

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ANEURINIBACILLUS* sp. PDF24' TEN TERMALKARARLI YENİ BİR
KARBOKSİLESTERAZİN KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meral BELDÜZ

HAZİRAN 2012

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***ANEURINIBACILLUS* sp. PDF24' TEN TERMAL KARARLI YENİ BİR
KARBOKSİLESTERAZIN KARAKTERİZASYONU**

Biyolog Meral BELDÜZ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :22.05.2012
Tezin Savunma Tarihi :13.06.2012**

Tez Danışmanı : Doç Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalında
Meral BELDÜZ tarafından hazırlanan

ANEURINIBACILLUS sp. PDF24' TEN TERMAL KARARLI YENİ BİR
KARBOKSİLESTERAZIN KARAKTERİZASYONU

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 22 / 05 / 2012 gün ve 1457 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. Sabriye ÇANAKÇI



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Aneurinibacillus* sp. PDF24’ ten termal kararlı yeni bir karboksilesterazın karakterizasyonu” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Araştırma konusunun seçiminde ve çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde değerli eleştiri ve önerileri ile yol gösteren hocam Doç.Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, laboratuvar çalışmalarının ve tez yazımının her aşamasında engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan K.T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarının tüm çalışanlarına ve özellikle çalışmamın her aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyerek yol gösterici olan Arş.Gör. Fulya AY ŞAL’a, aynı zamanda bana her an destek olan Yrd.Doç.Dr. Kadriye İNAN’a, Arş.Gör. Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Zümrüt ÖZTEKİN’e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca bana tez yazımında çok destek olan Onur TOSUN ve Ersan BEKTAŞ’a çok teşekkür ederim.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç veren değerli aileme minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyuyorum.

Meral BELDÜZ
Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Aneurinibacillus* sp. PDF24' ten termal kararlı yeni bir karboksilesterazın karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, 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. 22/05/2012

Meral BELDÜZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Esteraz/Lipazların Özellikleri.....	2
1.2.1. α/β -hidrolaz Katlanması.....	4
1.2.2. Bakteriyal Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması.....	4
1.2.2.1. Gerçek Lipazlar.....	4
1.2.2.2. GDSL Ailesi.....	5
1.2.2.3. Aile III.....	5
1.2.2.4. Hormon Duyarlı Lipaz (HSL) Ailesi.....	5
1.2.2.5. Aile V.....	6
1.2.2.6. Aile VI.....	6
1.2.2.7. Aile VII.....	6
1.2.2.8. Aile VIII.....	7
1.3. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları.....	7
1.3.1. Esteraz/ Lipaz Katalizli Hidroliz Reaksiyonu.....	8
1.3.2. Esterifikasyon ve Transesterifikasyon Reaksiyonları.....	8
1.4. Esteraz /Lipaz Kaynakları.....	9
1.5. Esteraz /Lipaz Aktivite Tayin Yöntemler.....	10
1.5.1. Kolorimetrik Yöntem.....	10
1.5.2. Titrimetri (Volumetrik analiz).....	10

1.5.3.	Florimetrik Analiz.....	11
1.5.4.	Spektrofotometrik Analiz.....	11
1.5.5.	Kromatografik Prosedür.....	12
1.5.6.	Kalitatif Analiz.....	12
1.5.7.	İmmunolojik Metodlar	13
1.5.8.	Turbidimetrik Yöntem	13
1.6.	Esteraz /Lipazların Endüstriyel Önemleri.....	14
1.7.	Termofilik Bakteriler ve Habitatları	15
1.8.	<i>Aneurinibacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	16
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	18
2.1.	Kimyasallar	18
2.2.	Hücreler.....	18
2.3.	Degryse Besiyeri.....	18
2.4.	Esteraz Aktivitesinin Ölçümü.....	19
2.5.	Petride Esteraz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi.....	20
2.6.	Enzim Üretimi ve Saflaştırılması.....	20
2.6.1.	Protein Konsantrasyonu Tayini.....	20
2.6.2..	Enzim Üretimi.....	20
2.6.3.	Hücre Ekstratının Elde Edilmesi.....	21
2.6.4.	Esterazın Saflaştırılması.....	21
2. 6.4.1.	Isı Şoku Uygulaması	21
2. 6.4.2.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	21
2. 6.4.3.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi	22
2. 6.4.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi	23
2. 6.4.5.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	23
2. 6.4.6.	Hidrolaz Aktivitesinin Zimogramı.....	24
2.7.	Esteraz Karakterizasyonu.....	24
2.7.1.	Optimum Sıcaklık	24
2.7.2.	Optimum pH	25
2.7.3.	Kinetik Parametreler	25
2.7.4.	pH Kararlılığı	25
2.7.5.	Isıl Kararlılığı.....	26
2.7.6.	Substrat Spesifikliğı	26

2.7.7.	Metal İyon Etkisi.....	26
2.7.8.	İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	27
3.	BULGULAR.....	28
3.1.	Esteraz Aktivitesi	28
3.2.	Petride Esteraz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi.....	28
3.3.	Esterazın Saflaştırılması.....	29
3.3.1.	Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları	29
3.3.2.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	29
3.3.3.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi	29
3.3.4.	Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi ve Jel Görüntüsü	30
3.3.5.	Hidrolaz Aktivitesinin Zimogramı.....	31
3.4.	<i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 Esterazın Karakterizasyonu	32
3.4.1.	Optimum Sıcaklık	32
3.4.2.	Optimum pH	33
3.4.3.	Kinetik Parametreler	34
3.4.4.	pH Kararlılığı	35
3.4.5.	Isıl Kararlılığı.....	36
3.4.6.	Substrat Spesifikliği	37
3.4.7.	Metal İyon Etkisi.....	37
3.4.8.	İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	38
4.	TARTIŞMA	40
5.	SONUÇLAR	44
6.	ÖNERİLER.....	46
7.	KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans

ÖZET

ANEURINIBACILLUS sp. PDF24' TEN TERMAL KARARLI YENİ BİR
KARBOKSİLESTERAZIN KARAKTERİZASYONU

Meral BELDÜZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2012, 53 Sayfa

Esterazlar (EC 3.1.1.1), ester bağlarının formasyonu ve yarılmasını katalize eden hidrolazların bir grubunu temsil eder. Bunlar hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygındırlar. Birçoğu, karbon kaynaklarına erişimi sağlamayı geliştirme veya katabolik yollara dahil olma gibi varsayımlara öncülük eden geniş bir substrat toleransını göstermektedir. Kofaktörlere ihtiyaç duymamaları, genellikle stabil olmaları ve organik çözücülerde bile aktif olmaları bu enzimleri gerçekten ilginç kılmaktadır. Yüksek sıcaklıkta yaşayan termofilik bakterilerin sahip olduğu termofilik enzimler de biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda kullanıldığından dolayı bu bakterilere büyük bir önem kazandırır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Aneurinibacillus* sp. PDF24 suşundan elde edilen esterazının saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu konu almaktadır. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 suşu degyse besiyerinde ekspres edildi ve saflaştırıldı. Saflaştırılan esterazın maksimum aktivitesi 55°C, pH 8,5'te incelendi. *p*-nitrofenil butirat için olan K_m 0,120 mM ve V_{maks} 3164,8 U/mg değerleri hesaplandı. K_m değeri literatürdeki diğer esterazlara göre iyi bir değere sahip olduğu belirlendi. Mg^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , ve Co^{2+} metal iyonlarının etkisi incelendi. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının moleküler ağırlığı yaklaşık 40 kDa olarak belirlendi. Elde edilen veriler ışığında, enzimin biyokimyasal özellikleri, enzimin önemli bir endüstriyel enzim olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Aneurinibacillus*, Esteraz, Saflaştırma, Karakterizasyon

Master Thesis

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF A NEW THERMALSTABLE CARBOXYLESTERASE
FROM *ANEURINIBACILLUS* sp. PDF24

Meral BELDÜZ

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2012, 53 Pages

Esterases (EC 3.1.1.1) represent a group of hydrolases that catalyze the formation and fission of ester links. They are very common in animals, plants, and microorganisms. Many of them show a wide substrate tolerance which led to the assumption that they have evolved to enable access to carbon sources or to be involved in catabolic pathways. What attracts the interest in these enzymes is the fact that they do not require cofactors, are usually rather stable, and are even active in organic solvents. The fact that thermophilic enzymes that thermophilic bacteria-growing at very high temperatures- possess are utilized in biotechnology and industry, attach a great significance to these bacteria.

This study is about the purification and characterization of esterase obtained from the *Aneurinibacillus* sp. PDF24 strain, a thermophilic bacteria. The *Aneurinibacillus* sp. PDF24 strain was expressed and purified in degyse medium. The maximum activity of the purified esterase was analyzed at 55°C, pH 8.5. The values K_m 0,120 mM and V_{max} 3164,8 U/mg for *p*-nitrophenyl butyrate were calculated. K_m was determined to have a better value compared to the other esterases in literature. The effect metal ions Mg^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , and Co^{2+} was examined. The molecular weight of *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterase was determined about 40 kDa. Considering the obtained data, the biochemical features of the enzyme, show that it can be an important industrial enzyme.

Key Words: *Aneurinibacillus*, Esterase, Purification, Characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> carboxylesterase Est30'un aktif bölgesinin gösterilmesi.....	3
Şekil 2. α/β -hidrolaz katlanması	4
Şekil 3. Esteraz/Lipaz katalizli reaksiyon denklemi	8
Şekil 4. PDF24 bakterisinin Degryse-Tribütrin agar üzerindeki esteraz aktivitesi	28
Şekil 5. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının iyon değişimi grafiği	30
Şekil 6. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının hidrofobik değişimi grafiği	30
Şekil 7. Enzim saflığının elektroforetik olarak incelenmesi	31
Şekil 8. Hidrolaz aktivitesinin zimogramı	32
Şekil 9. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının optimum sıcaklık grafiği.....	33
Şekil 10. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının optimum pH grafiği	33
Şekil 11. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının Michaelis- Menten eğrisi	34
Şekil 12. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının Lineweaver-Burk eğrisi	34
Şekil 13. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının oda sıcaklığındaki pH kararlığı.....	35
Şekil 14. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının 55 °C'deki pH kararlığı	36
Şekil 15. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının ısıl kararlığı	36
Şekil 16. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının substrat spesifikliği	37
Şekil 17. <i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının metal iyonlarının etkisi	38

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	<i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazının saflaştırma tablosu	31
Tablo 2.	<i>Aneurinibacillus</i> sp. PDF24 esterazına İnhibitör ve Aktivatörlerin Etkisi	39

SEMBOLLER DİZİNİ

μM	: Mikromolar
BSA	: Bovin Serum Albumin
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
kDa	: Kilodalton
mA	: Miliamper
mg	: miligram
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
PNPB	: p-nitrofenilbutirat
PNPD	: p-nitrofenildekonat
PNPL	: p-nitrofenillaurat
PNPM	: p-nitrofenilmristat
PNPO	: p-nitrofeniloctanat
PNPP	: p-nitrofenilpalmitat
SDS- PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
V_{max}	: Maksimum hız
ϵ	: Molar absorblama katsayısı

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden ve genel olarak protein yapısında olan moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Wiseman, 1987). Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânı sağlamaktadır. Bu doğrultuda enzimler hakkında elde edilen bilgiler pratik uygulamalara imkân verdikçe enzimlerin değişik alanlarda çeşitli amaçlarla kullanımına izin verir (Telefoncu, 1986).

Enzimin aracılığı ile gerçekleştirilen işlemler, antik medeniyetlerden günümüze kadar gelmiştir. Şu ana kadar bilinen 4000'den fazla enzimin yaklaşık olarak 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin büyük bir kısmı mikrobiyal kökenlidir. Endüstriyel enzimlerin çoğunluğu (yaklaşık %75'i) hidrolitik etkiye sahiptir. Hidrolazlar, çok geniş substrat spesifitesi gösteren bir enzim sınıfıdır. Hidrolazların iki ana grubu olan lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar) ve esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilester hidrolazlar) endüstriyel potansiyeli yüksek olan önemli biyokatalizörlerdir.

Lipolitik enzimler biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı bugünlerde oldukça dikkat çekmektedir (Benjamin, 1998). Lipolitik enzimler biyoteknolojik uygulamalar için biyokatalitiklerin en önemli grubunu oluşturur.

Esterazlar, ester bağlarının oluşumunu ve yarılmasını katalize eden hidrolazların bir grubunu temsil eder. Bunlar hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda yaygındır. Birçoğu, karbon kaynaklarına erişimi geliştirme veya katabolik yollara dahil olma gibi varsayımlara öncülük eden geniş bir substrat toleransını göstermektedir. Üstelik esterazlar kendilerini yüksek saflıktaki kimyasal sentezinde optik saf bileşenlerin üretimi için ilginç biyokatalizler yapan yüksek bölge- ve stereospesifite gösterirler. Kofaktörlere ihtiyaç duymamaları, genellikle stabil olmaları ve organik çözücülerde bile aktif olmaları bu enzimleri gerçekten ilginç kılmaktadır (Bornscheuer, U. T. ve Kazlauskas, R. J.,1999;

Wong, C. H. ve Whitesides, G. M., 1994). Günümüzde enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda, ziraat, tekstil, deri sektörü, birçok endüstriyel malzemenin üretimi ve işlenmesi, çeşitli toksik maddelerin muamelesi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Telefoncu, 1997; Karademir vd., 2002). Bu çalışmalar, lipaz/esteraz üreten yeni mikroorganizmaların izole edilmesi ve tanınması, bu enzimlerin saflaştırılması, immobilizasyonu (tutuklanması), ekspresyonu ve karakterize edilmesi ile yüksek sıcaklık, pH, organik çözücüler, çeşitli yükseltgen/indirgenlere karşı kararlı olmasının ve aktivasyonunun sağlanması olarak özetlenebilir. Özellikle yağlarla ilgili son zamanlarda yapılan çalışmalar, biyolojik işlemleri kimyasal işlemlerden daha önemli hale getirmiştir. Bunun en önemli sebebi kimyasal işlemlerde yan ürün oluşmasıdır ve bu yan ürünler sayıca fazladır ve ayrıca yüksek sıcaklık, basınç, pH vb. gibi olağanüstü şartlar gerektirir. Ayrıca biyoteknolojik yöntemler, kimyasal yöntemlerden daha ekonomiktir. Endüstride son yıllarda termofilik mikroorganizmalardan elde edilen esterazlar ön plana çıkmıştır. Termofilik bakteriler ekstrem sıcaklık şartlarında yaşamaya adapte olmuş canlılar olup, bunların içerdiği termofilik enzimler son zamanlarda biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

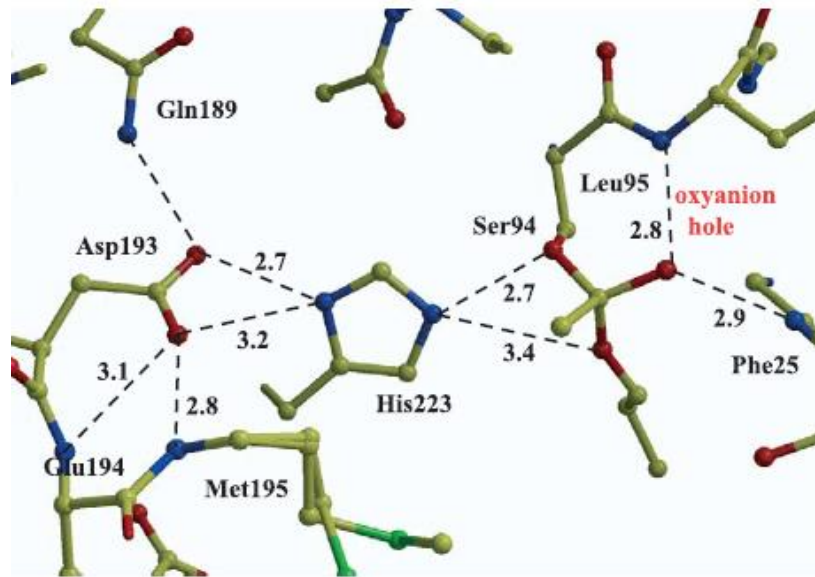
1.2.Esteraz/Lipazların Özellikleri

Esterazlar organik çözücü ortamında ester bağlarının oluşumunu ve sulu ortamda bu bağların hidrolizini katalizler, lipazlar ise organik çözücü-su ara yüzeyinde, suda çözünmeyen uzun karbonlu yağ asitlerini içeren triaçilgliserollerin ester bağlarının hidrolizini katalizler, bu özellikleri ile birbirlerinden ayrılırlar. Lipazlardaki bu organik çözücü-su ara yüzeyindeki aktivite, ara yüzey aktivasyonu olarak bilinir, bazı durumlarda ise lipazlar, suda çözünen esterlere karşı da aktivite gösterebilir (Desnuelle, 1972; Schmid ve Verger, 1998).

