicon Ultracel Membrane 50.000 MWCO Milipore kullanılarak konsantre edildi.

2.2.3. 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 tayini yapıldı. Bunun için substratların 10 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat: etanol: tampon (20 mM Tris-HCl, pH 7,0) karışımları hazırlandı. Bu karışımdan 1400 µL alınıp üzerine 100 µL saf enzim ilave edilerek 50 °C'de 20 dakika bekletildi. Bekleme süresi sonunda, tüpler, buz içine alınarak reaksiyon durduruldu ve 405 nm'de absorban okundu. 1 U enzim aktivitesi,

1 dakikada 1 μ mol *p*-nitrofenol oluşturan enzim miktarı, spesifik aktivite ise mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlandı.

2.2.4. 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 çözeltileri hazırlandı. Tayinin gerçekleştirilmesi için aşağıdaki işlemler yapıldı.

- Kalibrasyon grafiği çizmek için hazırlanan BSA çözeltilerinden (1 mg/mL) deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 μ L ilave edilerek BSA'nın son konsantrasyonu 20, 40, 60, 80 ve 100 μ g/mL olacak şekilde ayarlandı.
- Saf enzim eluatından 10 μ L başka bir deney tüpüne ilave edildi.
- Standartlara ve örneğe son hacimler 500 μ L olacak şekilde 0,1 N NaOH içerisinde hazırlanan %0,1 (w/v) SDS çözeltilerinden ilave edilip vortekslenildi.
- Taze hazırlanmış olan 1 mL Lowry E çözeltileri her bir tüpe ilave edilip vortekslenerek oda sıcaklığında 5–10 dakika bekletildi.
- Standartlara ve numuneye saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin Reaktif'i'nden 100 μ L ilave edildi ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi.
- 650 nm'de absorbanslar okundu. Çıkan sonuçlara göre kalibrasyon grafiği çizilerek protein konsantrasyonu hesaplandı.

2.2.5. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (PAGE)

Ham enzim özütündeki ve eluatlardaki esteraz enziminin varlığını ortaya koymak için doğal poliakrilamid jel elektrofözezi kullanıldı. Doğal elektrofözezi, sodyum dodesil sülfat (SDS) içermeyen ortamda ve 10x10 cm ebadındaki elektrofözezi jeli kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem için, %5'lik yığıma ve %10'luk ayırma jeli kullanıldı. Elektrofözezde kullanılan çözeltiler ve hacimleri Tablo 7' de verilmiştir.

Tablo 7. Doğal poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Yığma Jeli (%5, pH 6,8)	Ayırma Jeli (%10, pH 8,8)
Yığma 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 Akrilamid/Bisakrilamid	0,67 mL	3,3 mL
dd H ₂ 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 doldurulup doğal elektroforez yükleme boyası ile 1:1 oranında karıştırılan örnekler Hamilton şırınga ile kuyucuklara yüklendi. Tank, buz dolu bir kap içine yerleştirildi. Boya, yığma 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 boya uzaklaştırma çözeltisiyle 2–3 saat çalkalandı.

Substrat boyaması için ise jel, 15 dakika 50 °C'de 50 mL Tris tamponunda (50 mM, pH 7,0) inkübe edildi. Tampon ortamdan uzaklaştırılarak, jel, 2 mL 30 mM β -naftil asetat içeren 100 mL Tris tamponu (50 mM, pH 7,0) içine alındı ve 50 °C'de 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 konsantrasyonda hazırlanan Mcilvaine Glisin-HCl (pH 3,0), asetat (pH 4,0-5,0), fosfat (pH 6,0-7,0) ve Tris-HCl (pH 7,0-9,0) tamponları kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan karışımların 1400 µL' si ayrı ayrı 100 µL saf enzim ile 50 °C'de 20 dakika bekletildi. Tüpler buz içine alınarak reaksiyon durduruldu ve 405 nm 'de absorbanları okundu. Daha sonra pH- Bağlı aktivite (%) grafiği çizilerek *Geobacillus* sp. DF20 esterazının optimum pH'sı belirlendi.

2.3.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Aktivite üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla reaksiyon karışımları hazırlandı ve 10 °C'lik artışlarla birlikte 30–80 °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

Enzim aktivitesinin protein miktarına bağımlılığını incelemek için 10 mM 'lık stok *p*NPB çözeltisi ve Tris-HCl tamponu (50mM, pH 7,0) kullanılarak 1:4:95 (v/v/v) oranında substrat: etanol: tampon karışımı hazırlandı ve bu karışımdan alınan 1400 µL'lik kısımlara reaksiyon karışımında ayrı ayrı 0,5-50 µg/mL arasındaki değerlerde son konsantrasyonlarda protein içerecek şekilde seyreltilmiş olan 100 µL saf enzim çözeltilerinden ilave edildi ve reaksiyon karışımları 50 °C'de 20 dakika bekletildi. 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, fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) 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 Sodyum Asetat (pH 5,0) ve Tris-HCl (7,0) tamponları kullanıldı. Tampon çözeltiler ve saf enzim eluatı 1:1 oranında karıştırılıp karışımın pH'ı istenilen pH'a getirildi. Enzim-tampon karışımları 4 ve 50 °C'de ayrı ayrı 1, 2, 3, 4 ve 5 gün boyunca inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda, inkübasyon için seçilen tampon çözeltiler ile hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak, daha önceden belirlenen optimum substrat konsantrasyonu ve sıcaklıkta aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Daha sonra aynı şartlar altında hazırlanmış fakat inkübe edilmemiş enzim-tampon sistemleri kullanılarak tekrar aktivite tayinleri yapıldı ve elde edilen değerler %100 kabul edilerek inkübe edilen enzimin farklı pH'larda % kalan aktivitesi hesaplandı.

2.3.6. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacıyla, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7,0) içindeki saf enzim eluatı, 4, 50 ve 70 °C'de ayrı ayrı 1, 5, 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 incelenmek amacıyla; Na⁺, Li⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM stok çözeltileri hazırlanıp son konsantrasyonda 1 ve 10 mM metal iyonu içerecek şekilde uygun seyreltmelerle hazırlanan reaksiyon karışımları ile optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak alınıp metal iyonu ilavesi durumunda % kalan aktivite hesaplandı (Hess vd., 2008).