Esterazlar (EC 3.1.1.1) ve lipazlar (EC 3.1.1.3) ester bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir ve bu enzimler hidrolizledikleri ester bağlarına bağlı olarak kendi aralarında bazı alt sınıflara ayrılırlar. Esterazların alt sınıfları sırasıyla: Karboksil ester hidrolazlar (EC 3.1.1.x), tiyoesterazlar (EC 3.1.2.x), fosforik monoester hidrolazlar (EC 3.1.3.x), fosfodiester hidrolazlar (EC 3.1.6.x), difosforik monoesterazlar (EC 3.1.7.x), fosforik triester hidrolazlardır (EC 3.1.8.x). Bu enzimler insan, hayvan ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Schmid vd., 1998). Karboksil ester hidrolazların (EC

3.1.1.x) iki önemli sınıfı bakteriler tarafından da üretilmektedir. Bunlar; gerçek esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilesterazlar) ve lipazlardır (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol hidrolazlar). Her iki enzimin üç boyutlu yapısı karakteristik α/β -hidrolaz katlanması ile meydana gelmektedir.

Lipazlar katalitik bölgede G-X1-S-X2-G aminoasit sırasına sahiptir (G= glisin S=serin X1= histidin X2= glutamik veya aspartik asit) (Svedsen ,1994). Birkaç yıl öncesine kadar tüm esterazların ve lipazların aktif bölgede Gly-X1-Ser-X2-Gly aminoasit sekansına sahip olduğu zannediliyordu, fakat daha sonra 53 lipazın aminoasit sekanslarının karşılaştırılması ile, bundan başka aminoasit sekansına sahip esterazlar ve lipazlar da olduğu ortaya çıkmıştır. Buna örnek olarak; *Streptococcus scabies*, bakterisi aktif bölgesinde Gly-Asp-Ser-Leu aminoasit sekansı belirlenmiştir.



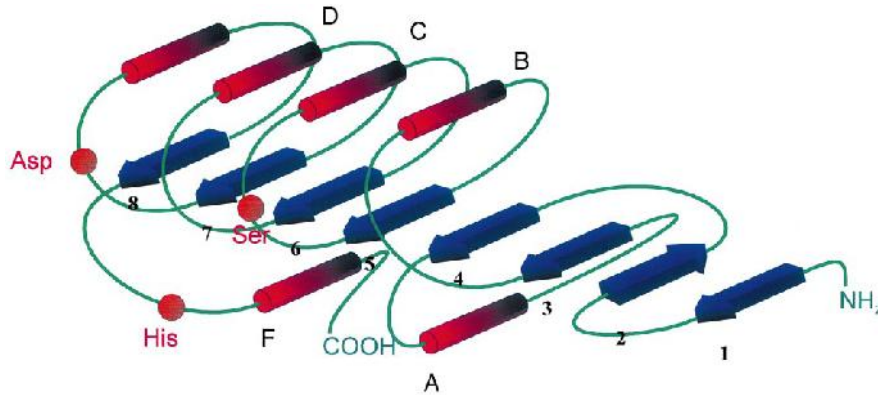
Şekil 1. *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30'un aktif bölgesinin gösterilmesi. Atomlar arası etkileşimler kesik çizgiler ile gösterilmektedir. Tetrahedral alandaki negatif yüklü oksijen atomu ve Leu95 ile Phe25 aminoasitlerinin NH grupları bir oksianyon boşluğu oluşturmaktadır (Liu, vd., 2004).

Lipolitik enzimler; kısa zincirli açilgliserolleri hidrolizyen esterazlar ($C < 10$) ve uzun zincirli açilgliserolleri hidrolizyen lipazlar ($C > 10$) olarak ikiye ayrılmıştır. Biyokatalizlerin her iki grubu da karakteristik özelliğe sahiptir. Endüstrinin bir çok alanında örneğin, farmosötik, biyokimyasal ve biyoteknolojik uygulamalarda bu karakteristik özelliklerinden yararlanılmıştır (Jaeger, ve Reetz, 1998; Jaeger. ve Eggert, 2002).

1.2.1. α/β -hidrolaz Katlanması

Hidrolazların iki ana alt grubu vardır, bunlardan birincisi 'gerçek' esterazlar (EC3.1.1.3 karboksil ester hidrolazlar), ikincisi ise lipazlardır (EC3.1.1.1 triaçilgliserol hidrolazlar). Her iki enzimin de üç boyutlu yapısı, karakteristik α/β -hidrolaz katlanması ile meydana gelir (Ollis ve arkadaşları, 1992).

Esteraz ya da lipazların moleküler ağırlıkları 19-60 kDa arasında değişiklik göstermektedir (Bano vd., 2003). Bu grupta yer alan tüm enzimler, $\alpha/\beta/\alpha$ sandviçi oluşturacak şekilde beşten sekize kadar α -helikslerle bağlanmış, β -sheet tabakadan oluşan yapılardır. Çoğu familyada β -sheet tabakaları paraleldir. Katalitik bölgesinde ise Ser-Asp-His aminoasit üçlüsü yer almaktadır.



Şekil 2. α/β -hidrolaz katlanması. (1-8) β tabakası mavi oklar, (A-F) α heliks kırmızı sütunlar; katalitik aminoasit üçlüsünün ilişki konumu turuncu daireler ile tanımlanmıştır.

1.2.2. Bakteriyal Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması

1.2.2.1. Gerçek Lipazlar

Bakteriyal gerçek lipazlar önceden *Psuedomonas* grubu içerisinde üç alt grupta adlandırılırdı. *Psuedomonas* lipazları muhtemelen ilk çalışılan lipazlardır. Bu lipazlar endüstride önemli bir role sahiptir. Önemli lipazları üreten bazı *Psuedomonas* türleri *Burkholderia* olarak yeniden adlandırılmıştır. Gerçek lipazlar 6 alt aile temelinde yeniden

sınıflandırılmıştır. Çeşitli *Bacillus* ve *Staphylococcus* türlerine ait lipazlar da bu grupta yer almaktadır.

1.2.2.2. GDSL Ailesi

Bilinen Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly sırası yerine aktif serin aminoasiti içeren Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)] motifinden oluşmaktadır. Bu proteinlerin aktif serin kısmı diğer lipolitik enzimlere göre N-terminal kısmına çok daha yakındır (Upton ve Buckley, 1995) *Streptomyces scabies* esterazı, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriler bu sınıfta yer almaktadır.

1.2.2.3. Aile III

Cruz ve arkadaşları (1994) tarafından tanımlanmıştır. Bu enzim tipik katalitik aminoasit üçlüsünü içerir ve bilinen α/β hidrolaz katlanmasını göstermektedir. *Streptomyces exfoliatus* lipazı bu sınıfta yer almaktadır.

1.2.2.4. Hormon Duyarlı Lipaz (HSL) Ailesi

Bakteriyal enzimlerin bir takımı memeli hormon duyarlı lipazının aminoasit dizisi ile önemli ölçüde benzerlik göstermektedir (Hemilä, vd., 1994). Memeli hormon duyarlı lipazı ve *Moraxella* suşundan elde edilen lipaz oldukça düşük sıcaklıklarda (15 °C'nin altında) yüksek aktiviteye sahiptir. Bu nedenle, lipazın bu özelliğinin korunmuş sıralarından kaynaklandığı düşünülse de, benzer amino asit sırasına sahip bazı psikrofilik (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*) mezofilik (*Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*) ve termofilik (*Alicydobacillus acidocaldarius*, *Archeoglobus fulgidus*) türlerde de bulunması, sıcaklık adaptasyonun bu korunmuş dizilimden kaynaklanmadığı belirlenmiştir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

1.2.2.5. Aile V

HSL ailesine benzer proteinler içeren aile V hem *Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus* gibi mezofilik bakterilerden hem de *Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis* gibi soğuga- adapte olmuş ya da *Sulfolobus acidocaldarius* gibi sığağa-adapte olmuş organizmalardan köken almıştır. Bu enzimler çeşitli lipolitik olmayan bakteriyal enzimlere ait amino asit dizi benzerliklerine sahiptir, yani epoksi hidrolazlar, dehalogenazlar ve haloperoksidazlar tipik α/β hidrolaz katlanması ve katalitik aminoasit üçlüsüne sahiptir (Verschuere, 1993; Misawa, 1998).

1.2.2.6. Aile VI

Bu sınıfın moleküler ağırlığının 23-26 kDa büyüklüğünde olması, bu enzimlerin, en küçük boyutlu esterazlar olmasını sağlamaktadır. *Pseudomonas fluorescens* karboksilesterazın üç boyutlu yapısı çözülmüştür (Kim vd., 1997). Bu enzimin aktif formu dimer halindedir. Alt ünitesi α/β hidrolaz katlanmasına ve tipik Ser-Asp-His katalitik amino asit üçlüsüne sahiptir. Bu karboksilesteraz küçük substratları hidroliz edebilir. Fakat uzun zincirli trigliseritlere karşı aktivite gösterememektedir (Hong, 1991). Bu enzimler hakkında çok az bilgi literatürde bulunmaktadır. Bu enzimlerin aminoasit dizilerini veren gen sıraları ile başka gen sıraları arasında bir benzerlik bulunmamaktadır. Sadece bir tane enzimin ökaryotik lizofosfolipaz ile (Ca^{+2} a bağımlı olmayan lizofosfolipaz A2) %40 benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Arpigny ve Jaeger, 1999). *Spirulina platensis* ve *Rickettsia* lipazları bu sınıf içerisinde yer almaktadır.

1.2.2.7. Aile VII

Bu sınıfta oldukça büyük moleküler ağırlığa (50 kDa) sahip olan bakteriyal esterazlar bulunmaktadır. Bu enzimler ökaryotik asetilkolin esterazları ve ince bağırsak/karaciğer karboksil esterazları ile önemli derecede aminoasit dizi benzerliği göstermektedir. *Arthrobacter oxydans* 'den elde edilen esteraz özellikle merkezi karbamat bağlarını hidrolize ederek fenilkarbamat herbisitlere karşı aktiftir (Pohlenz, 1992). *Bacillus subtilis*'den elde edilen esterazların etkili bir şekilde *p*-nitrobenzil esterlerini hidrolize ettiği

ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, β -laktam anitibiyotiklerinin sentezinde koruyucu grup olarak kullanılan *p*-nitrobenzil esterinin uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için kullanılmaktadır (Zock, 1994).

1.2.2.8. Aile VIII

Bu aileyi oluşturan üç enzim sınıf C β -laktamazların birçoğu ile önemli bir benzerlik göstermektedir ve yaklaşık olarak uzunluğu 380 aminoasittir Bu ailedeki esterazların katalitik mekanizmasını açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

1.3. Esteraz/Lipazların Reaksiyon Mekanizmaları

Esterazları lipazlardan ayıran en önemli özellik; yüzeyleyarası aktivasyon ve kapak yapısıdır. α/β -hidrolazların sekonder yapılarının 5-6 alfa-sarmal ve 8 beta-tabaka yapısından ibaret olduğu ve aktif bölgelerinde bulunan katalitik aminoasit üçlünün (Ser-His-Asp/Glu) hidrofobik aminoasitlerce (Phe, Trp, ile, Leu ve Try gibi) zengin, 1 veya 2 alfa-sarmal yapıda polipeptid zincirinden ibaret bir kapakla kuşatıldığı bilinmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998). Bir lipid-su emülsiyonunda kapağın açılması, substratların aktif bölgeye girişine imkan sağlar (açık konformasyon) (Jaeger ve Reetz, 1998). Bu aktivasyon işlemi sırasında katalitik serin birimi üzerinde hidrofobik bir yarık meydana gelir. Bu yarık açıl gruplarının ulaşabilmesi için uzanmış bir cep şeklindedir. Birçok lipaz da kapağın hareketiyle bir oksianyon boşluk oluşmaktadır. Bu boşluk substrata yapılacak nükleofilik saldırı sırasında oluşan negatif yükleri kararlı kılan elektrofilik bir çevre oluşturur (Jaeger ve Reetz, 1998).

Ester hidrolizi ya da oluşumu için mekanizma aslında esterazlar ve lipazlar için aynıdır. Bu mekanizma dört aşamadan oluşur:

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

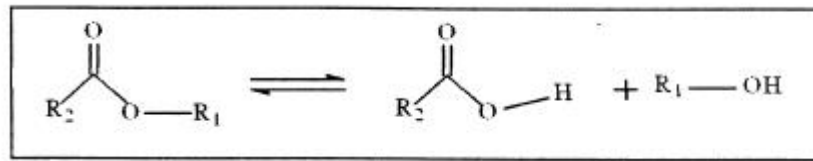
2-İkinci adımda alkol salınır ve açıl-enzim kompleksi oluşur.

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).

1.3.1. Esteraz/Lipaz Katalizli Hidroliz Reaksiyonu

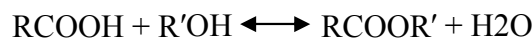
Esteraz ve lipazların, iki farklı reaksiyonu vardır; bunlardan birincisi, gliserol ve uzun zincirli yağ asitleri ester sentezi reaksiyonları diğeri ise, başka esterlerin gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerine hidrolizi reaksiyonlarıdır (Jaeger ve Reetz, 1998) (Şekil 2). Ortamın hidrofobitesine bağlı olan enzimin aktivitesi, lipazların yağların hidrolizini katalizledikleri uygun ortamın lipid-su arayüzeyi olduğunu belirtmektedir (Martinelle vd., 1995). Endüstriyel alanda, deterjanlara esteraz ve lipaz eklenerek kullanılmasıyla, içeriğinde yağ olan kirlerin bu deterjanlarla daha etkili bir şekilde uzaklaştırılması sağlanmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998). Bu uzaklaştırma işlemi lipazların ve esterazların hidroliz yönündeki reaksiyonları ile gerçekleştiği bilinmektedir. Kağıt sanayinde odundan istenmeyen lipolitik maddelerin uzaklaştırılmasında da lipazlar ve esterazlar kullanılmaktadır (Sharma vd., 2001).



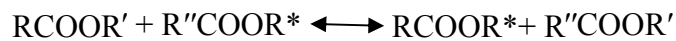
Şekil 3. Esteraz/Lipaz katalizli reaksiyon denklemi

1.3.2. Esterifikasyon ve Transesterifikasyon Reaksiyonları

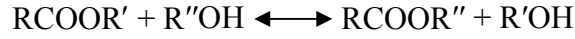
Esterifikasyon



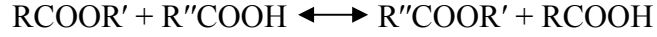
İnteresterifikasyon



Alkolizis



Asidolizis



İnteresterifikasyon, alkolizis ve asidolizis reaksiyon üçlüsü, transesterifikasyon olarak adlandırılır. Esteraz ve lipazların geri dönüşümlü sentez reaksiyonları, bazı ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Esterifikasyon; su ve ester oluşumunu sağlar, alkolizis; asidolizis ve interesterifikasyon gibi transesterifikasyon işlemleri sırasında alkol, asit veya ester oluşur. Bu nedenle, bu ürünlerden herhangi biri oluşturulmak isteniyorsa, transesterifikasyon reaksiyonları esterifikasyona göre daha karlı bir işlem olur. Esterifikasyon temel olarak bir asidin alkolle reaksiyonundan meydana gelmektedir. Esterazlar ya da lipazlar çok geniş bir substrat spektrumu gösterirler. Bu da bu enzimlerin şeker esterleri, tiyol esterleri, peptitler, yağ amidleri gibi ürünlerin sentezlerini katalizleme olanağını sunar.

Bu durumun sonucunda, bu enzimler potansiyel uygulamalar için bilinen diğer enzimlerden çok daha önemli bir yere sahip hale gelir (Gandhi, 1997).

1.4. Esteraz/Lipaz Kaynakları

Esterazlar ve lipazlar doğada her yerde bulunur ve bunlar çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından üretilir. Bakteriyal ve fungal kökenli lipazlar organik kimyada ve biyoteknolojik uygulamalarda geniş çapta enzimlerin sınıflandırılmasında yardımcı olur. Fungal lipazlarla çalışmalar 1950'lerin başında başlamış, Lawrence ve daha sonra Brockerhoff ve Jensen tarafından bu enzimler çeşitli yönlerden tartışılarak kapsamlı olarak incelenmiştir. Bundan sonra birçok araştırmacı termal stabilite, substrat özgüllüğü ve organik çözücülerdeki aktivitelerinden dolayı değerli lipaz kaynağı olarak fungusları göstermişlerdir (Ghosh vd., 1996). Ticari olarak kullanılan başlıca fungal lipaz üreticileri; *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. carneus*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae*'dir (Ghosh vd., 1996). Ekstraselüler bakteriyal lipazların yüksek miktarda üretiminin kolay olmasından dolayı ticari önemi vardır. Bir takım lipaz üreten bakteriyal kaynakları elde edilebilir olmasına rağmen, sadece bir kaç yabancı ya da rekombinant suş ticari olarak

kullanılmaktadır (Jaeger vd., 1994; Palekar vd., 2000). Bunların bazı önemli olanları; *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* ve *Pseudomonas*'tır. Bu lipazlar, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır (Jaeger vd., 1994; Pandey vd., 1999; Beisson vd., 2000).