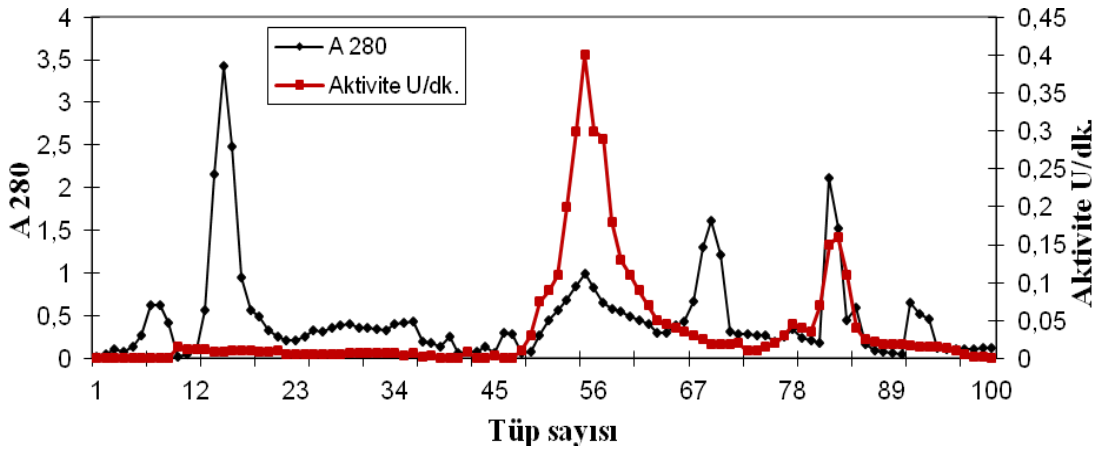
2.3.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi

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 aktivite hesaplandı (Nawani vd., 2006).

3. BULGULAR

3.1. Enziminin İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılması

Geobacillus sp. DF20 suşundan elde edilen enzimi saflaştırmak için iyon değişim kromatografisi kullanıldı 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 9’da verilmiştir.



Şekil 9. İyon değişim kromatografisi ile *Geobacillus* sp. DF20 esterazının saflaştırılması

1’den 100’ye kadar numaralandırılan fraksiyon tüplerine eluatlar, 4’er mL olacak şekilde toplandı. 405 nm’de spektrofotometrik olarak yapılan aktivite tayini sonucuna göre saf enzim içeren fraksiyonlar (54–57 numaralı tüpler) birleştirildi ve ortamdaki tuzlar ile düşük molekül ağırlıklı proteinler amikon (50 mMWCO) yardımıyla uzaklaştırıldı. Ardından oluşturulan saf enzim eluatında ve ham enzim özütünde Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bu tayin sonucunda saf enzim eluatında 0,15 mg/mL, ham enzim özütünde 6,9 mg/mL protein miktarı belirlendi. Ham enzim özütü ve saf enzim eluatı kullanılarak yapılan aktivite tayinleri sonucunda spesifik aktivite değerlerine göre enzimin

kaç kat saflaştırıldığı tespit edildi. Tablo 8’de görüldüğü gibi ham enzim özütünde enzimin spesifik aktivitesi 0.65 U/mg protein iken, saf enzimdeki spesifik aktivite 42,07 U/mg protein olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuçlara göre enzimin 64,5 kat saflaştırılmış olduğu belirlendi.

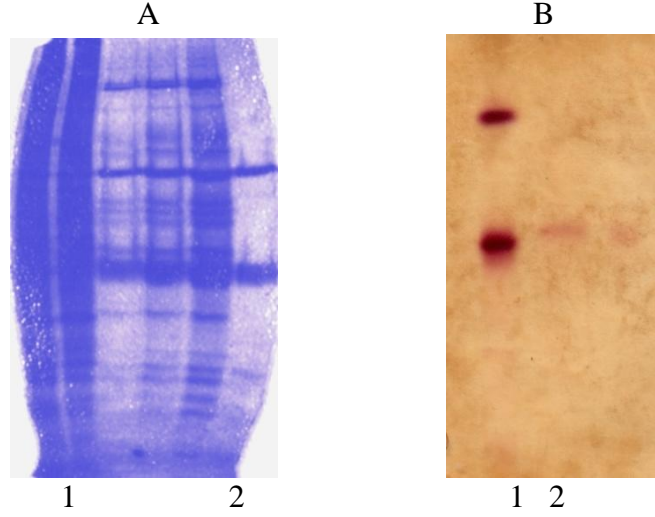
Tablo 8. Esteraz enzimine ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımı	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivite (U)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (U/mg Protein)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Enzim Özütü	6,2	6,9	0,450	27,9	0,65	100	1
Q Sepharose Fast Flow	3	0,15	0,631	18,9	42,07	67	64,5

3.2 Enzimin Biyokimyasal Olarak Karakterizasyonu

3.2.1. Enzimin 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 yürütülüp Comassie Brilliant Blue R–250 ile boyanması sonucunda (Şekil 10A) baskın olarak iki bant ve soluk bantlar gözlemlendi. Gözlenen bantların esteraz enzimine ait olup olmadığının belirlenmesi için Doğal elektroforez yöntemiyle elde edilen ikinci bir jel, esterazın substratlarından biri olan β -naftil asetat ve Fast Blue B tuzu ile muamele edildi ve saf enzim eluatında tek bir bant gözlemlendi (Şekil10B). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Comassie Brilliant Blue R–250 boyaması sonucu gözlenen iki baskın bant enzimin yüksek oranda saflaştırıldığını, substrat boyama ile elde edilen tek bant ise bu baskın bantlardan birinin esteraz enzimine ait olduğunu göstermektedir.