Son birkaç yıl içinde piyasada bulunan birçok ürünün (Lumafast ve Lipomax gibi) kaynağı bakteriyal lipazlara dayanmakta ve *Pseudomonas* spp.'dan elde edilmektedir.

1.5. Lipaz /Esteraz Aktivite Tayin Yöntemleri

1.5.1. Kolorimetrik Yöntem

Kolorimetri, renk ölçülmesi esasına dayanan miktar tayin yöntemidir. Bir çözeltilde konsantrasyonu belli olmayan bir madde tarafından oluşturulan rengin aynı maddenin bilinen konsantrasyondaki çözeltisinin rengi ile karşılaştırılması suretiyle konsantrasyon tayinidir. Lowry ve Tinsley (1976)'e göre, bu tayinlerinin geliştirilmesinde, lipaz aktivitesini belirlemek için serbest yağ asitlerinin tayinininde kullanılan yöntem için yapılan çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır (Thomson vd., 1999). Bu amaçla geliştirilen tüm tayin yöntemleri, serbest yağ asitlerinin organik bir çözücüde divalent bir metalle (genellikle bakır) kompleks oluşturması ve daha sonra bu organik fazdaki metalin spektrofotometrik olarak analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır.

1.5.2. Titrimetri (Volumetrik analiz)

İçinde çözülmüş maddenin konsantrasyonu bilinmeyen bir çözeltinin belirli bir hacimle reaksiyona girebilen bir başka maddenin bilinen konsantrasyonlu çözeltisinin hacimlerini karşılaştırma suretiyle çözelti konsantrasyonu tayinidir.

Hidrolaz sınıfı enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarda H^+ açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan H^+ iyonunun konsantrasyonu reaksiyonun hızı ile doğru orantılıdır (Telefoncu, 1986). Özellikle suda iyi çözünmeyen hidrolaz substratların (triolein veya alternatif olarak zeytinyağı) aktivitelerinin belirlenmesinde titrasyon metodu yaygın kullanılan bir yöntemdir (Telefoncu, 1986; Ghosh vd., 1996). Ek olarak, tribütrin, triasetin (triasetilgliserol) ve tripropiyonin (tripropiyonilgliserol) de enzimatik aktivite tayininde

substrat olarak kullanılabilir (Lanz ve Williams, 1973; Staubmann vd., 1999). Lipolitik reaksiyonlardaki asidin serbest bırakılması, yani reaksiyon yönündeki pH'nın ölçülmesi, titrimetrik olarak analiz edilebilir (Jaeger vd., 1994).

1.5.3. Florimetrik Analiz

Bir maddenin bir çözeltide çok küçük konsantrasyonlarda bile UV etkisi altında kuvvetli flüoresans verme özelliklerine dayanan miktar tayin yöntemidir. Bu yöntem sıklıkla lipaz analizi için floresan bileşikler kullanılarak uygulanmaktadır. Metot, lipaz aktivitesi sonucunda serbest kalan floresan yağ asitlerinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu analiz, triaçilgliserollerin alkil grubunun, pirenil gibi bir floresan grupta yer değiştirmesi ile gerçekleşmektedir (Thuren vd., 1987; Negre-Salvayre vd., 1991). Bu yöntem hızlı ve etkili olmasına rağmen pahalı olması kullanımını sınırlandırmaktadır (Gupta vd., 2003).

Jette ve Ziomek (1994) yaptıkları çalışmada, trigliseritlerin enzimatik hidrolizleri sırasında yağ asitleri ile rhodamine B'nin etkileşimi ile alakalı olan kantitatif floresans lipaz analizini anlatmışlardır. Rhodamine-Trigliserit-Agaroz analiz yöntemi ile substratların seçimindeki esnekliğe izin verilebilmekte ve birçok örneğin eş zamanlı analizi yapılabilmektedir. Ayrıca bu yöntem, saflaştırma esnasında kolon fraksiyonlarındaki lipaz aktivitesinin belirlenmesini kolaylaştırmaktadır.

1.5.4. Spektrofotometrik Analiz

Spektrofotometri, ışık kaynağı ile prizma arasına yerleştirilen renkli maddenin ışık spektrumunun bazı renklerini absorblaması ve konsantrasyona göre spektrumda zayıf veya kuvvetli bant göstermesi özelliğine dayanan miktar tayin yöntemidir. Bu yöntemle konsantrasyonu bilinen bir standart çözeltinin absorbladığı ışık miktarı ile konsantrasyonu bilinmeyen çözeltinin absorbladığı ışık miktarı karşılaştırılarak birçok çalışmada kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalar ışığında, yağ asidi zincirlerinin çeşitli uzunluğa sahip *p*-nitrofenil ester substratları ile uygulanması sonucunda 410 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümler kaydedilmiştir (Winkler vd., 1979; Pencreac'h ve Baratti, 1996). Lipaz aktivitesinin

ölçülmesinde *p*-nitrofenil palmitat kullanılmasına rağmen, *p*-nitrofenil'in absorbans vermemesinden dolayı bu analiz asidik pH'da yapılamamaktadır. Çünkü, enzimatik aktivite sadece nötral veya alkali pH değerlerinde bu yöntem kullanılarak tespit edilebilmektedir (Kademi vd., 2000). Kolorimetrik analizler, renksiz alfa-naftil karpilat esterinin hidrolizi ile açığa çıkan renkli alfa-naftol'un 560 nm'de spektrofotometrik olarak kaydedilmesi ile de yapılabilir (Degrassi vd., 1999; Gandolfi vd., 2000).

1.5.5. Kromatografik Prosedür

Kromatografi; porlu ortamda hareketli bir çözücü içinde, çözünenlerin farklı hızlarda göçme özelliklerine dayanan miktar tayin ve ayırma yöntemi olup, lipit substratında, enzim hidrolizini takiben serbest bırakılan yağ asitlerinin doğrudan tespit edilmesi için sıklıkla kullanılan bir metottur. Spesifik kolonlar ile ürün veya artakalan substratın miktar tayini ve analizi yapılmaktadır. Diğer analiz yöntemlerine göre zaman alıcı olmasına rağmen substrat spesifikliğinin tayinindeki hassasiyetinden dolayı kullanılmaktadır (Gupta vd., 2003). Lipitlerin tespitinde birçok kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. İnce-tabaka kromatografisi (TLC); triaçilgliserollerden serbest yağ asitlerinin kalitatif analizinde, densitometrik veya autoradiografik metotlardır. Bunlar çok hassas metotlar olmalarına rağmen zaman alıcıdır (Ruiz ve Rodriguez, 1982). Gaz kromatografisi (GC); yağ asitlerini metil esterlerine çevrerek miktar tayini yapan yöntemdir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC); lipolizis ürünlerini kolayca tanımlayabilen bir yöntemdir.

1.5.6. Kalitatif Analiz

Bir maddenin kimyasal yollarla bileşenlerini veya bir karışımı oluşturan maddelerin ne olduğunu anlamaya yarayan analiz yöntemidir.

Bu yöntemle, esteraz üreten suşlar tribütrinli agarda incelenebilmektedir. Tribütrinin hidrolizi sonucunda oluşan zon esteraz veya lipaz aktivitesini göstermektedir. Ayrıca katı besiyerlerine indikatör eklendiğinde renkli zon oluşumuda gözlenmiştir (Gupta vd., 2003). Bu testler ile katı besiyerlerinde lipolitik mikroorganizmaların gelişimleri hızlı bir şekilde araştırılabilmektedir. Ancak mikrobiyal lipazlar tarafından serbest bırakılan yağ asitlerinin, asidik metabolitler üretmesinden dolayı ortamın asidifikasyonundan kaynaklanan

yanlılıklar olabilmektedir (Beisson vd., 2000; Gupta vd., 2003). Bunu engellemek için Kouker ve Jaeger arkadaşlar (1987) floresan Rhodamine B boyasını kullanarak lipolizis zonlarını 350 nm dalga boyunda UV ışığı altında turuncu renkte zonlar göstermiştir. Bu yöntemde substrat olarak triolein (Gupta vd., 2003) ya da her zaman kolaylıkla bulunabilecek olan zeytinyağı kullanılabilir (Jette ve Ziomek, 1994; Jarvis ve Thiele, 1997).

1.5.7. İmmunolojik Metodlar

Lipolitik aktivitelerinden bağımsız olarak immünolojik yöntemler, biyolojik ortamdaki lipazların miktarını ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Beisson vd., 2000). ELISA ve immunoblot analizi bunlardan bir kaçıdır. ELISA, saf halde olan lipazların miktarını ölçmek ve belirlemek için yüksek derecede hassas ve özel bir yöntemdir (Dati ve Grenner, 1984). Bir immünokimyasal metodun tespiti ile jel elektroforezin birleşimi olan immünoblot analizi, belirli bir lipaz için antikorların hassasiyetinin yanısıra lipazların moleküler ağırlığının belirlenmesi için kullanılmaktadır.

1.5.8. Turbidimetrik Yöntem

Bu yöntem yukarıda belirtilen yöntemlerden farklı olarak azalan substrat miktarının ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Rollof ve ark (1984), substrat olarak bir trigliserit emülsiyonu kullandıkları çalışmalarında, başlangıçta bulanık olan substrat emülsiyonunu enzim ile muamele etmişler ve daha sonra spektrofotometre ile 480 nm'de bu emülsiyonun absorbansını ölçerek berraklaşmasına göre enzim aktivitesini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, eklenen lipaz miktarı ile berraklaşma arasında doğrusal bir bağlantı olduğunu bulmuşlardır.

Bu yönteme göre, lipaz aktivitesi bulanık olan substrat emülsiyonunun berraklaşma hızı ölçülerek belirlenir. Substrat olarak triolein-isopropanol 11 emülsiyonu kullanılan bir başka çalışmada ise, 340 nm'de absorbanstaki düşüşe göre lipaz aktivitesi belirlenmiştir (Arzoglou ve Konstantinidou, 1989).

1.6. Esteraz/Lipazların Endüstriyel Önemleri

Endüstriyel alanda enzime bağlı ürünlerin kullanım alanlarının artmasından, çeşitliliğindeki gelişmelerden ve ekonomik değerinin çok önemli bir yer tutmasından dolayı, bilimsel ve biyoteknolojik enzim çalışmalarının önemi ve özellikle enzim elde edilmesinde mikroorganizmaların yeri her geçen gün daha çok artmaktadır. Bu yüzden ticari değeri çok yüksek olan enzim ürünlerinin üretilmesi ve geliştirilmesi için birçok ülkede çok sayıda biyoteknoloji laboratuvarları veya ticari firmalar kurulmakta ve yoğun bir şekilde faaliyet göstermektedirler. Dışa bağımlılığı ortadan kaldırmak ve ticari pazarda önemli bir pay elde etmek ve bu yarışın dışında kalmamak için bilimsel çalışmalar daha da önemli bir hale gelmektedir.

Esterazlar ve lipazların lipidleri parçalama yeteneği deri ve postun işlenme sürecinde kullanılmaktadır. Deri ve postun işlenme sürecinde en önemli basamak, post ve saçtan kaynaklanan yağ ve protein atıklarının uzaklaştırılmasıdır. Kıl dökme gibi kimyasal işlemler ile uzaklaştırmada etkili değildir (Seitz, E.W. 1974). Yağ giderme işleminde sürfaktanların kullanımı hem enzimler kadar etkili değildir hem de çevreye zararlıdır. Sığır postlarından yağ giderme işleminde lipazlar tamamen yüzey aktif maddelerin yerini alabilmektedir (Hasan vd., 2006).

Lipazların az bir miktarı oleokimyasal transformasyonlarda kullanılır (Bornscheuer, 2000). Lipazlar, küflü peynirin karakteristik çeşni molekülleri olan metil ketonların, bir yiyecek renklendiricisi olan astaksantin, doymamış bir yağ asidi (PUFA) olan g-linolenik asidin, prepolimer olarak kullanılan dikarboksilik asitlerin, bir meyve çeşni olan g-decalactonenun bir ön maddesi olarak kullanılan 4-hydroxydecanoic asitin işlenmesinde kullanılmaktadırlar (Undurraga vd., 2001). Ayrıca, lipazlar, farmasötik uygulamalarda ve yiyeceklerde emülsiferler olarak kullanılan monogliseritlerin ve kozmetikte kullanılan izopropanol miristat içeren lipid esterlerinin de işlenmesinde ve daha değerli formlara daha ucuz gliseridlerin interesterifikasyonunda (örneğin, çikolata üretiminde kakao yağı yerine lipazlar kullanılması) yer almaktadırlar. Lipazlar, trigliseritin 2. pozisyonunda sebze yağlarının modifikasyonunda ve bebek mamasında ise, anne sütündeki yağlara benzer yağlar elde edilmesinde de önemli rol oynamaktadırlar.

Lipazlar amid/peptit bağları (C-N) üzerine de etki edebilmektedir. Bununla birlikte, proteazların aksine, lipazlar hem D- hem de L- konfigürasyonlarının başlangıç materyallerinden penisilin G ve diğer penisilin analoglarının peptit ön maddesinin sentezinde

kullanılarak D-amino asitler gibi rol oynayabilmektedirler. Bunu proteazlarla yapmak mümkün değildir (Gandhi, 1997).

Endüstriyel kaynaklı atık suların gideriminde esterazlar ve lipazlar kullanılmaktadır. Bu tür işlemlerde kullanılan havalandırma tanklarında biriken yağ tabakaları esteraz ve lipazların özelliği olan yağı parçalama işleminden yararlanılarak uzaklaştırılır. Atık suların giderilmesindeki bu yöntem deri ve besin endüstrisinde de aynı şekilde kullanılmaktadır.

Fosil yakıt kaynaklarının sınırlı oluşu ve hızla tükenmesi, ham yağ fiyatlarının artması ve çevre sorunları nedeniyle bitkisel yağların alternatif yakıt olarak kullanılması için araştırmalar hızlanmıştır (Hasan vd., 2006). Nouredini ve arkadaşlarının (2005) esteraz/lipazların biodizel üretimi üzerine yaptıkları çalışmada, immobilize edilmiş *Pseudomonas cepacia* lipazını kullanarak metanol ve etanol ile soya fasulyesi yağının transesterifikasyonu gerçekleştirdiklerini rapor edilmiştir.

Lipazlar, monolaurin gibi monogliseritlerin, şeker esterlerinin ve *O*-açıl-L-homoserin gibi yağ açıl amino esterlerin sentezinde kullanılırlar. Bu bileşikler besinlerde emülsifiye edici olarak kullanılmaktadır. 3-Stearoil D-glukoz gibi şeker açıl esterleri ekmeklerin yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Gandhi, 1997).

Hidrolitik esterazlar ve lipazlar için ticari olarak en önemli uygulama alanı; ev ve sanayi tipi çamaşır yıkama makinesi ve ev tipi bulaşık yıkama makinelerinde başlıca kullanılan deterjanlara eklenmeleridir. Bu tür deterjanların temizleme gücü en üst seviyededir, tüm deterjanlar benzer içerikler içerir ve benzer deterjan mekanizmalarını esas alır. Deterjanı geliştirmek için, dayanıklı toz deterjanların modern tipleri ve otomatik bulaşık yıkama deterjanları proteaz, amilaz, selülaz, esteraz ve lipaz gibi bir veya daha fazla enzim içerir (Ito vd., 1998). Daha düşük yıkama derecesi kullanımı sağlayarak enerjiyi koruduğu için enzimler deterjan ürünlerinin çevresel yükünü azaltabilir. Deterjanların içeriğinde bulunan kimyasalların daha az kullanılmasını sağlar. Deterjanlardaki kimyasallar biyoçözünürlüğü olan, zararlı atıklar bırakmayan, pis su arıtma işlemlerinde negatif etki sağlamayan ve suda yaşayan canlılara bir risk sunmayanlardır (URL-2).

1.7. Termofilik Bakteriler ve Habitatları

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında bunların üç ana grup altında toplandığı görülmektedir. Bunlar, ökaryotlar, bakteriler ve arkealardır (Trent, 2000).

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

Termofillerin en fazla çalışılan doğal yaşam alanları kaplıcalardır (Hugenholtz vd., 1998). Nötral pH'lı kaplıcalar, asidik ve kükürtlü kaplıcalar, demirce zengin kaplıcalar gibi çeşitli özelliklerde kaplıcalar bulunmaktadır. Kaplıca sularının sıcaklıkları genellikle $50-130^{\circ}\text{C}$ 'dir ve yeryüzüne sıcak halde çıkan bu sular geçtikleri alanlardaki bazı mineralleri çözerek mineral maddelerce zengin duruma gelirler. Bu suların çoğu, hidrojen, kükürt, karbondioksit, düşük moleküler ağırlıktaki organik karbon bileşikleri, metan, amonyak ve eser elementlerce zengin oldukları bilinmektedir. Bu sulardaki klor ve bikarbonat iyonları genellikle baskın olan anyonlardır. Termal suların tam içeriklerinin, suyun yeryüzüne çıkması sırasında içinden geçtiği kayalara ve suyun sıcaklığına göre değişmektedir.