Şekil 10. 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

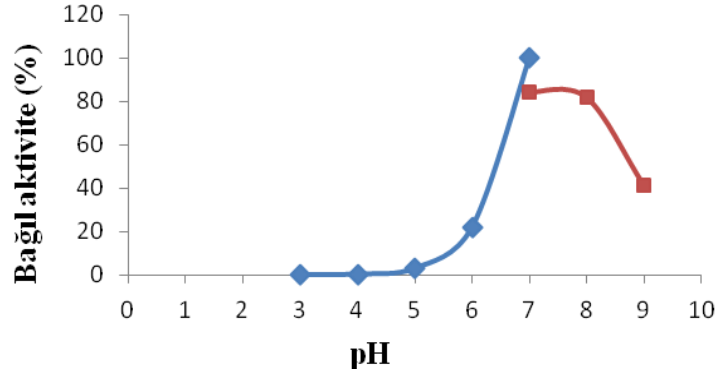
Enzim aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak, saf enzimin en yüksek aktiviteyi hangi substrat varlığında gösterdiği incelendi. Bunun için *p*-nitrofenil asetat (*p*NPA), *p*-nitrofenil butirat (*p*NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*NPL) ve *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) substratları ile aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen enzim eluatında, aktivite en fazla kısa zincirli *p*-nitrofenol esterleri olan *p*NPB varlığında gözlemlendi (Tablo 9). Bu aşamadan sonra yapılan tüm biyokimyasal karakterizasyon işlemlerinde substrat olarak *p*NPB kullanıldı.

Tablo 9. Enzime ait substrat özgünlüğü tablosu

Substratlar	Bağıl aktivite (%)
<i>p</i> NPB	100
<i>p</i> NPA	38
<i>p</i> NPL	9
<i>p</i> NPP	1

3.2.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'm Etkisi

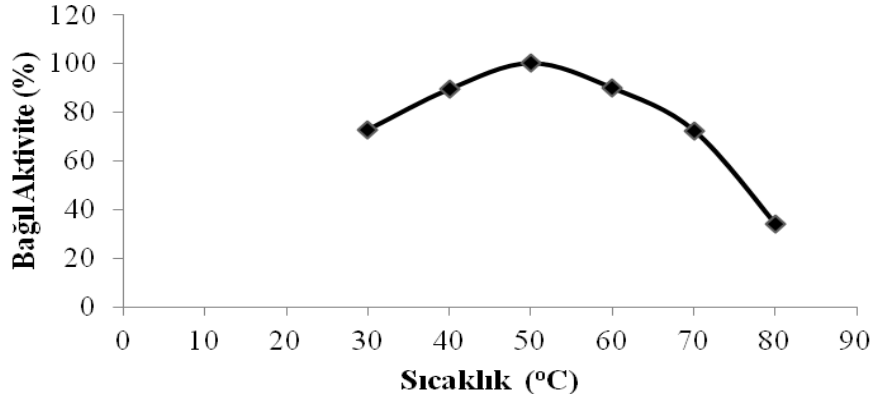
Enzimin etkin olduğu optimum pH değerini belirleyebilmek için *p*NPB substratı varlığında farklı pH (3,0–9,0) değerlerindeki tamponlar kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerler kullanılarak pH- % bağıl aktivite grafiği çizildi (Şekil 11) ve verilerden enzimin optimum pH değerinin 7,0 olduğu belirlendi. Grafik göz önünde alındığında, pH 8,0'da, enzim aktivitesini, %80'e yakını mevcutken, pH 7,0'da, enzim aktivitesinin %100 'ünü göstermiştir. pH 4,0 ve pH 5,0 ' de enzim aktivitesi hiç yokken pH 9,0'da belirgin şekilde düşüş gözlenmiştir.



Şekil 11. pH'm enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.2.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

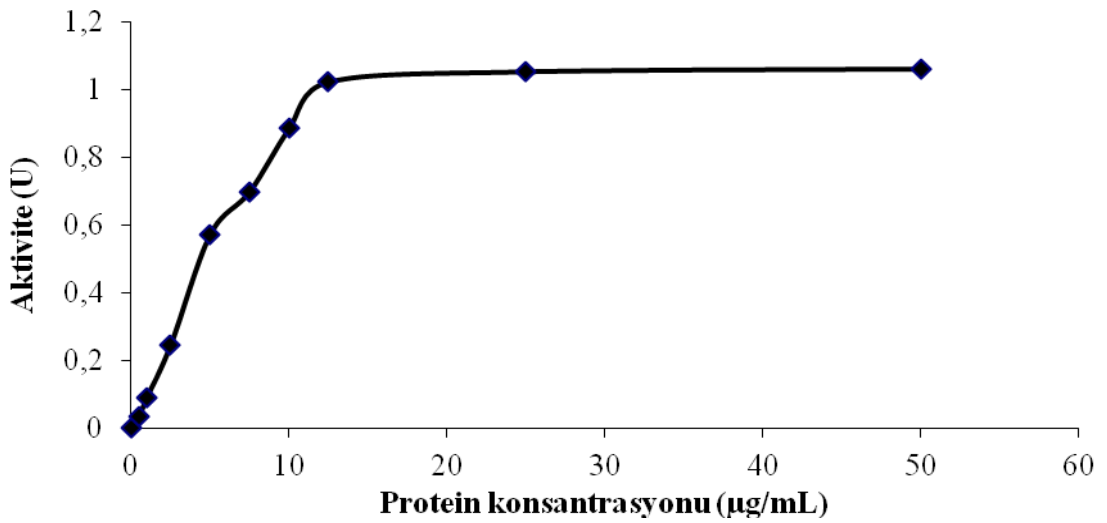
Geobacillus sp. DF20 esterazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek için 10 °C'lik artışlar sağlanarak 30–80 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen veriler, sıcaklık - % Bağıl aktivite grafiğine aktarıldı (Şekil 12). Çizilen grafikten saf enzimin en yüksek aktiviteyi 50 °C'de gösterdiği belirlendi. 30 °C'deki bağıl aktivitenin %70 olduğu ve sıcaklığın artışına bağlı olarak aktivitenin arttığı görülmektedir. 50 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda enzimin aktivitesini kaybetmeye başladığı, 70 °C'de enzimin aktivitesinin %30 'unu, 80 °C' de ise % 80 'ini kaybettiği görülmektedir.



Şekil 12. Sıcaklığın aktivite üzerine etkisi

3.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Konsantrasyonunun Etkisi

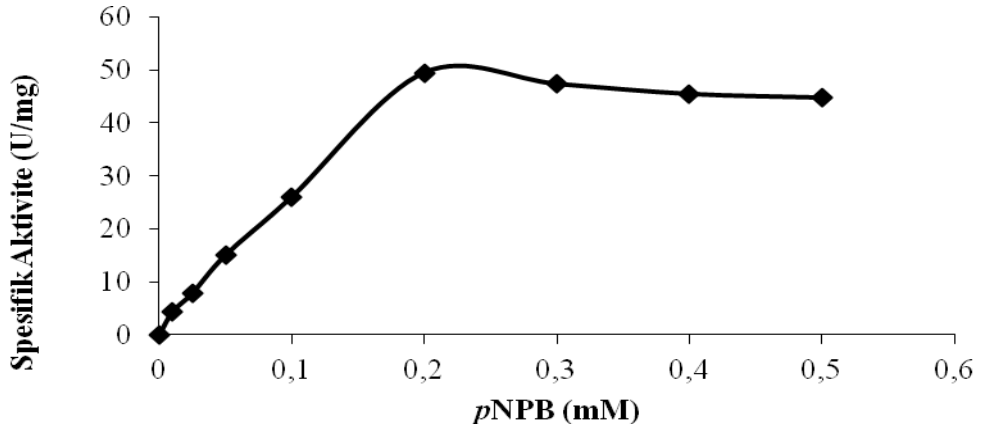
Enzim aktivitesi üzerine protein miktarının etkisini incelemek üzere substrat konsantrasyonu sabit tutularak farklı protein konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı. Reaksiyon karışımlarında, 0,5–50 $\mu\text{g/mL}$ son konsantrasyonda protein içerecek şekilde aktivite tayinleri yapıldı. Ölçülen aktivite değerlerine karşı protein konsantrasyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 13). Elde edilen hiperbolik eğriden, belirtilen şartlarda ve substrat konsantrasyonunda optimum enzim konsantrasyonu 12,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.



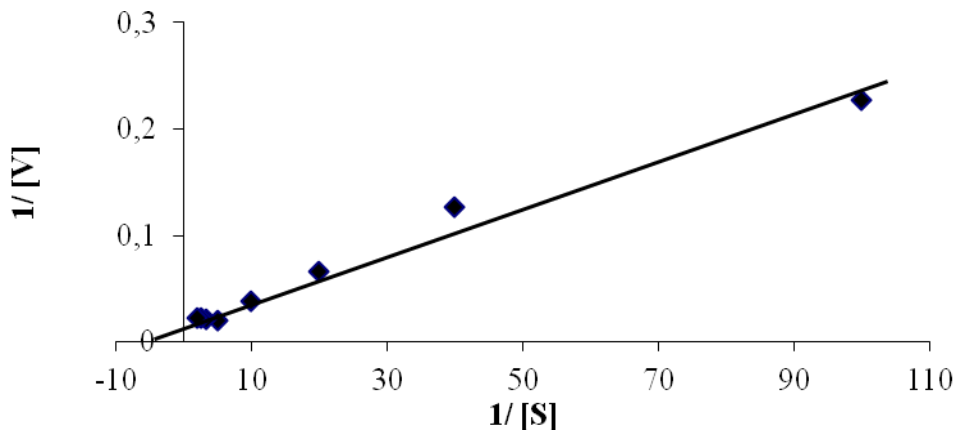
Şekil 13. Protein konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

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 14) ve Lineweaver-Burk (Şekil 15) grafiği çizilmiştir. Grafiklerden yola çıkarak, optimum substrat konsantrasyonu 200 μM , K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 0,120 mM ve 54,6 U/mg protein olarak tespit edildi.



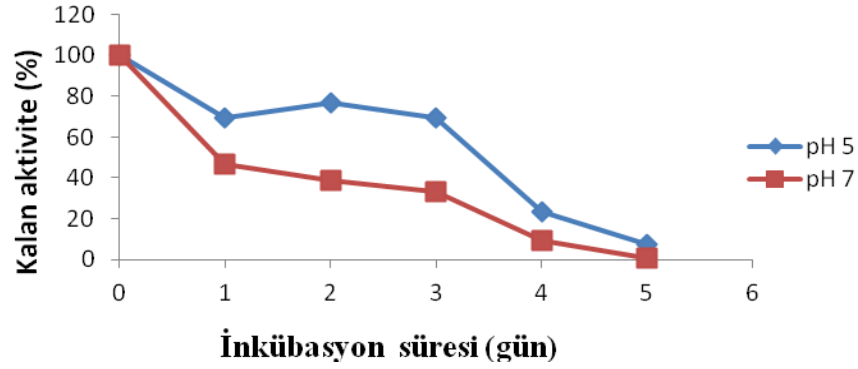
Şekil 14. Enzimin substrat doygunluk eğrisi



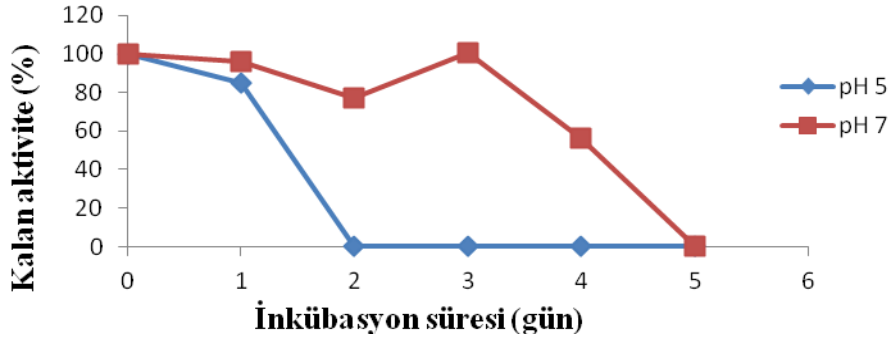
Şekil 15. pNPB substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi

3.2.7. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla, saf enzim eluatu, pH 5,0 ve 7,0'i tamponlarıyla karıştırılarak 4 ve 50 °C'de 1, 2, 3, 4 ve 5 gün boyunca bekletildikten sonra, önceden belirlenen optimum sıcaklık ve substrat konsantrasyonu ve kullanılan tamponlarla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen verilerden kalan aktiviteye karşı inkübasyon zamanı grafiği çizildi (Şekil 16 ve 17). Grafikten de anlaşılacağı üzere, enzimin pH 5,0 ve pH 7,0 tamponları içinde 4 °C'de bekletilmesiyle aktivitesinin 1. günden itibaren azaldığı fakat pH 5 'de pH 7 'den daha çok aktivitesini koruduğu görülmüştür. Ayrıca aynı tamponlarda 50 °C de yapılan çalışmalarda ise pH 5 'de aktivitenin 2. gün sonunda kaybolduğunu pH 7 'de ise 4. gün sonunda aktivitede azalma başladığı ve 5. günde sonlandığı gözlemlenmiştir.