Termofilik bakteriler ilk olarak 1879 yılında Miquel tarafından topraktan, çöplerden, dışkı ve pisliklerden, kanalizasyon ve nehir çamurlarından izole edilmiştirler. İzole edilen bu termofilik bakteriler, 72°C 'de büyüeyebilmekteydiler (Miquel, 1888). Termofilik bakterilerin büyüyüp çoğalabilmeleri için yüksek sıcaklıklara ihtiyaçları vardır, yani termofiller yüksek sıcaklıklarda iyi bir şekilde bölünüp çoğalabilirken, oda sıcaklığında çok zayıf veya üreyemezler.

1.8. *Aneurinibacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Aneurinibacillus cinsinin diğer *Bacillus* türlerine % 91,3'den az bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir Shida ve ark., elde ettikleri 16S rRNA dizileri ve filogenetik verilere dayanarak, *Bacillus aneurinolyticus* grubunu yeni cins olarak tanımlanmıştır. *Bacillus aneurinolyticus* grubu, *Aneurinibacillus* cinsi olarak tanımlanmıştır ve bu gruptaki 2 tür bu yeni cinse dâhil edilmiştir ve *Aneurinibacillus aneurinolyticus* tip türü olarak belirlenmiştir. *Aneurinibacillus* cinsinin tip türü olan *Aneurinibacillus aneurinolyticus* bakterisi, tiamini parçalama özelliğine sahip olduğundan, tiamin ile eş anlamlı olan "aneurin" kelimesinden türevlenmiş "aneurini" eki cins isminin başına ilave edilmiştir.

Aneurinibacillus cinsi, Şu an sistematiki yapılmış 5 t¼r¼ i¼ermektedir. Bu cinsin üyeleri Gram pozitif olup, hücreleri çubuk Őeklinde (0,7-0,9 µm, 3,0-5,0 µm), hareketli, elips Őeklinde sporlara sahip, kolonileri düzg¼n, p¼r¼zs¼z ve sarımsı gri renktedir. Katalaz pozitif olup, başlıca kinonu, menakinon-7'dir ve tiamin hidrolaz tarafından tiamin parçalanır. Bu cinsin % G+C i¼eriĐi, % 41,1-43,4 arasında deĐiŐmekte olup, başlıca yağ asitleri, iso-C_{15:0} ve iso-C_{16:0}'dir (Shida vd., 1996).

Aneurinibacillus cinsinin kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği % 97'den daha fazla olduğu i¼in, 16S rRNA gen dizi analizi *Aneurinibacillus* cinsine ait t¼r¼lerin ayırımında yeterli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmada önemli rol oynamaktadır.

Daha öncede bahsedildiği üzere esterazlar ve lipazlar end¼strinin bir çok farklı alanında kullanılmakta olup ticari değeri yüksek olan enzimlerdir. Fakat ÷lkemizde bu konu ile ilgili fazla çalışma yapılmamıŐtır. Buradan yola çıkarak ÷lkemizdeki bu dışa bağımlılığı ortadan kaldırmak ve ticari pazarda önemli bir pay elde etmek amaçlanmıŐtır. Bu amaç doğrultusunda, *Aneurinibacillus* sp. PDF24 suşundan izole ettiğimiz esteraz bir seri işlem (Saflaştırma basamakları: Isı Şoku Uygulaması - Amonyum s¼lfat çökt¼rmesi - İyon değişimi kromatografisi - Hidrofobik kolon kromatografisi). ile saflaŐtırılmıŐtır Etkili olduğu optimum pH ve sıcaklığı belirlenmiŐ, ısıl ve pH kararlılığı, metal iyonları, deterjanlar ve organik çözüc¼ler ile etkileşimi, substrat spesifikliği özelliklerine bakılarak karakterizasyon çalışmaları yapılmıŐtır. Bu çalışmalar ışığında esterazın end¼striyel a¼ıdan önemi ve diğer alanlardaki uygulamalar i¼in uygun olup olmadığının belirlenerek end¼striye ya da literat¼re yeni bir enzim kazandırmak amaçlanmıŐtır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kimyasallar

Tripton (Merck V441613949), Yeast ekstrakt (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), K_2HPO_4 (Merck A678671), KH_2PO_4 (Merck 567300), $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ (Sigma), Fe (III) Sitrat (Merck), $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (Merck), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Merck), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma), H_3BO_3 (Merck), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Sigma), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (Merck), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck), 4-nitrophenyl bütyrate (Sigma), 4- nitrophenyl myristate (Sigma), 4-nitrophenyl deconoate (Sigma), 4- nitrophenyl laurate (Fluka), 4- nitrophenyl octanoate (Sigma), 4- nitrophenyl palmitate (Sigma), Trizma Baz (Sigma T1503), Akrilamid (Sigma A8887), Bis-akrilamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbu 080702), β -merkaptoetanol (Merck 805740), Metanol, Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), Gliserol (Merck K40789992008), sodium dodecyl sulphate (SDS), Phenyl sepharose 6 Fast Flow (Sigma), Amonyom sülfat (Merck A734116), TEMED (Janssen Chimica), Protein markır (Biolab), KCl (Merck), $CoCl_2$ (Merck), $ZnCl_2$ (Merck), $MgCl_2$ (Sigma), $CaCl_2$ (Aktar Kimya), LiCl (Sigma), phenly-sepharose 6 fast flow (Sigma), Q sepharose fast flow (Sigma), 1-Naphthyl acetate (Sigma), Fast Red TR Salt (Sigma)

2.2. Hücreler

Aneurinibacillus sp. PDF24, *Escherichia coli* JM101, *Staphylococcus aureus*

2.3. Degryse Besiyeri

Yeast ekstrakt	2,5 g
Tripton	2,5 g
Nitrilotriasetik asit	0,1 g
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,4 g
$MgSO_4 \cdot 6H_2O$	2 g
Fe (III) Sitrat (0.01 M)	0,5 mL

İz Element	5 mL
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (0,2M)	15 mL
KH ₂ PO ₄ (0,2M)	10 mL
ddH ₂ O	970 mL

İz Element:

MnSO ₄ .H ₂ O	0,22 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,05 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0025g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0004 g
ddH ₂ O	1000 mL

pH 7,5'e ayarlandı. İstenildiğinde %1,5 agar ilavesi ile agarlı besiyeri yapılır.

2.4. Esteraz Aktivitesinin Ölçümü

Enzim aktivitesinin spektrofotometrede tayini için substrat çözeltisi; 1:4:95 (v/v/v) oranında olacak şekilde sırasıyla; asetonitrilde çözülmüş PNPB, etanol ve tampon bileşenlerinden hazırlandı. Rutin çalışmalarda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazında kör olarak; 900 µl substrat çözeltisi ve 300 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponu, numune olarak 900 µl substrat çözeltisi, 270 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponu ve 30 µl enzim kullanılarak 410 nm de ölçümleri yapıldı (Lee, vd. 1999).

Esteraz ünitesi, hazırlanan enzim özütü ile pH 8,5 ve 55 °C'de PNPB' den 1 dakikada oluşan 1 µmol p-nitrofenolat olarak tanımlanmıştır. 410 nm de PNP ün molar absorblama katsayısı, $1,457 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ dir. Her saflaştırma basamağında elde edilen enzimin spesifik aktivitesi bu formülle hesaplandı. Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlendi.

2.5. Petride Esteraz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi

Suşlar tarafından esteraz üretimi, kalitatif olarak Tribütirin agar'da değerlendirilmiştir. % 1 oranında tribütirin ilave edilerek hazırlanan besiyerlerine ekim yapılmış ve 50°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 3 gün boyunca kolonilerin etrafında açık zon oluşumu gözlenmiş ve zon oluşturan suş esteraz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Ben-Gigirey vd., 2000).

2.6. Enzim Üretimi ve Saflaştırılması

2.6.1. Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein konsantrasyonu tayini Bradford'un (1976) geliştirdiği yöntemle yapıldı. 1000 ml boya solusyonu hazırlanırken 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası önce 50 ml % 95'lik etanol içinde iyice çözülerek, üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit eklendi. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı ile filtre edildi. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 12, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 m NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Her bir örneğin üzerine 5 ml hazırlanan boyadan eklendi. Protein ve boya karışımları vortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlarda örnek 0,15 m NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı ve üzerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımı vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Süre sonunda standart grafiğin yüklendiği Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

2. 6.2. Enzim Üretimi

Aneurinibacillus sp. PDF24 suşu 50 ml Degryse besiyerine ekilerek gece boyunca üremeye bırakıldı ve oluşan kültürün optik yoğunluğu (O.D.) ölçüldü. Daha sonra O.D.'si

0,1 olacak şekilde Degryse besiyerine aşılama yapılarak fazla miktarda üretimi sağlandı. Taze kültür 24 saat çoğaltılmaya bırakıldı. Elde edilen hücreler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve hücre pelleti daha sonraki çalışmalar için elde edilmiş oldu.

2. 6.3. Hücre Ekstratının Elde Edilmesi

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

2.6.4. Esterazın Saflaştırılması

2.6.4.1. Isı Şoku Uygulaması

Isı şoku uygulaması yapabilmek için enzim değişik sıcaklıklarda değişik sürelerde bekletildi. Aktivitenin kaybolmadığı tespit edilen sıcaklık ve süre kullanıldı. Buna dayanarak ham ekstrat 15 dk süre ile 55 °C'de bekletildi. Bekletildikten sonra 15 dk 14800 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant alındı, çöken kısım uzaklaştırıldı. Enzimin aktivitesini koruduğundan emin olmak için süpernatanttan tekrar esteraz aktivitesi bakıldı.

Esteraz aktivitesinden emin olduktan sonra protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 300 µl örnek ayrılarak amonyum sülfat çöktürmesi basamağına geçildi.

2. 6.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Aneurinibacillus sp. PDF24'ten ısı şoku uygulaması sonucu elde edilen 11 ml özütte kademeli olarak amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. %20'lik amonyum sülfat

çöktürmesi için, bir beher içerisinde çok yavaş bir şekilde karıştırılmakta olan özüte 1,65 g kristal haldeki amonyum sülfat azar azar ilave edildi. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra özüt 5 saat daha karıştırılmaya bırakıldı. Ortamın soğuk olması için özütün içinde bulunduğu beher buz içerisinde muhafaza edildi. 5 saat sonunda 10000 rpm' de ve 5°C' de 5 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Süpernatant tekrar bir beher içerisine koyularak daha ileri çöktürme sağlandı. Bu şekilde 1,24 g daha amonyum sülfat ilave edilerek %40'lık, 1,32 g daha amonyum sülfat ilave edilerek %60'lık, 1,42 g daha amonyum sülfat ilave edilerek %80'lik bir amonyum sülfat çöktürmesi sağlandı. Elde edilen pelletler 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponunda çözüldü ve bu örneklerde esteraz aktivitesi araştırıldı. Bütün amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çözeltilerde esteraz aktivitesi bulundu. Bütün örnekler birleştirildi ve amonyum sülfatın uzaklaştırılması için 1 gece boyunca 2 litrelik 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu içerisinde diyaliz edildi.

2.6.4.3. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi

İyon Değişimi Kromatografisi için 50 cm uzunluğundaki ve 1,5 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak anyonik iyon değiştirici olan Q-Sepharose kullanıldı. Hareketli faz olarak 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompası ile alındı ve sonrasında bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 500 ml 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponu ile dengeye getirildi. Özüt kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu malzemesine bağlanmaları sağlandı. Sonrasında kolondan 50 ml daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırıldı. Daha sonra kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,6 molar kadar çıkarıldı. Bunun için 200 ml'lik NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 3,5 ml olacak şekilde toplandı. İyon değişimi grafiğinde kullanılmak üzere, elde edilen tüm tüplerde spektrofotometrik olarak 280 nm'de protein absorbansları ölçüldü. Diğer taraftan tüm tüplerde esteraz taraması yapılarak aktivite veren tüplerde yine iyon değişimi grafiğinde kullanılmak üzere ünite hesabı yapıldı. En fazla enzim bulunduran tüpler seçilerek birleştirildi. Birleştirilen enzim özütü vivaspin konsantrator kullanılarak 3500 g'de 15 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi.

Esteraz aktivitesinden emin olduktan sonra protein konsantrasyonunu, spesifik aktiviteyi belirlemek ve protein jel elektroforezinde kullanmak üzere 300 µl örnek ayrılarak hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi basamağına geçildi.

2.6.4.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi için 20 cm uzunluğundaki ve 0,75 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak Phenyl Sepharose 6 (Sigma) Fast Flow kullanıldı. Kolon malzemesinin gazı vakum pompası ile alındı ve oda sıcaklığına geldikten sonra bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Kolon doldurma işlemi bittikten sonra 1,3 M amonyum sülfat içeren 100 ml tampon ile dengeye getirildi. İyon değişim kromatografisinden elde edilen enzim özütü ise 2,6 M amonyum sülfat içeren tampon ile bire bir oranında seyreltildi ve özütün amonyum sülfat içeriğinin 1,3 M olması sağlandı. Özüt kolona yüklenerek yüksek amonyum sülfat konsantrasyonunda proteinlerin hidrofobik kolon malzemesine bağlanması sağlandı. Daha sonra kolonun amonyum sülfat içeriği 1,3 M'den 0 M'ye düşürüldü. Bunun için 75'er ml'lik amonyum sülfat gradient köprüsü kullanıldı. Ardından %10'luk 50 ml etilen glikolden geçirildi. Tamponun akış hızı 0,5 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içinde 1,7 ml olacak şekilde toplandı. Fraksiyonlardaki protein miktarı 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucu belirlendi. Ayrıca tüm fraksiyonlarda esteraz aktivite taraması yapıldı. Esteraz aktivitesi bulunan fraksiyonlar bir araya toplandı. Birleştirilen enzim özütü vivaspin konsantrator kullanılarak 3500 g'de 15 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi. Bir araya getirilen bu enzim solüsyonu ile karakterizasyon çalışmaları başlatıldı.

2.6.4.5. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein jel elektroforezleri C.B.S (800) 243-4959 marka elektroforezde % 12'lik jel kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. *Aneurinibacillus* sp.PDF24 esterazının denatüre durumdaki moleküler ağırlığını hesaplamak ve saflığını kontrol etmek amacıyla saflaştırılan enzim, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü. Her bir kuyucuğa örneklerden 50 µg protein yüklendi. Her bir örneğin üzerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; %20

Gliserol; % 6 β -merkaptoetanol) tamponu ilave edildi ve sonrasında 99°C'de 4 dakika bekletilerek Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (% 0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve hemen ardından 1. yıkama solüsyonunda (%50 Metanol, %10 Asetik asit %40 ddH₂O) 1 saat bekletildi. Daha sonra 2. yıkama solüsyonunda (%7 asetik asit ve %5 metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildikten sonra bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.6.4.5. Hidrolaz Aktivitesinin Zimogramı

Protein jel elektroforezleri C.B.S (800) 243-4959 marka elektroforezde % 10'luk jel kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. Protein denatürasyonunu engellemek için SDS ve β -merkaptoetanol kullanılmadan hazırlanan jelle ham hücre özütü yüklenerek doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Enzim ısıtılmadan direkt olarak jelle yüklendi. Her bir kuyucuğa örneklerden 50 μ g protein yüklendi.

Elektroforez sonucunda elde edilen jel ayrı ayrı hazırlanmış olan, aşağıda solüsyon içerikleri verilen SolA ve SolB ile aynı anda reaksiyona sokuldu. Koyu kahverengi ya da kırmızımsı bantlar meydana gelinceye kadar bekletildi (Bornscheuer vd., 1994).

SolA: 8 mg 1-Naphthyl acetate, 2 mL asetonda çözülür ve 18 mL 0,1 M (pH 7,5) Tris-HCl tamponuna eklenir.

SolB: 20 mg Fast RedTR salt, 20 mL 0,1 M (pH 7,5) Tris-HCl ile çözülür.

2.7. Esteraz Karakterizasyonu

2.7.1. Optimum Sıcaklık

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının en iyi çalıştığı sıcaklık değerinin ortaya çıkarılması için reaksiyonlar 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 ve 90°C'ye inkübe edildi. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

2.7.2. Optimum pH

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının aktivitesine pH'nın etkisinin araştırılması için, pH 5,0-5,5 için 50 mM asetat tamponu, pH 6,0 için 50 mM fosfat tamponu, pH 7,0-8,0-8,5-9,0 için 50 mM Tris-HCl tamponu, pH 10,0 için ise 50 mM CAPS tamponu kullanıldı. Reaksiyonlar belirlenen optimum sıcaklık değerinde gerçekleştirildi. Belirlenen optimum pH aktivite değeri daha sonra yapılacak olan çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanıldı.