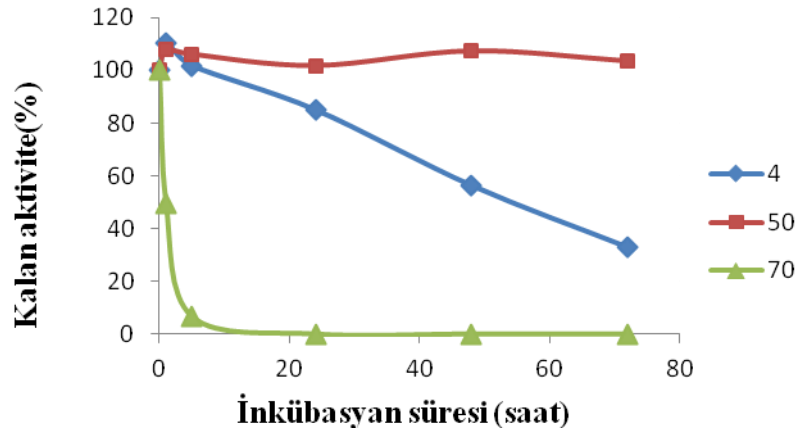
Şekil 16. +4 °C 'de enzimin pH kararlılık grafiği



Şekil 17. 50°C 'de enzimin pH kararlılık grafiği

3.2.8. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzimin ısı kararlılığını incelemek amacıyla yapılan çalışmalar, +4, 50 ve 70°C sıcaklıklarda; 1, 5, 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 18). Grafik incelendiğinde 70 °C'de 5 saatlik inkübasyon sonucunda enzimin aktivitesinin yaklaşık %90'ını kaybettiği görülmüştür. 24. saatin sonunda, 70 °C'deki aktivitenin tamamen kaybettiği gözlenirken, +4 °C'deki aktivitenin %70 korunduğu gözlenmiştir. 72 saatlik sürenin sonunda 50 °C'de aktivitenin tamamen ve +4 °C'de ise aktivitenin %30 oranında korunduğu görülmüştür.



Şekil 18. *Geobacillus* sp. DF20 esterazının ısı kararlılık grafiği

3.2.9. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Esteraz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacı ile Na⁺, Li⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık çözeltileri hazırlanıp reaksiyon karışımındaki metal iyonlarının son konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM olacak şekilde ayarlandı ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı. Metal iyonu içermeyen karışımın aktivitesi %100 olarak kabul edilip ve iyon varlığındaki aktivite % kalan aktivite olarak hesaplanarak tablo haline getirildi (Tablo 10). Tabloda görüldüğü gibi 1 mM nihai konsantrasyonda Mn²⁺, Co²⁺ ve Na⁺ varlığında esteraz aktivitesinde kayda değer bir değişim görülmedi. Cu²⁺ ve Ca²⁺ varlığında yaklaşık %32–35

arasında bir inhibisyon gözlemlendi. Metal iyon konsantrasyonu 10 mM olduğunda ise Na^+ , Li^+ ve Mg^{2+} varlığında enzim yaklaşık %90 aktif bulunmuştur. Mn^{2+} , Co^{2+} ve Ca^{2+} varlığında aktiviteni %70- 80 'i mevcut iken, Cu^{2+} kullanıldığında enzim aktivitesinin %50 azaldığı ve Zn^{2+} kullanıldığında enzim aktivitesinin tamamının kaybedildiği görülmüştür.

Tablo 10. 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^{2+}	93	77
Co^{2+}	97	77
Na^+	93	92
Li^+	86	93
Mg^{2+}	87	91
Ca^{2+}	68	73
Cu^{2+}	65	57
Zn^{2+}	81	1

3.2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla, 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 11). Metanol ve etanolun enzim aktivitesi üzerine %28 – 33 oranında inhibisyona sebep olduğu gözlemlendi. İzopropanol, enzim aktivitesini %44 oranında inhibe ederken, asetonitril, % 84 oranında inhibisyona neden olmuştur.

Tablo 11. Bazı organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Organik çözücü	Kalan aktivite (%) (Son konsantrasyon %10)
Yok	100
Etanol	77
Metanol	72
İzopropanol	56
Asetonitril	16

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Geobacillus* sp. DF20 suşundan esteraz enziminin varlığı tespit edilip, 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 karşılaştırıldı.

Geobacillus sp. DF20 suşundan ham enzim özütü hazırlandı. Bu işlem sonunda elde edilen enzim özütü Q-Sepharose Fast Flow kolonuna yüklendi ve böylece enzimin iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması gerçekleştirildi (Şekil 9). Ham enzim özütünde, enzimin spesifik aktivitesi 0,65 U/mg protein, iyon değişim kromatografisi sonucu saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi ise 42,07 U/mg protein olarak bulundu (Tablo 8). Bu sonuçlara göre enzim, 64,5 kat saflaştırıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda esteraz enziminin iyon değişim kromatografisi ile *thermoasidofilik arkeon*'dan Q-Sepharose jeli ile Kim ve Lee tarafından 12,5 kat (2004), bir *Bacillus* türünden, Sana ve arkadaşları tarafından 42,7 kat (2007), *Melanocarpus albomyces*' ten, Kontkanen ve arkadaşları tarafından 52 kat (2006), *Bacillus licheniformis* S-86'dan Torres ve arkadaşları tarafından 76,7 kat (2008), *Sparassis crispa* mantarından, Chandrasekaran ve arkadaşları 73 kat (2011) saflaştırıldığı bildirilmiştir.