2.7.3. Kinetik Parametreler

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının, yapılan ön çalışmalar sonucunda kinetik parametrelerini belirleyebilmek için , 25-1000 μ M arasındaki substrat konsantrasyonları ile bir seri reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyonlar pH'ı 8,5 olan 50 mM Tris-HCl kullanılarak 55°C de gerçekleştirildi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenlerini kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934). Michaelis-Menten grafiği çizilerek elde edilen 300 mM optimum substrat konsantrasyonu bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu olarak belirlendi.

2.7.4. pH Kararlılığı

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim, pH'sı 5,0 ve 5,5 olan 50 mM asetat tamponunda; pH'sı 6,0 olan 50 mM fosfat tamponlarında, pH'sı 7,0, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan Tris-HCl tamponlarında ve pH'sı 10,0 olan CAPS tamponunda, oda sıcaklığında 1,5 saat ve 55 °C 1 ve 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta substrat olarak pNPB kullanılarak 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi.

2.7.5. Isıl Kararlılık

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının kararlılığına sıcaklığın etkisini incelemek için, enzim solüsyonu 20, 40 ve 60 dakika 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C ve 75 °C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite, optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü. % kalan aktivite hiç inkübe edilmemiş enzim ile karşılaştırıldı.

2.7.6. Substrat Spesifikliğı

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının substrat spesifikliğini incelemek için farklı zincir uzunluğundaki pNP esterleri olan *p*-nitrofenilbütirat (4C), *p*-nitrofeniloktanat (8C), *p*-nitrofenildekonat (10C), *p*-nitrofenillaurat (12C) *p*-nitrofenilmristat (14C) ve *p*-nitrofenilpalmitat (16C) substratları varlığında 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponu içinde 20 dakikalık reaksiyon sonucunda enzim aktivitesi ölçüldü.

2.7.7. Metal İyon Etkisi

Çeşitli metal iyonlarının esteraz aktivitesi üzerindeki etkileri çalışmak için, enzim 1 gece boyunca önce 10 mM EDTA içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponuna, ardından 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) tamponuna karşı diyaliz edildi.

Aneurinibacillus sp PDF24 esterazının aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; Mg^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , ve Co^{2+} metal iyonlarının klorür tuzları bulunan ortamda enzim aktivitesinin ölçülmesi ile belirlendi. Enzim, ilave edilen 1 mM metal iyonları ile 15 dakika, 5 mM metal iyonları ile 1 saat 55°C'de inkübe edildi. İnkübasyona maruz bırakılan ve enzim içeren karışım ile *p*-nitrofenilbutirat substrat olarak kullanılarak aktivite ölçüldü. Enzimin metalsiz hali 100 kabul edilerek metal içeren ortamdaki enzimlerin % kalan aktivitesi hesaplandı.

2.7.8. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Deterjan ve organik çözücülerin *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzim, % 1 (v/v) DMSO, β - merkaptoetanol, etanol, izopropanol, 5 mM EDTA, DTT, PMSF %0,1 (v/v) SDS, Triton X-100, Tween 20 içerecek şekilde 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) tamponunda 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü. Enzimin, kimyasalları içermeyen durumdaki aktivitesi %100 kabul edilerek, kimyasalları içeren enzimin % kalan aktivitesi hesaplandı.

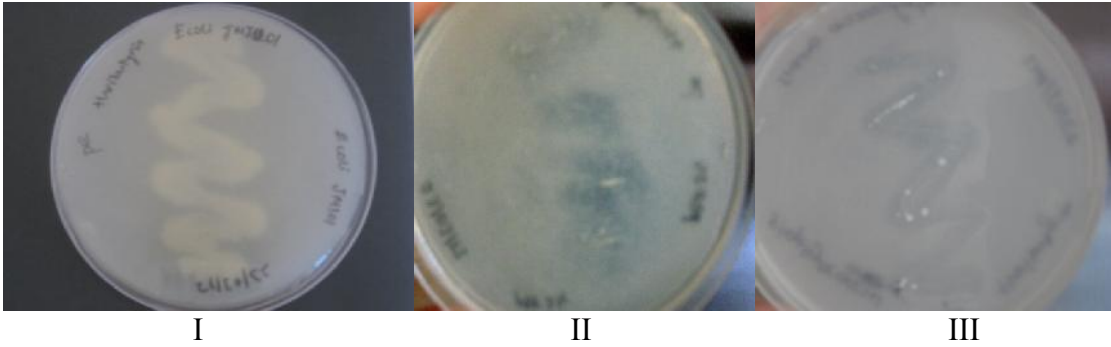
3.BULGULAR

3.1. Esteraz Aktivitesi

Aneurinibacillus sp. PDF24 esteraz aktivitesi Lee, vd. (1999)'ne göre belirlendi. 410 nm dalga boyunda pNP' ün molar absorblama katsayısı, $1,457 \times 10^5 \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ dir. 1 Ünite, hazırlanan enzim özütü ile 55 °C de PNPB' den 1 dakikada oluşan 1 µmol p-nitrofenolat miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2. Petride Esteraz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi

Aneurinibacillus sp. PDF24 suşunun esteraz aktivitesine sahip olduğu yapılan petri deneyi ile gösterildi. Deneyde kontrol olarak esteraz negatif *E.coli* JM101 suşu ve esteraz pozitif *Staphylococcus aureus* kullanıldı. 3 günlük inkübasyon süresi sonucunda *E.coli* JM101 suşunun esteraz aktivitesi göstermediği, *Staphylococcus aureus*'un ve *Aneurinibacillus* sp. PDF24'ün esteraz aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. Aktivite veren kolonilerin etrafında zon oluştuğu görülmüştür.



Şekil 4. PDF24 bakterisinin Degryse-Tribütrin agar üzerindeki esteraz aktivitesi I-*E.coli* JM101 esteraz negatif II- *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esteraz pozitif III- *Staphylococcus aureus* esteraz pozitif.

3.3. Esterazın Saflaştırılması

3.3.1. Hücre Özütü Elde Edilmesi ve Isı Şoku Uygulamaları

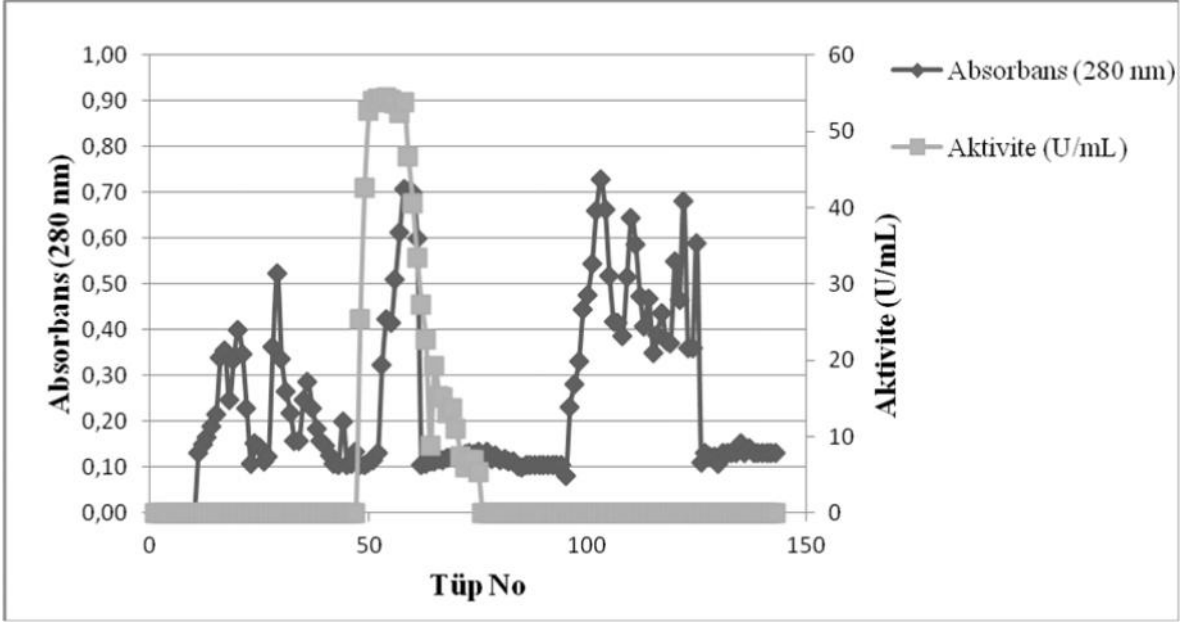
Elde edilen hücre özütünde ve bu özütün ısı şoku uygulamasından sonra elde edilen özütte protein konsantrasyon tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı.

3.3.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Isı şoku uygulamasından sonra elde edilen hücre özütü %20-80 aralığındaki amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Yapılan bu çöktürme sonucunda bütün amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çözeltilerde esteraz aktivitesi bulundu. Bu sonuçtan dolayı amonyum sülfat çöktürme basamaklarının herbirinde elde edilen enzim çözeltileri birleştirilerek çalışmaya devam edildi ve amonyum sülfat çöktürme sonucu SDS-PAGE'de yürütüldü.

3.3.3. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi

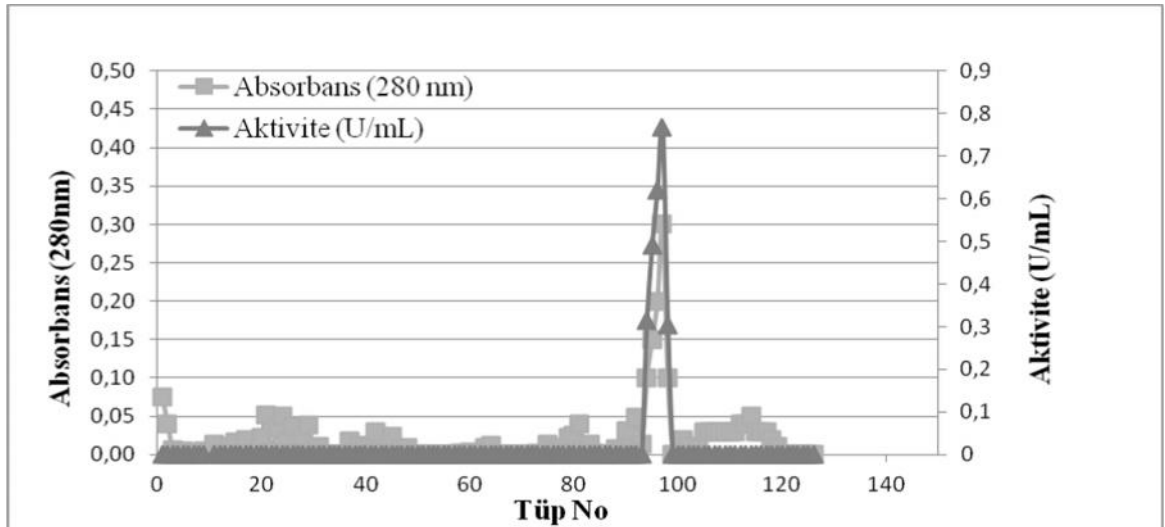
Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında elde edilen hücre özütü iyon değişimi kolon kromatografisinden geçirildikten sonra, en iyi aktivite görülen fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, kısmen saflaştırılmış özütte protein konsantrasyonu tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı (Tablo-1). Ayrıca molekül kütle tayini ve saflık kontrolü için elektroforeze tabii tutuldu ve elde edilen SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü Şekil 7'de verildi.



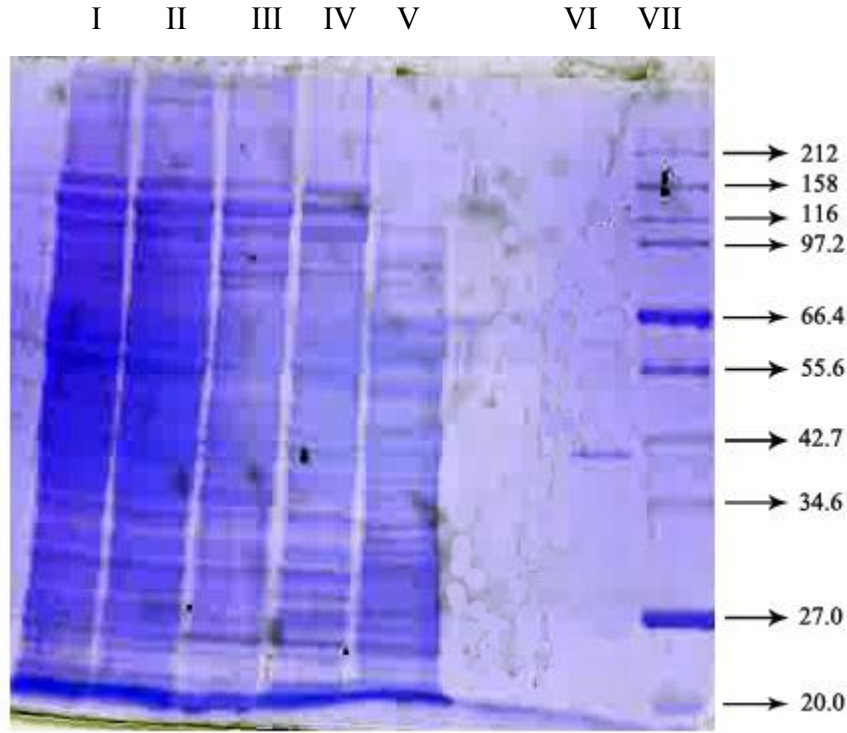
Şekil 5. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının iyon değişimi grafiği

3.3.4. Hidrofobik Etkileşim Kolon Kromatografisi ve Jel Görüntüsü

İyon değişimi kolon kromatografisi uygulamasından sonra elde edilen kısmen saflaştırılmış özüt, hidrofobik kolon kromatografisinden geçirildikten sonra, aktivite görülen fraksiyonlar SDS-PAGE’de yürütüldü ve uygun görülen fraksiyonlar birleştirildi. Fraksiyonlar birleştirildikten sonra, saflaştırılmış enzimin konsantrasyon tayini ve spesifik aktivite tayini yapıldı. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 7’de verildi.



Şekil 6. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının hidrofobik değişimi grafiği



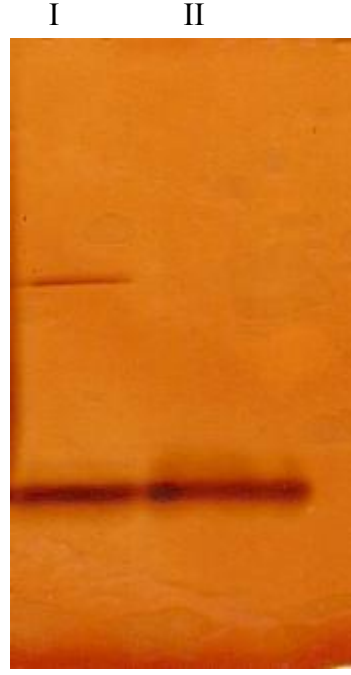
Şekil 7. Enzimin Saflığının elektroforetik olarak incelenmesi. I) Ham enzim özütü II) Isı şoku III) Amonyum sülfat çöktürmesi %60, IV) Amonyum sülfat çöktürmesi %40V), İyon değişimi kolon kromatografisi, VI)Hidrofobik, VII) Protein markır

Tablo 1. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının saflaştırılma tablosu

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	[Protein] (mg/mL)	T. protein (mg)	T. aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma katı
Hücre özütü	17	1,91	32,47	116,892	3,6	100	1
Isı bozunum	11	1,9	20,9	98,23	4,7	84,03	1,31
Amonyum sülfat çöktürmesi	5	3,7	18,5	94,35	5,1	80,72	1,42
İyon değişimi (Q-Sepharose)	4	0,93	3,72	28,644	7,7	24,50	2,14
Hidrofobik etkileşim	0,4	2,56	1,024	19,3536	18,9	16,56	5,25

3.3.5. Hidrolaz Aktivitesinin Zimogramı

Yapılan doğal poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel SolA ve SolB solüsyonları ile reaksiyona sokularak koyu kahverengimsi bantlar görüldü.

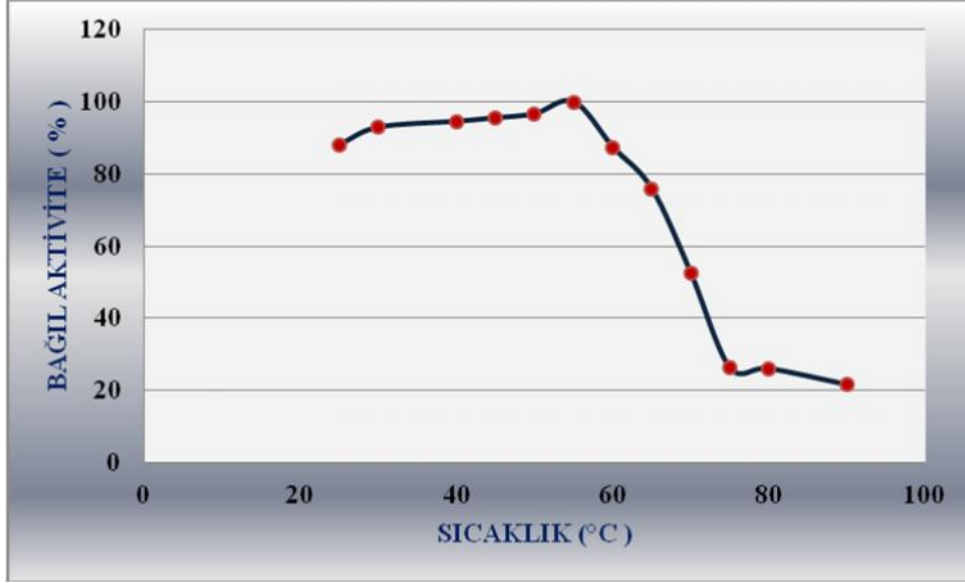


Şekil 8. Hidrolaz Aktivitesinin Zimogramı. I) Ham enzim özütü II) Karakterize edilen saf enzim

3.4. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 Esterazın Karakterizasyonu

3.4.1. Optimum Sıcaklık

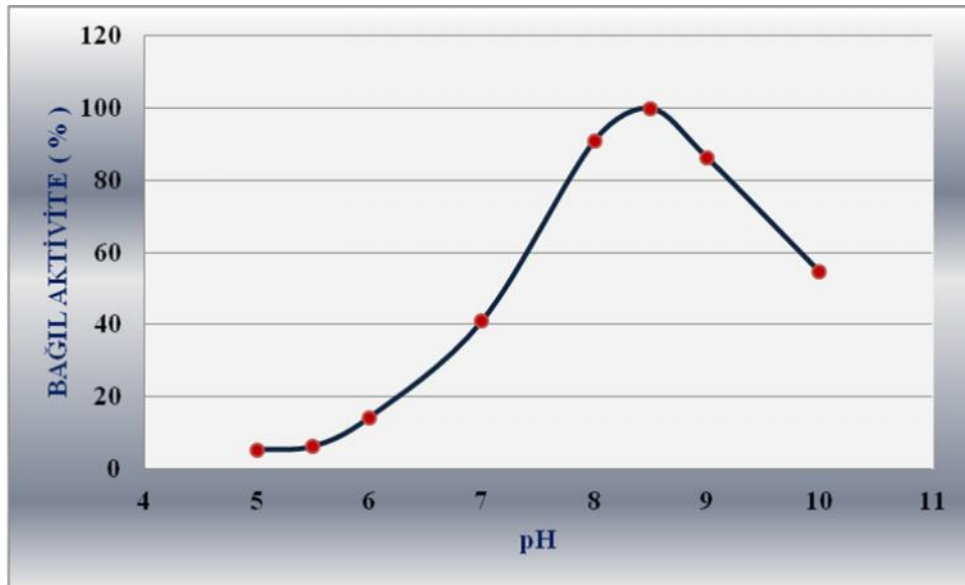
Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının optimum çalışma sıcaklığı 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 ve 90°C’de, aktivitesi ölçülerek, araştırıldı ve sıcaklık-bağıl aktivite grafiği oluşturularak enzimin optimum sıcaklığı 55°C olarak belirlendi ve sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirildi (Şekil 9).



Şekil 9. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının optimum sıcaklık grafiği

3.4.2. Optimum pH

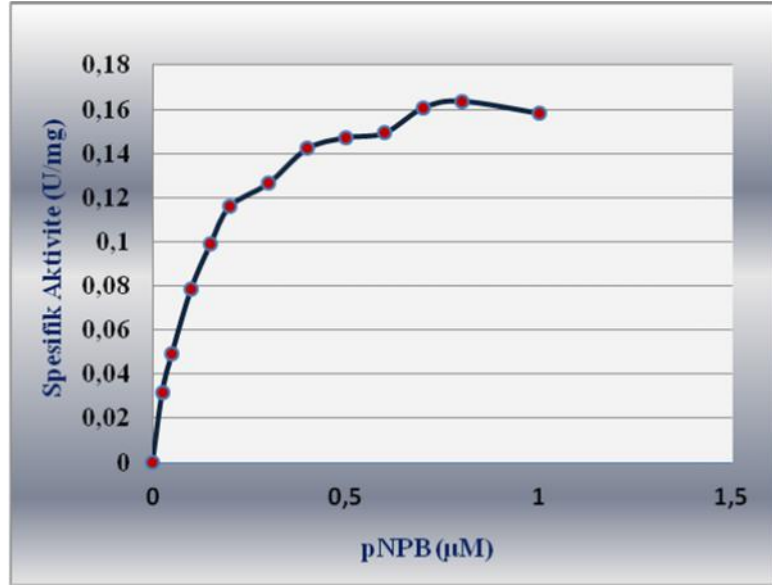
pH'nın estraz aktivitesi üzerine etkisi pH 5,0-10,0 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-bağıl aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 10'da da görüldüğü üzere esterez aktivitesi en yüksek pH 8,5'te gözlemlendi.



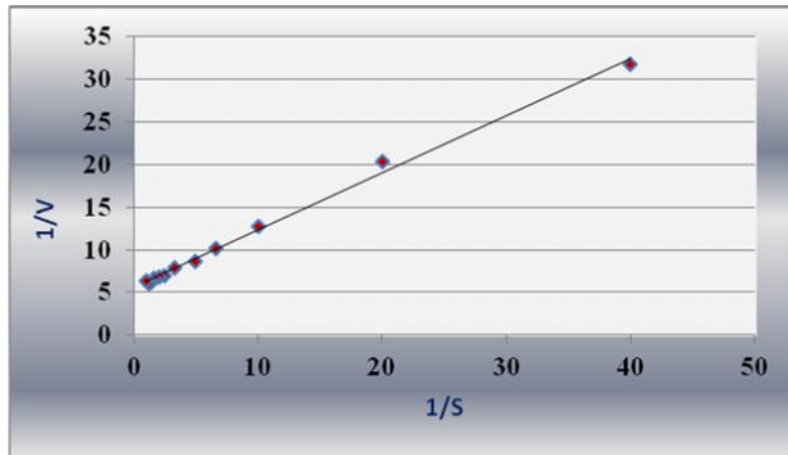
Şekil 10. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının optimum pH grafiği

3.4.3. Kinetik Parametreler

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının kinetik parametrelerinin incelenmesinde substrat olarak *p*-nitrofenilbutirat varlığında substrat konsantrasyonu-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Substrat olarak *p*-nitrofenilbutirat için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 0,120 mM, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{maks}$ 'a eşitlenerek V_{maks} değeri 3164,8 U/mg olarak hesaplandı. Sonuçlar Şekil 11 ve 12'de gösterildi.



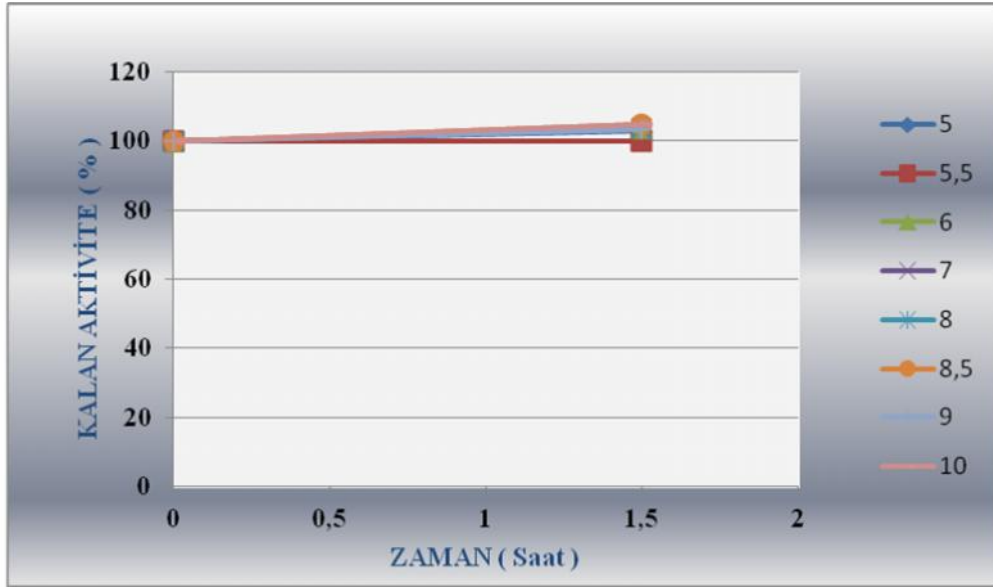
Şekil 11. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının Michaelis- Menten eğrisi



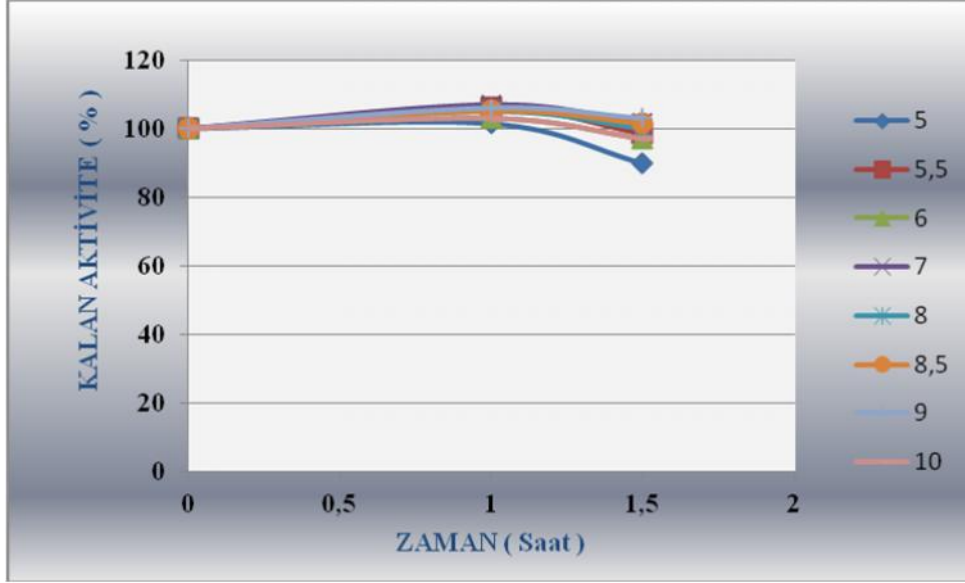
Şekil 12. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının Lineweaver-Burk eğrisi

3.4.4. pH Kararlılığı

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının pH kararlılığını belirlemek için saf enzim özütü, pH 5,0, 5,5,6,0, 7,0, 8,0, 8,5, 9,0, 10,0'da inkübe edildi ve % kalan aktiviteleri hesaplandı. Oda sıcaklığında 1,5 saat inkübasyon sonrasında enzim aktivitesinde önemli derecede bir değişiklik olmadığı belirlendi. 55 °C'de 1 saat inkübasyon sonrasında enzim aktivitesinde önemli derecede bir değişiklik olmadığı ve 55 °C'de 1,5 saat inkübasyon sonrasında ise pH 5,0'te aktivitenin %90 pH 6,0 ve 10,0 da %97 'ye düştüğü belirlendi. Bu sonuçlar Şekil 13 ve 14'te gösterildi.



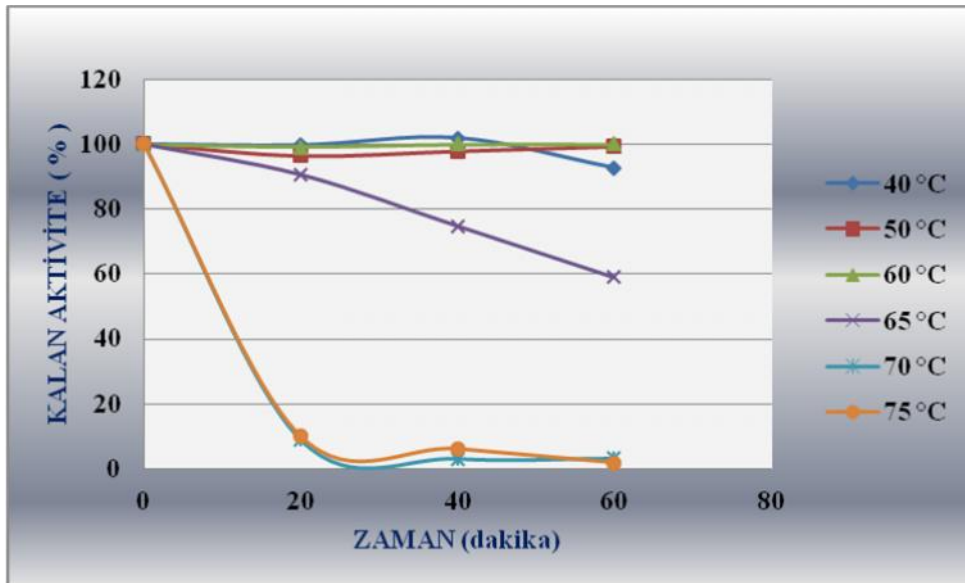
Şekil 13. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının oda sıcaklığındaki pH kararlılığı



Şekil 14. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının 55 °C'deki pH kararlığı

3.4.5. Isıl Kararlılık

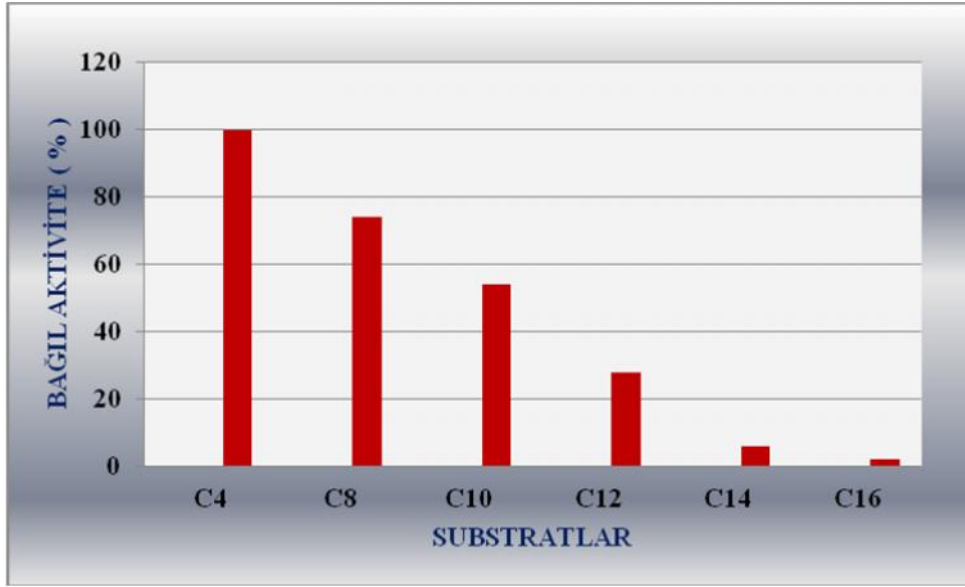
Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının kararlılığına ısının etkisini incelemek amacıyla enzim, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C ve 75 °C 'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 40 °C, 50 °C ve 60 °C'de aktivitenin azalmadığı, 65 °C'de %59, 70 °C'de %5'e ve 75 °C' de %2'ye düştüğü belirlendi. Sonuçlar Şekil 15'te gösterildi.



Şekil 15. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının ısıl kararlığı

3.4.6. Substrat Spesifikliği

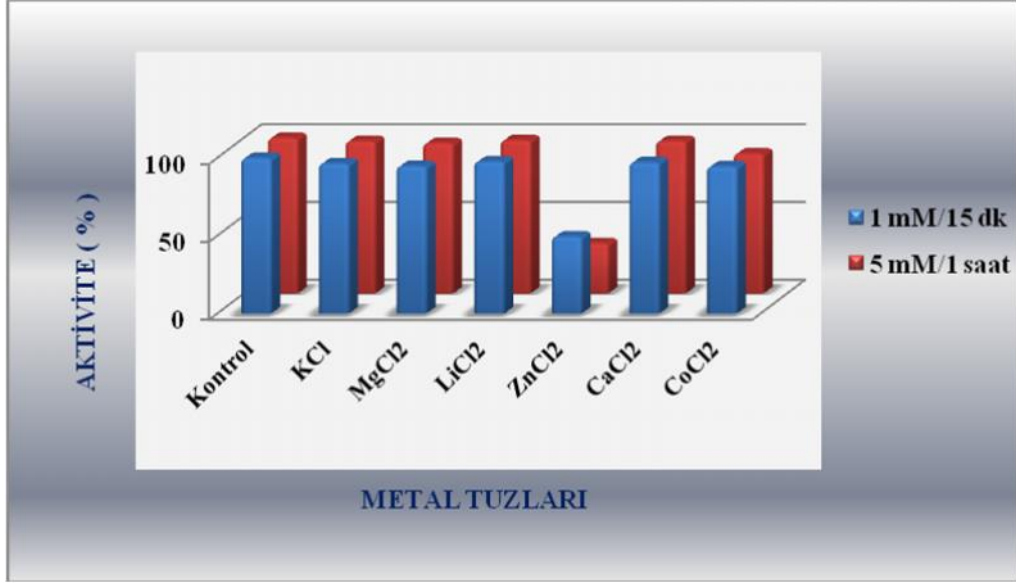
Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının substrat spesifikliği incelemek amacıyla farklı zincir uzunluğundaki *p*NP esterleri (4C, 8C, 10C, 12C, 14C, 16C) kullanıldı ve saflaştırılan enzimde, aktivite en fazla kısa zincirli *p*-nitrofenol esteri olan *p*NPB varlığında gözlemlendi. Yapılan tüm karakterizasyon işlemlerinde substrat olarak *p*NPB kullanıldı.