İyon değişim kromatografisi ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminden sonra elde edilen saf enzim eluatu elektroforetik olarak analiz edildi. Hazırlanan %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edilen ham enzim özütünün substrat boyaması sonucunda (β -naftilasetat - Fast Blue B), esterolitik aktivitenin varlığını gösteren çift bant gözlemlendi. Bu sonuca göre ham enzim özütünde esterolitik aktiviteden sorumlu farklı proteinlerin varlığından veya izoenzimlerin mevcudiyetinden söz edilebilir. Saf enzim eluatu için elde edilen elektroforez jelinin ise Comassie brilliant blue R-250 boyamasında gözlenen baskın çift bant ve bu bantlar yanındaki soluk bantlardan sadece bir tanesinin esteraz olduğu, substrat boyaması sonucu elde edilen tek bant ile desteklenmektedir (Şekil 10A ve 10B). Literatürde esteraz izoenzimlerinin varlığı, Kashima ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Acetobacter pasteurianus*'ta (1998), *Streptococcus thermophilus* Liu ve arkadaşları (2001), *Cucurbita pepo* cv "Eskandrani" Fahmy ve

arkadaşları (2008), *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553 Monti ve arkadaşları (2008) gibi daha önce yapılan birçok çalışmada da ortaya konmuştur.

Geobacillus sp. DF20'ye ait ham enzim 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 edildi (Tablo 9). Bu sonuç *Geobacillus* sp. DF20'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, substrat olarak kullanıldı.

pH, enzimlerin aktivitelerinin ifadesinde belirleyici bir faktördür. Literatürde, esterazların genellikle nötral pH'ya yakın değerlerde maksimum aktivite gösterdikleri görülmüştür. *Geobacillus* sp. DF20'den saflaştırılan enzimin sergilediği esterolitik aktivitenin pH'ya bağımlılığı pH 3,0–9,0 aralığında incelendi. Enzimin asidik değerlerde çok düşük aktivite gösterdiği fakat pH 7,0 'da aktivitenin maksimum değerde olduğu ve bazik değerlerde ise aktivitemin optimum değerden daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 11). 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. (2009) *Bacillus licheniformis* S-86'dan ve Chandrasekaran vd.'nin (2011) *Sparassis crispa* mantarından elde ettikleri enzimlerin optimum pH değeri 8,0 olarak rapor etmiştir.

Geobacillus sp. DF20'den saflaştırılan esteraz enziminin aktivitesinin sıcaklıkla değişimi 30–80 °C aralığında incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50 °C olarak belirlendi (Şekil 12). Enzimin aktivitesi 40 °C ve 60 °C'de %90 oranında mevcutken, 30 °C ve 70 °C'de ise enzim aktivitesini %70'lerde olduğu gözlendi. 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. DF20 esterazının pH kararlılığı, saf enzimin farklı pH'lardaki tamponlar içinde 4 °C ve 50 °C'de 1, 2, 3, 4 ve 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmasıyla incelendi. Gerçekleştirilen bu işlemle, 4 °C 'de birinci günün sonunda aktivitenin düştüğü fakat pH 5,0 'de pH 7,0 'den daha fazla aktivitenin korunduğu gözlemlendi. 50 °C 'de ise pH 5,0 'de birinci günün sonunda aktivitede ciddi bir düşüş gözlenirken pH 7,0 'de ise aktivitenin 3. gün sonuna kadar korunduğu daha sonra düştüğü gözlemlendi (Şekil 16-17). 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 edildi. 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 bildirildi. Elde edilen bu veriler, *Geobacillus* sp. DF20'den elde edilen esterazın oldukça pH kararlı bir enzim olduğunu göstermektedir.

Enzimin ısı kararlılığını belirlemek amacıyla, saf enzim 72 saat boyunca 4 °C, 50 °C ve 70 °C sıcaklıklarda inkübe edildi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 5 saatlik inkübasyon sonunda 70 °C'de aktivitenin kaybolduğu, 4°C ve 50 °C 'de aktivitenin %104 olduğu görüldü. 24 saat sonunda ise, 4 °C'de aktivitenin %85'lere düştüğü ve 50°C 'de ise aktivitenin stabilizesini koruduğu, 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda ise 4 °C'de aktivitenin %33 civarına düştüğünü ve 50°C 'de ise aktivitenin hala stabil olduğu Şekil 18'ten gözlemlendi. *P. furiosus* esterazı, 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 bildirildi (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. DF20 esterazının 30–50 °C aralığında 72 saatlik inkübasyonu sonucunda ısı kararlılığının oldukça yüksek olduğu belirlendi.

Geobacillus sp. DF20 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 12,5 µg/mL'ye ulaşana kadar aktivitenin hızlı bir

şekilde arttığı ve bu değerin yukarıdaki konsantrasyonlarda aktivitenin protein miktarından bağımsız olduğu gözlemlendi (Şekil 13).

Esteraz enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla protein miktarı sabit tutularak, farklı substrat konsantrasyonlarında reaksiyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden V_{maks} ve K_m değerleri sırasıyla 54,6 U/mg protein ve 0,120 mM olarak bulundu (Şekil 14 ve 15). 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. DF20 esterazının bu yönüyle endüstriyel alanlarda kullanılabileceği açıktır.

Birçok 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. DF20'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 10). Son konsantrasyonu 1 mM olan metal iyonları karışımlarının aktivite üzerindeki etkileri incelendiğinde, Zn^{2+} iyonu varlığında, aktivite %81 oranında korunurken, diğer metal iyonları varlığında yaklaşık %80–90 oranında aktivite korundu. 10 mM'lik 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 gözlemlendi. 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. M1esterazı (Quyen vd., 2007) durumunda elde edildi. 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 kondu (Fu vd., 2011).

Geobacillus sp. DF20 'den saflaştırılan esterazın, aktivitesinin, bazı organik çözücüler varlığında, ne şekilde değiştiğini gözlemek amacıyla bir dizi reaksiyonlar gerçekleştirildi. Son konsantrasyonu %10 olarak hazırlanan metanol, etanol, izopropanol ve asetonitril içeren reaksiyon karışımları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, metanol ve etanol durumunda, aktivitenin yaklaşık %70'i korunurken, bu değer izopropanol için %56 ve asetonitril için %16 olarak tespit edildi (Tablo 11). *Thermoacidophilum* 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. DF20 suşundan elde edilen esterazın organik çözücülere karşı davranışının literatürle uyum içerisinde olduğu gözlemlendi.