Şekil 16. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının substrat spesifikliği

3.4.7. Metal İyon Etkisi

Esteraz aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; $MgCl_2$, $LiCl$, $CaCl_2$, KCl , $ZnCl_2$, ve $CoCl_2$ metal tuzları ile gerçekleştirildi. 1 mM metal iyonu varlığında enzim solüsyonunun 15 dakikalık inkübasyonunda, $MgCl_2$, $LiCl$, $CaCl_2$, KCl , metal tuzlarının aktivitede önemli derecede bir değişiklik göstermediği, $ZnCl_2$ metal tuzunun aktiviteyi %50'ye, $CoCl_2$ metal tuzunun ise %95'e düşürdüğü gözlemlendi. Bu tuzların 5 mM'lık konstrasyonlarında enzim ile 1 saatlik inkübasyonunda, $MgCl_2$, $LiCl$, $CaCl_2$, KCl , metal tuzlarının aktivitede önemli derecede bir değişiklik göstermediği, $ZnCl_2$ metal tuzunun aktiviteyi iyice azaltarak %32'ye ve $CoCl_2$ metal tuzunun ise % 90'a düşürdüğü gözlemlendi.



Şekil 17. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının metal iyonlarının etkisi

3.4.8. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Deterjan ve organik çözücülerin *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzimi bu kimyasallarla muamele ettikten sonra hiç bekletmeden, ve sırasıyla 15 dakika, 30. dakika ve 60 dakika inkübasyon sonrasında % kalan aktiviteler hesaplandı.

Tablo 2. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazına İnhibitör ve Aktivatörlerin Etkisi

Enzim İnhibitörleri	Konsantrasyon	Kalan Aktivite (%)			
		0 dk	15dk	30dk	60dk
Kontrol	0	100	100	100	100
DMSO	% 1 (v/v)	102	97	95	93
Etanol	% 1 (v/v)	102	92	92	92
İzopropanol	% 1 (v/v)	101	92	92	88
β-merkaptotanol	% 1 (v/v)	104	102	101	100
EDTA	5 mM	98	95	94	92
PMSF	5 mM	50	5	11	10
DTT	5 mM	97	97	96	98
TritonX100	%0,1 (v/v)	82	67	65	70
Tween 20	%0,1 (v/v)	83	75	70	75
SDS	%0,1 (v/v)	6	4	8	7

4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Aneurinibacillus* sp. PDF24 suşunda esteraz enziminin varlığı tespit edildi ve bir seri saflaştırma metodu ile enzim saf olarak izole edildi. Saf enzimin biyokimyasal özellikleri ve bazı kinetik parametreleri incelendi. Elde edilen sonuçlar literatürdeki diğer enzimler ile karşılaştırıldı.

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazı aktivitesi, tribütrinli Degryes agarda petrisinde ve *p*-nitrofenil butirat substratı varlığında spektrofotometrik incelendi

Yüksek sıcaklıkta yaşayan termofilik bakterilerin sahip olduğu termofilik enzimler, biyoteknolojik ve endüstriyel alanlarda kullanıldığından dolayı bu bakterilere büyük bir önem kazandırmaktadır. Endüstriyel açıdan yüksek sıcaklığa dayanıklı olduğundan termofilik esterazlar daha fazla tercih edilmektedir. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının optimum çalışma sıcaklığı 55°C olarak bulunmuştur. Literatürlerde yapılan çalışmalara bakıldığında *Geobacillus thermodenitrificans* EstGtA2 esterazının optimum sıcaklığı 50°C (David M. vd. 2010), *Geobacillus* sp. Est1, Est2 ve Est3 esterazlarının optimum sıcaklıkları 65°C (Hasan C.T. vd., 2011), *Geobacillus stearothermophilus* Est55 ve Est30'un optimum sıcaklıkları sırasıyla 60 ve 70°C (Hosam E. vd., 2004), *Geobacillus thermoleovorans* YN EstA esterazının optimum sıcaklığı 60-65 °C (Nadia A. vd., 2007), *Basillus* sp. 4 esterazının optimum sıcaklığı 65 °C 'dir (B. Ateşlier vd., 2006). Dolayısıyla *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının optimum sıcaklığı, literatürdeki diğer esterazlara yakın olduğu söylenebilir.

Yapılan optimum pH çalışmaları sonucunda *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının optimum pH'sı 8,5 olarak bulunmuştur. *Geobacillus thermodenitrificans* EstGtA2 esterazının optimum pH'sı 8,0, *Geobacillus stearothermophilus* Est55'in 8,0-9,0 aralığında, Est30'un ise 9,0, *Geobacillus* sp. Est1, ve Est3'ün 9,5 Est2'nin ise 10,0'dur. Bu özelliği ile *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının alkali ortamda asidik ortamdakinden daha iyi çalıştığı ve literatürdeki diğer esterazlarla uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

Metal iyonlarının, aminoasitleri spesifik alanlardaki negatif yüklerle bağlayarak, enzim aktifliğinin ve yapısının sağlanmasında önemli rolleri vardır. *Geobacillus thermoleovorans* YN EstA esterazının aktivitesini 1 mM'lık Zn²⁺'nin %17 'ye düşürdüğü Mg²⁺'un %170'e, Ca'un %152'ye çıkardığı görülmüştür. 1 mM'lık Ca tuzunun *Geobacillus* sp. Est1 esterazının aktivitesine etkisi %110'a, Zn tuzunun %111'e, K tuzunun %101'e çıkardığı, Cu

tuzunun %88'e, Mg tuzunun %92'ye, Li tuzunun %89'a düşürdüğü görülmüştür. *Geobacillus sp.* Est2 esterazına metal iyonların etkisine bakıldığında enzimin aktivitesini 1 mM'lık Ca tuzunun %121'e, Zn tuzunun %104'e çıkardığı, K tuzunun %98'e, Cu tuzunun %81'e, Mg ve Li⁺ tuzlarının %95'e düşürdüğü görülmüş olup *Geobacillus sp.* Est3 esterazına metal iyonların etkisine bakıldığında enzimin aktivitesini Ca tuzunun %103'e, Zn tuzunun %115'e çıkardığı, K tuzunun %99'a, Cu tuzunun %83'e, Mg tuzunun %97'e ve Li tuzunun ise %93'e düşürdüğü görülmüştür. Literatürdeki bu sonuçlarla karşılaştırıldığında *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazının metal iyonlar ile etkisine bakıldığında enzimin aktivitesini 1 mM'lık K ve Ca tuzlarının %97'e, Li tuzunun %98'e, Mg tuzunun %95'e, ağır metal olarak bilinen Co²⁺ ve Zn²⁺ aktiviteyi sırasıyla %95'e ve %50 'ye düşürdüğü tespit edilmiştir. 5 mM'lık Co ve Zn tuzları aktiviteyi sırasıyla %90 ve %32'ye düşürmüştür. Co²⁺ ve Zn²⁺ gibi ağır metal iyonları, farklı koordinasyon sayılarına, yaptıkları bileşiklerde farklı koordinasyon geometrisine ve Lewis asidi potansiyeline sahip olmaları gibi nedenlerden dolayı, proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucu olarak da enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Ayna, 2011). *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazında en büyük inhibisyon protein denatürantı ve iyonik bir deterjan olan SDS kullanımında görülmüş olup, enzimin aktivitesini 1 saat sonunda %7'e düşürmüştür. Benzer şekilde, yapılan çalışmalara bakıldığında *Geobacillus sp.* Est1, Est2 ve Est3 esterazlarını da SDS'in inhibe ettiği görülmüştür. Esterazların ve lipazların çoğu merkez aktif bölgelerinde bir serin aminoasiti içermektedir (Fojan vd., 2000). *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazına bir serin inhibitörü olan PMSF'nin etkisi enzimin aktivitesini 1 saat sonunda %10'a düşürmek olduğu görülmüştür. Literatürler incelendiğinde PMSF, *Geobacillus stearothermophilus* Est55 ve Est30 esterazlarının aktivitesini %0'a, *Geobacillus sp.* Est1, Est2 ve Est3 esterazlarının aktivitelerini ise sırasıyla %45, %58 ve %55'e düşürdüğü görülmüştür. *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazının aktivitesinin organik çözücü olan etanol, polar çözücü olan DMSO, metal iyonları tutan EDTA, SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan DTT ve disülfür köprüsü indirgeyicisi olan β-merkaptetanol varlığında stabil kaldığı görülmüştür. Metal şelatlayıcı olan EDTA'nın enzimi inhibe etmediği anlaşılmıştır. DMSO, EDTA ve DTT *Geobacillus sp.* Est1, Est2 ve Est3 esterazlarının aktivitelerini yükselttiği saptanmıştır. Diğer bir organik çözücü olan izopropanolün aktiviteyi %88'e, TritonX100 ve Tween20 gibi anyonik deterjanlar ise sırasıyla %70 ve

%75'e düşürdüğü saptanmıştır. TritonX100 ve Tween20'nin *Geobacillus sp.* Est1, Est2 ve Est3 esterazlarının aktivitelerini de düşürdüğü saptanmıştır.

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının ısı kararlılığı çalışmaları sonucunda 65°C'de 1saatte aktiviteyi %42, 70°C'te %95 ve 75°C'te ise %98 oranında kaybettiği görülmüştür. Literatürler incelendiğinde, *Geobacillus sp.* Est1, Est2 ve Est3 esterazlarının 55-65°C'de 1 saatte aktivitesinin %90'ını koruduğu, *Geobacillus thermodenitrificans* EstGtA2 esterazının ise 55-60°C aktivitenin %90'ını koruduğu, bununla birlikte, ilgili aktivitenin sadece % 15'i 75°C gözlemlenirken, aktivitedeki azalma 65°C (% 83 kalan) gözlemlendi.

Bacillus sp. 4 esterazının oda sıcaklığında pH kararlılığına bakıldığında pH 5,0, 5,5 ve 6,5'te aktiviteleri sırasıyla %83, %98 ve %69 olarak bulunmuş, pH 7,5'te ise aktivitenin %15'e düştüğü görülmüştür (B. Ateşlier vd., 2006). Literatürdeki bu değerler ile karşılaştırıldığında *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazın pH kararlılığında önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür. *Geobacillus thermodenitrificans* EstGtA2 50°C'de pH kararlılığına bakıldığında aktivitenin pH 6,0'da % 62 ve pH 11,0'de % 36 olduğu görülmüştür. *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazın 55°C'deki pH kararlılığına bakıldığında pH 5,0'te aktivitenin %90'a, pH 6 ve 10 da ise %97 'ye düştüğü görülmüştür. Bu durumda *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazın pH kararlılığı diğer esterazlarla göre daha iyi olduğu anlaşılmıştır.

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının substrat spesifikliğine bakıldığında en iyi aktiviteyi 4 karbonlu olan *p*NPB (4C) substratı ile verdiği görülmüştür. Bu da *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazının kısa zincirli esterlerin hidrolizini katalizleyen bir esteraz olabileceğini göstermektedir. Literatürdeki esterazlara bakıldığında *Bacillus sp.*4 (B. Ateşlier vd., 2006) *p*NPB (4C) ile, *Geobacillus sp.* Est1, Est2 ve Est3 esterazlarının *p*NPA (2C) ile, *Geobacillus stearothermophilus* Est55'in *p*NPB (4C), Est30'un ise *p*NPC (6C) ile en iyi aktiviteyi verdiği görülmüştür.

Endüstriyel alanda birçok enzimin K_m değerinin 0,01 mM ile 100 mM arasında olduğu bildirilmiştir (Fullbrook, 1996). *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazının *p*-nitrofenil butirat substrat olarak kullanıldığında K_m 'si 0,120 mM olarak bulunmuştur. *Geobacillus sp.* Est1 esterazının K_m 'si 0.095 mM, *Geobacillus sp.* Est2 esterazının K_m 'si 0.24 mM, *Geobacillus sp.* Est3 esterazının K_m 'si 0.17 mM, *Bacillus circulans* esterazının K_m 'si 0,24 mM (Kademi, vd., 2000) literatürdeki bu değerlere bakılarak *Aneurinibacillus sp.* PDF24 esterazının literatürdeki diğer esterazlara göre iyi bir K_m değerine sahip olduğu belirlendi. Endüstriyel açıdan bakıldığında da iyi bir K_m değerine sahip olduğu söylenebilir.

Yürütölen SDS-PAGE'te saflaştırılmış enzimin yanındaki protein markırı baz alınarak *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının denatüre haldeki moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 40 kDa olarak belirlenmiştir. Literatürler incelendiğinde *Geobacillus thermodenitrificans* EstGtA2 moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 30 kDa, *Bacillus* sp.4 esterazının (B. Ateşlier vd., 2006) moleküler ağırlığı ise yaklaşık 81.9 kDa olarak bulunmuştur. Literatürdeki *Bacillus* akrabalarına bakıldığında genellikle monomerik yapıda olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara bakılarak *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazında monomerik yapıda olabileceği düşünölmektedir. Ancak bunun doğruluğunu tespit etmek için jel filtrasyon kromatografisi yapılması gerekmektedir.

5.SONUÇ

Bu çalışma ile *Aneurinibacillus* sp. PDF24 suşundan termofilik karakterli bir esteraz saflaştırıldı ve karakterize edildi.

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının optimum pH değerinin 8,5 optimum çalışma sıcaklığının ise 55°C olduğu tespit edildi. Enzimin substratı olarak paranitrofenil butirat ile ilgili kinetik parametreleri incelendi ve bu substrat için K_m değeri 0,120 mM ve V_{maks} değeri 3164,8 U/mg olarak belirlendi.

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının pH kararlılığına oda sıcaklığında ve 55°C'de incelendi. Oda sıcaklığında 1,5 saat ve 55°C 1 saat inkübasyon sonrasında enzimin aktivitesinde önemli bir değişiklik olmadığı, 55°C 1,5 saat inkübasyon sonrasında ise enzimin aktivitesinin pH 5,0'te %90'a, pH 6,0 da ve pH 10,0 da %97 'ye düştüğü belirlendi.

Aneurinibacillus sp. PDF24 esterazının ısıl kararlılığına bakıldı. Enzimin 1 saat belirtilen sıcaklıklarda bekletilmesinin ardından gerekli aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Yapılan ölçümler sonucunda enzimin aktivitesinin 40 °C, 50 °C ve 60 °C'de azalmadığı, 65 °C'de %59, 70 °C'de %5'e ve 75 °C' de %2'ye düştüğü belirlendi.

Mg^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , ve Co^{2+} metal iyonlarının klorür tuzları ile metal iyon etkisine bakıldı. $MgCl_2$, $LiCl$, $CaCl_2$, KCl metal tuzlarının 1 mM'lık konsantrasyonlarda 15 dakikalık inkübasyonla aktivitede önemli bir değişiklik olmadığı, $ZnCl_2$ metal tuzunun aktiviteyi %50'ye, $CoCl_2$ metal tuzunun ise %95'e düşürdüğü gözlemlendi. Bu tuzların 5 mM'lık konsantrasyonlarda enzimle 1 saatlik inkübasyonunda, $ZnCl_2$ metal tuzunun aktiviteyi iyice azaltarak %32'ye ve $CoCl_2$ metal tuzunun ise % 90'a düşürdüğü, $MgCl_2$, $LiCl$, $CaCl_2$, KCl metal tuzlarının ise enzimin aktivitesinde bir değişiklik yapmadığı gözlemlendi.

Deterjan ve organik çözücülerin *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının aktivitesi üzerine etkileri incelendi. *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının aktivitesini, bir serin inhibitörü olan PMSF'nin %10'a düşürdüğü, TritonX100'ün %70'e, Tween20'nin ise %75'e düşürdüğü ve SDS'nin ise aktiviteyi aşırı bir şekilde düşürdüğü, disülfid bağlarını indirgeyici bir kimyasal olan β -merkaptotanol, önemli bir polar çözücü olan DMSO, etanol ve EDTA varlığında aktivitenin stabil kaldığı, izopropanol gibi organik çözücüde, aktivitenin %88'e düştüğü belirlenmiştir.

Yapılan SDS-PAGE sonucuna göre *Aneurinibacillus* sp. PDF24 esterazının denatüre haldeki moleküler ağırlığının SDS-PAGE sonucuna göre yaklaşık 40 kDa olduğu belirlenmiştir.