Elde edilen bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, *Geobacillus* sp. DF20 suşundan saflaştırılan esterolitik aktiviteye sahip bir enzimin, bazı organik çözücülere ve metal iyonlarına karşı duyarlı, pH ve ısı kararlı olduğu gözlemlenmiş ve ayrıca K_m ve V_{maks} değerleri açısından literatürde bilinen esterazlardan bazı üstün özelliklere sahip olduğu ortaya kondu. Elde edilen veriler dikkate alındığında enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek bir potansiyele sahip olduğu açıkça görülmektedir.

5. ÖNERİLER

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları yüksek verim ve yüksek hızda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olduğu ve 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 enzimlerden olan lipaz ve esterazların, gıda, deri, deterjan ve ilaç sanayi gibi pek çok alanda kullanılmaya başlanması bu enzimler üzerine olan ilgiyi arttırmıştır. Bu durumda bu enzimlerle ya da bu enzimleri üreten organizmalarla yapılan çalışmaları 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. DF20 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. DF20 esterazı, endüstriyel uygulamalarda, özellikle tekrar kullanılabilirliğini sağlamak amacıyla immobilize edilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Aguilar, A., 1996. Ekstremophile Research in The European Union: from Fundamental Aspects to Industrial Expectations. FEMS Microbiol. Rev., 18, 89-92
- Aira, S.K. and Kılal, K. and İmanata, A., 1983. Cloning and Expression of Thermostable Alfa-Amylase Gene from *Bacillus stearotherophilus* in *Bacillus stearotherophilus* and *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1059–1065.
- 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.
- Babich, H. ve Stotzky, G., 1987. Advances in Applied Microbiology. 23, 55–117.
- 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.
- Banerje, U.C. and Sani, R.K. and Azmi, W. and Soni, R., 1999. Thermostable Alkaline-protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as A Laundry Detergent Additive. Process Biochemistry, 35, 213-219.
- 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, BBA-Molecular And Cell Biology of Lipids, 1632, 55-61.
- 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.
- 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.

- Bosc-Bierne, I., Rathelot, J., Perrot, C., Sarda, L., 1984, Studies on chicken pancreatic lipase and colipase, Biochimica et Biophysica Acta, 794, 65-71.
- Brock, T.D., 2001. Chapter I: The Origins of Research on Thermophiles. (Ed: Reysenbach, A. L., Voytek, M., Mancinelli, R. Kluwer Academic/Plenum Publishers).
- Cakır, Ş. ve Yamanel, Ş., 2005. Böceklerde İnsektisidlere Direnç, Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, 6, 1, 21-29.
- 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.
- Choi, A. R., Yoo, S. K. ve Kim, E. J., 2000. Cloning, Sequencing and Expression in *Escherichia coli* of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiol Lett. 8, 186–235.
- 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 α -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.
- Cowan, D.A., 1992. Trends in Biotechnology, Biotechnology of the Archaea. 10, 315–323.
- Çanakçı S, 2003; Gönen, Kestanbol ve Diyardin kaplıcalarından Termofilik bakterilerin izolasyon moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması, Doktora tezi, K.T.Ü, Fen bilimler enstitüsü, Trabzon. 3
- Demirjian, Dc., Moris-Vara, F. ve Sassidy, Cs. 2001. Curr Opin Chem Biol. Enzymes from Extremophiles. 5,144–51.
- Desnuelle, P., 1972. The Lipases: The Enzymes, 37. New York, Academic Press, 575.
- Dharmsthiti, S. ve Luchai, S., 1999. Production, Purification and Characterization of Thermophilic Lipase from *Bacillus* sp. THL027, FEMS Microbiol. Lett. 179, 241–246.
- 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.

- Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbol ve Diyadin Kaplıcalarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması. Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- 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, 78, 120-130
- 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.

- Godfrey, T. ve West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology, In: Godfrey, T., West, S., Industrial Enzymology 2nd ed., Stockton Pres., New York.
- Gül Güven, R.(2007). Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması ve Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmanii'nin p-galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Diyarbakır.
- Hemila, H., Koivula, T.T. ve Palva, I., 1994. Hormone-sensitive Lipase is Closely Related to Several Bacterial Proteins, and Distantly Related to Acetylcholinesterase and Lipoprotein Lipase: Identification of a Superfamily of Esterases and Lipases, Biochim. Biophys. Acta, 1210, 249–253.
- 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.
- Hong, M. C. ve Chang, M. C., 1998, Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1, Biotechnology Letters, 20, 1027-1029.
- 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.
- Huber, D. and Trincone, A. and Burggraf, S. and König, H. and Rachel, R. and Rockinger, I. and Fricke, H. and Stetter, K.O., 1992. Aquifex pyrophilus Gen. Nov. Sp. Nov, Represents A Novel Group of Marine Hyperthermophilic Hydrogen-oxidizing Bacteria. Syst Appl Microbiol, 15, 340–351.
- Jaeger K.E. ve Reetz, M.T., 1998. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology, Trends in Biotechnology, 16, 396-403.
- 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.
- Jahangir, R., Mc Closkey, C.B., Mc Clung W.G., Labow, R.S., Brash, J.L. ve Santerre, J.P., 2003. The Influence of Protein Adsorption and Surface Modifying Macromolecules on the Hydrolytic Degradation of a Poly (Ether- Urethane) by Cholesterol Esterase, Biomaterials, 24, 121-130.
- Janssen, P. H., Monk, C. R. ve Morgan, H. W., 1994. A Thermophilic Bacillus sp., and a Continuous Assay of its \triangleright -nftrophenylpalmitate Esterase Activity, FEMS Microbiol. Lett. 120, 195–200.

- Joseph J. 1999. The Humanure Handbook (Chapter 3. Thermophilic Microorganisms) 143 Forest Lane, Grove City, PA.
- Kademi, A., Ait- Abdelkader, N., Fakhreddine. L. ve Baratti, J. C, 2000. Purification and Characterization of a Thermostable Esterase From The Moderate Thermophilic Bacterium *Bacillus circulans*, Appl. Microbiol Biot, 54,173–179.
- 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 pasteurianus*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 85, 584-588.
- Kawamoto, T., Sonomoto. K. ve Tanaka, A., 1987. Esterification in Organic Solvents: Selection of Hydrolases and Effects of Reaction Conditions, Biocatalysis, 1, 137-145.
- Kazlauskas, R. J. ve Bornscheuer, U. T., 1998. Biotransformation with Lipase, Biotechnology vol. 8, VCH, New York.
- Kıran, Ö. ve Çömlekçiöğlü, U. ve Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Kullanım Alanları, Fen ve Mühendislik Dergisi,9, 17
- Kim, H. K., Park, Y.S., Kim, H., Oh, T. K., 1996, Partial interfacial activation of *Proteus vulgaris* lipase overexpressed in *Escherichia coli*, Biosciences Biotechnology and Biochemistry, 60, 1365-1367.
- 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.
- Kristjonsson, J. K. ve Stetter K.O. (1991). Thermophilic Bacteria (Ed: Kristjonsson J.K). CRC Pres, Inc. London, 1–13.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. ve Pyun, Y., 1999. Isolation and Characterization of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiology Letters, 179, 393-400.

- Lee, D., Kim, H., Lee, K., Kim, B., Choe, E., Lee, H., Kim, D. ve Pyun, Y., 2001. Purification and Characterization of Two Distinct Thermostable Lipases from the Gram- Positive Thermophilic Bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1, Enzyme Microb. Tech., 29, 363–371.
- 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.
- 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.
- 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.
- Madigan, M.T. and Marrs, B.L., 1997. Extremophiles. Sci Am, 276, 82–87
- Manco, G., Adinolfi, E., Pisani, F.M., Carratore, V. ve Rossi, M., 1997. Identification of an Esterase from *Bacillus acidocaldarius* with Sequence Similarity to a Hormone Sensitive Lipase Subfamily, Prot.Pept.Lett., 4,375-382.
- 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.
- Miquel, P., 1888. Monographie d'un Bacille Vvant Au-Dela de 70°C. Ann Micrographic, 1, 3.
- Mogensen, J. E., Sehgal, P. ve Otzen, D., 2005, Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents, Biochemistry, 44, 1719-1730.
- Mohamed, T. M., Mohamed, S. A. ve Fahmy, A. S., 2000, Distribution of lipases in the gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*, Bioresource Technology, 73, 227–234.

- 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. ve Kaur, J., 2000. Purification, Characterization and Thermostability of a Lipase from a Thermophilic sp. J33, Mol. Celi Biochem. 206, 91–6.
- 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.
New York.
- 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.
- Owusu, R. K. ve Cowan, D. A., 1989. Correlation Between Microbial Protein Thermostability and Resistance to Denaturation in Aqueous: Organic Solvent Two-Phase Systems, Enzyme Microb. Tech., 11, 568-574.
- Ollis, D.L., Shea, E., Cygler, M.B., Dijkstra, B. ve Frolow, F., 1992. The α/β Hydrolase Fold, Protein Engineering, 5, 197-211.
- Panda, T. ve Gowrishankar, B.S., 2005. Production and Applications of Esterases, Applied Microbiology and Biotechnology, 67, 160-169.
- Pleiss, J. ve Fischer, M., 2002. The Lipase Engineering Database: a Navigation and Analysis Tool for Protein Families, Nucleic Acids Research, 31, 319-321.,
- Rathi, P., Saxena, R K. ve Gupta, R, 2001. A Novel Alkaline Lipase from *Burkholderia cepacia* for Detergent Formulation, Process Biochemistry. 37, 187–192.
- Quyen, 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, Intetnational 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.
- Rua, M. L., Diaz-Maurino, T., Fernandez, V. M., Otero, C. ve Ballesteros, A., 1993, Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*, Biochimica et Biophysica Acta, 1156, 181-189.
- Rua, M. L., Schmidt- Dannert, C, WahL C, Sprauer A. ve Schmide, R. D., 1998. Thermo Alkalophilic Lipase of *Bacillus thermocatelunatus* Large-Scale Production, Purification and Properties: Aggregation Behaviours and Its effect on Activity, J. Biotechnol 56, 89-102.
- 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.
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B. ve Davidson, W. S., 2003, Purification strategies for microbial lipases, Journal of Microbiological Methods, 52, 1-18.
- Schmid, R.D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, Angewandte Chemie-International Edition, 37, 1608-1633.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C., 2001. Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases, Biotechnology Advances, 19, 627-662.
- 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.
- 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.
- Stuer, W., Jaeger, K.E. ve Winkler, U.K., 1986. Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Bacteriology, 168, 1070-1074.
- Stetter, K. O., 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments, FEBS Lett., 452, 22-25.
- Stetter, K. O., 1996. Hyperthermophilic Procaryotes, FEMS Microbiol. Rev. 18, 149–158.
- 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.

- Suguiira, 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.
- Taipa, M. A., Aires-Barros, M. R. and Cabral, J. M. S., 1992, Purification of lipases, Journal of Biotechnology, 26, 301-311.
- 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.
- Tolner, B., Poolman, B., and Konings, W.N., 1997. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. 118, 3, 423-428.
- 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.
- 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.
- Veeraragavan, K., 1990, A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity, Analytical Biochemistry, 186, 301-305.
- Verger, R., 1997. Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts, Trends in Biotechnology, 15, 32-38.
- Vieille, C. ve Zeikus, G.J., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65, 1-43.
- Vulfson, E. N., 1994. Industrial applications of lipases, Wolley P., Peterson, S. B., Cambridge Univ. Pres, Cambridge.

- Wilke, D., 1999. Chemicals from Biotechnology: Molecular Plant Genetics will Challenge the Chemical and Fermentation industry, Appl. Microbiol. Biot. 52,135–45.
- 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.
- 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.
- Yadav, R. P., Saxena, R. K., Gupta, R. ve Davidson, S., 1998, Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 28, 243-249.
- Yıldırım, M., 2009. Termofilik *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4 Suşundan Fosfotriesteraz Homolog Protein'in Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- 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

1986 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon 'da tamamladı. 2004–2008 yılları arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimi gördü. 2008 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başlamış olup, orta derecede İngilizce bilmektedir.