6. ÖNERİLER

Termofilik bakterilerden elde edilen esterazların, endüstride çok daha önemli bir rol oynayacağına dair beklentiler bulunmaktadır. Bu nedenle yüksek sıcaklığa, yüksek pH'a ve kimyasal denatürasyona dayanıklı yeni enzimlerin elde edilmesine ihtiyaç vardır. Yapılan bu çalışmada elde edilen ve karakterizasyonu yapılan enzimin çalışma pH'sı ve sıcaklığı dikkate alındığında, enzimin endüstride kullanılacak bir enzim olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan bu çalışmaya ilave olarak farklı substratlar ile K_m ve V_{maks} değerlerini belirleyerek karakterizasyon özelliklerinin daha ayrıntılı bir biçimde yapılabileceği düşünülmektedir.

Aneurinibacillus sp. PDF24'ten elde edilen esterazın daha kısa zamanda ekspres edilebilmesi için literatürdeki klonlanmış esteraz genleri baz alınarak primer dizayn edilerek, pET-28a+ gibi bir ekspresyon vektörüne klonlanılabilir.

Endüstriye daha yararlı bir enzim haline getirilebilmek için ısıl kararlılığını artıracak çeşitli mutasyon çalışmaları yapılabilir.

Aneurinibacillus sp. PDF24'ten elde edilen esterazın kaç alt birime sahip olduğunu belirlemek için jel filtrasyon kromatografisi yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Annenkov, G. A., Klepikov, N. N., Martynova, L. P. ve Puzanov, V. A., 2004. Wide Range of The Use of Natural Lipases and Esterases to Inhibit *Mycobacterium tuberculosis*., Probl. Tuberk Bolezn Legk., 52–56.
- Arpigny, J. ve Jaeger, K., 1999. Bacterial Lipolytic Enzymes Classification and Properties, Biochemical Journal, 343, 177-183.
- Arzoglou, P. L. ve Konstantinidou, A., 1989. Evidence for Multiple Lipase Forms in the Rabbit Pancreas, Clin Physiol Biochem., 7, 5, 249-254
- Ay-Şal, F., 2010. *Anoxybacillus* sp. PDF1 Lipaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ayna, Ç., 2011. Termofilik *Geobacillus* sp. TF17 suşundan Esteraz Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bakır Ateslier, Z. 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.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C. ve Verger, R., 2000. Methods for Lipase Detection and Assay A Critical Review, European Journal of Lipid Science and Technology, 133-153.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sausa, J. M., Villa, T. G. ve Barros-Velazquez, J., 2000. Characterization of Biogenic Amine-Producing *Stenotrophomonas maltophilia* Strains From White Muscle of Fresh and Frozen *Albacore tuna*, International Journal of Food Microbiology, 57, 19-31.
- Benjamin, S. ve Pandey, A., 1998. *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility In Biotechnology. Yeast, 14:1069–1087.
- Berrobi, C., Manoussos, G. ve Oreal, S. A. 1970. Cosmetic, Pharmaceutical Preparations Containing Lipase, Hyaluronidase and/or Thiomucase Enzymes, West Germany Patent, 1,947,896.
- Bornscheuer, U., Reif, O. W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kolisis., F.N. ve Menge, U., 1994. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization, Biochim Biophys Acta., 1201, 1, 55-60.

- Bornscheuer, U. T. ve Kazlauskas, R. J., 1999. Hydrolayses In Organic Synthesis Regio and Stereoselective Biotransformations, Wiley Vch, Weinheim, 105 p.
- Bornscheuer, U.T., editor, 2000 Enzymes In Lipid Modification Weinheim: Wiley-VCH.
- Charbonneau¹, D. M., Meddeb- Mouelhi¹, F. ve Beauregard, M., 2010. A Novel Thermostable Carboxylesterase From *Geobacillus thermodenitrificans*: Evidence For A New Carboxylesterase Family, J., Biochem., 148, 3, 299–308.
- Dati, F. ve Grenner, G., 1984. A New Approach to the Diagnosis of Pancreatic Diseases by Immunochemical Lipase Quantitation, Ric Clin Lab, 14, 3, 399–407.
- Degrassi, G., Uotila, L., Klima, R. ve Venturi, V., 1999. Purification and Properties of an Esterase From the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Identification of the Encoding Gene, Applied Environmental Microbiology, 65, 3470-3472.
- Desnuelle, P., 1972. The Lipases: The Enzymes, 37. New York, Academic Press, 575.
- Ewisa, H. E., Abdelal, A. T., ve Lu, C. D., 2004. Molecular Cloning and Characterization of Two Thermostable Carboxyl Esterases From *Geobacillus stearothermophilus*, Gene, 329, 187–195.
- Faiz, Ö., 2005. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gönensis* A4, Hücre dışı Lipaz /Esteraz Yeteneğinin İncelenmesi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- 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, Biochimic., 82, 1033-1041.
- Fullbrook, P. D., Practical Applied Kinetics. Godfrey, T. 1996. West, S. Industrial Enzymology, Second Edition, Stockholm Pres, New York.
- Gandhi, N. N., 1997. Applications of Lipases, Journal of American Oil Chemists Society, 74, 6, 621-634.
- Gerhartz, W., 1990. Industrial uses of enzymes. Enzymes in industry production and application. Weinheim, Germany, 77–148.
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P. ve Davidson, S., 1996. Microbial Lipases Production and Applications, Science Progress, 79, 2, 119-157.
- Greene, A. C., Patel, B. K. C. ve Sheehy, A. J., 1997. *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Manganese- and Iron-reducing Bacterium Isolated from a Petroleum Reservoir, Int. J. Syst. Bacteriol, 47, 505–509.

- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N. ve Bradoo, S., 2003. Lipase Assay for Conventional and Molecular Screening: an Overview, Biotechnology and Applied Biochemistry, 37, 63-71.
- Hasan, F., Shah, A. A. ve Hameed, A., 2006. Industrial Applications of Microbial Lipases, Enzyme and Microbial Technology, 39, 235-251.
- Hemilä, 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.
- Hong, K. H., Jang, W. H., Choi, K. D. ve Yoo, O. J., 1991. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Carboxylesterase: Cloning and Expression of The Esterase Gene In *Escherichia coli*, Agric. Biol. Chem. 55, 2839-2845.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. ve Pace, N. R., 1998. Novel Division Level Bacterial Diversity In a Yellowstone Hot Spring, Journal of Bacteriology, 180, 366–376.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., ve Hatada, Y., 1998. Alkaline Detergent Enzymes From Alkaliphiles: Enzymatic Properties, Genetics and Structures, Extremophiles 2, 185–90.
- İnan, K., 2011. İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıcalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazının Karakterizasyonu Doktora Tezi, K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jaeger, K. E. ve Eggert, T., 2002. Lipases for Biotechnology, Current Opinion in Biotechnology, 13, 390-397.
- Jaeger, K. E. ve Reetz, M. T., 1998. Microbial Lipases Form Versatile Tools for Biotechnology, Tibtech, 16, 396-403.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M. ve Misset, O., 1994. Bacterial Lipases, Fems Microbiology Rev., 15, 29-63.
- Jette, J. F. ve Ziomek, E., 1994. Determination of Lipase Activity by a Rhodamine–Triglyceride–Agarose Assay, Anal Biochem., 219, 256–260.
- Kademi, A., Aıt-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. ve Baratti, J. C., 2000. Characterization of A New Thermostable Esterase From The Moderate Thermophilic Bacterium *Bacillus circulans*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 10, 4, 395–401.
- Kato, K., Nakamura, S., Sakugi, T., Kitai, K., Yone, K., Suzuki, J. ve Ichikawa, Y., 1989. Tumor Necrosis Factor and Its Activators For The Treatment of Malignant Tumors, Japanese Patent 1,186,820.

- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Choe, S., Yoo, O. J. ve Suh, S. W. 1997. Crystal Structure of Carboxylesterase From *Pseudomonas fluorescens*, an alpha/beta Hydrolase With Broad Substrate Specificity, Structure 15, 12, 1571-1584.
- Kouker, L. ve Jaeger, K., 1986. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases, Applied and Environmental Microbiology, 211-213.
- Lanz, W. W. ve Williams, P. P., 1973. Characterization of Esterases Produced by a Ruminant Bacterium Identified as *Butyrivibrio Fibrisolvans*, Journal of Bacteriology, 113, 1170-1176.
- Lawrence, R. C., Frayer, T. F. ve Reiter, B., 1967. Rapid Method for the Quantitative Estimation of Microbial Lipases, Nature, 213, 1264-1265.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Kim, B., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. T. ve Pyun, Y., 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, FEMS Microbiol. Lett., 179, 393-400.
- Liu, P., Wang, Y. F., Ewis, H. E., Abdelal, A. T., Lu, C. D., Harrison, R. W. ve Weber, I. T., 2004. Covalent Reaction Intermediate Revealed in Crystal Structure of the *Geobacillus stearothermophilus* Carboxylesterase Est30, Journal of Molecular Biology, 342, 2, 551-561.
- Lott, J. A. ve Lu, C. J., 1991. Lipase Isoforms and Amylase Isoenzymes Assays and Application In The Diagnosis of Acute Pancreatitis, Clin Chem, 37, 361-368.
- Marteinsson, V. T, Hauksdottir. S., Hobel, C. F. V., Kristmannsdottir, H., Hreggvidsson, G. O.ve Kristjansson, J.K., 2001. Phylogenetic Diversity Analysis of Subterranean Hot Springs in Iceland, Appl. Env. Microbiol., 67, 9, 4242-4248.
- Martinelle, M., Holmquist, M. ve Hult, K., 1995. On the Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase A and B as Compared with *Humicola lanuginosa* Lipase, Biochimica et Biophysica Acta, 272-276.
- Matsumae, H., Furui, M. ve Shibatani, T., 1993. Lipase Catalysed Asymmetric Hydrolysis Of 3-phenylglycidic Acid Ester, The Key Intermediate In The Synthesis of Ditiagem Hydrochloride, J Ferment Bioeng, 75,93-98.
- Mauvernay, R. Y., Labreur, P. ve Labrousse, M., 1970. Composition and Its Products, United States Patent 3,513,073.
- Miquel, P., 1888, Monographie d'un Bacille Vvant Au-Dela de 70°C, Ann Micrographic, 1, 3.
- Misawa, E., Chion, C. K., Archer, I. V., Woodland, M. P., Zhou, N. Y., Carter, S. F., Widdowson, D. A. ve Leak, D. J., 1998. Characterisation of a Catabolic

- Epoxide Hydrolase From a *Corynebacterium* sp., Eur. J. Biochem. 253, 173-183.
- Munoz, A. ve Katerndahl, D. A., 2000. Diagnosis and Management of Acute Pancreatitis, Am Fam Physician, 62, 164–174.
- Negre-Salvayre, A., Dagan, A., Gatt, S. ve Salvayre, R., 1991. New Fluorescent Pyrenecointaining Substrates for Assaying Cellular Lipases, Cholesterol Esterases and Carboxyl Esterases, Applied Fluorescens Technology, 3, 1-6.
- Noureddini, H., Gao, X. ve Philkana, R.S., 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase For Biodiesel Fuel Production From Soybean Oil, Bioresour. Technol., 96, 769-777.
- Ollis, D. L., 1992. The K/L Hydrolase Fold. Protein Eng. 5, 197-211.
- Palekar, A. A., Vasudevan, P. T. ve Yan, S., 2000. Purification of Lipase: A review, Biocatal Biotransform 18,177–200.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. ve Soccol, UT., 1999. The Realm of Microbial Lipases In Biotechnology, Biotechnol Appl Biochem 29,119–131.
- Pedersen, K., 2000. Exploration of Deep Intraterrestrial Microbial Life: Current Perspectives, FEMS Microbiol. Lett., 185, 9–16.
- Pezzilli, R., Talamini, G. ve Gullo, L., 2000. Behaviour of Serum Pancreatic Enzymes In Chronic Pancreatitis, Dig Liver Dis, 32, 3, 233–237.
- Pohlenz, H. D., Boidol, W., Schuttke, I. ve Streber, W. R. 1992. Purification and Properties of an *Arthrobacter Oxydans* P52 carbamate Hydrolase Specific For The Herbicide Phenmedipham and Nucleotide Sequence of The Corresponding Gene, J. Bacteriol. 174, 6600-6607.
- Rollof, J., Hendström, S.A. ve Nilsson-Ehle, P. 1984. A simple Turbidimetric Method for Specific Measurement of *Staphylococcus aureus* Lipase Activity, Acta path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B, 92, 155-158.
- Ruiz, L. ve Rodriguez-Fernandez, M. F. C., 1982. Kinetic Study of Hepatic Triglyceride Lipase From Rat Liver Soluble Fraction, Enzyme, 27, 215-219.
- Schmid, R.D. ve Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, Angewandte Chemie-International Edition, 37, 1608-1633.
- Seitz, E.W., 1974 Industrial Applications of Microbial Lipases-A Review, Journal of American Oil Chemists Society, 51,12–16.

- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L. ve Gupta, J., 2001. Purification and Characterisation of a Thermostable Alkaline Lipase From a New Thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1, Process Biochemistry, 37, 1075-1084.
- Shida, Y. K., Takagi, H., Kadowaki, K. ve Komagata, K. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen nov. and *Aneurinibacillus* gen. Nov, Int. J. Syst. Bacteriology, 46, 939-946.
- Staubmann, R., Ncube, I, Gubitz, G. M., Steiner, W. ve Read, J. S., 1999. Esterase and Lipase Activity in *Jatropha curcas* L. Seeds, Journal of Biotechnology, 75, 117-126.
- Takami, H., Inoue, A. , Fuji, F. ve Horikoshi, K., 1997. Microbial Flora in The Deepest Sea Mud of The Mariana Trench, FEMS Microbiol. Lett., 152, 279–285.
- Tekedar, H. C. ve Şanlı-Mohamed, G., 2011. Molecular Cloning, Over Expression and Characterization of Thermoalkalophilic Esterases Isolated From *Geobacillus* sp., Extremophiles, 15, 203–211.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji (Telefoncu, A. Ed.) pp.1.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu. Kuşadası, Aydın-Türkiye, 446 s.
- Thomson, C.A., Delaquis, P. J. ve Mazza, G., 1999. Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity: A Review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39 ,2, 165-187.
- Thuren, T., Virtanen, J. A., Verger, R. ve Kinnunen, P. J. K., 1987. Hydrolysis of 1 palmitoyl 2 [6-pyren-1-yl]hexanoyl-*sn*-glycero-3-phospholipids by phospholipase A2 Effect of the Polar Head-group, Biochimica et Biophysica Acta, 917, 411-417.
- Trent, D.J., 2000. Extremophiles in Astrobiology: Per Ardua ad Astra, Gravitational and Space Biology Bulletin, 13, 2, 5-11.
- Undurraga, D., Markovits, A. ve Erazo, S., 2001. Cocoa Butter Equivalent through Enzymic Interesterification of Palm Oil Midfraction, Process Biochem, 36,933–939.
- Upton, C. ve Buckley, J. T., 1995. A New Family of Lipolytic Enzymes, Trends Biochem. Sci. 20, 178-179
- URL-1, http://www.vetmed.wsu.edu/courses/vm546/content/links/Clinical_Pathology/Lab_Tests/PLI.htm. 12 Mayıs 2012.
- URL-2, <http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/introduction.html>. 14 Nisan 2012

- Verger, R., 1997. Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts, Trends in Biotechnology, 15, 32-38.
- Verschueren, K. H., Seljee, F., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H. ve Dijkstra, B. W., 1993. Crystallographic Analysis of The Catalytic Mechanism of Haloalkane Dehalogenase, Nature, 363, 693-698.
- Ville, E., Carriere, F., Renou, C. ve Laugier, R., 2002. Physiological Study of pH Stability and Sensitivity to Pepsin of Human Gastric Lipase, Digestion, 65; 73–81.
- Winkler, U. K. ve Stuckmann, M., 1979. Glycogen, Hyaluronate and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*, Journal of Bacteriology, 138, 663-670.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition. Chapter 3., The Application of Enzymes in Industry, 274-373.
- Wong, C.-H. and Whitesides, G.M. 1994 Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. Pergamon Press, Oxford.
- Zock, J., Cantwell, C., Swartling, J., Hodges, R., Pohl, T., Sutton, K., Rosteck, Jr., P., McGilvray, D. ve Queener, S., 1994. The Bacillus subtilis pnbA Gene Encoding p-nitrobenzyl Esterase: Cloning, Sequence and High-level Expression In Escherichia coli., Gene 30; 151, 37-43.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Trabzon 100. Yıl İlköğretim Okulunda, Orta öğrenimini Trabzon Cumhuriyet İlköğretim Okulunda ve Lise öğrenimini Trabzon Lisesinde tamamladıktan sonra 2004-2005 öğretim yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 2008 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Trabzon K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen bu bölümde yüksek lisans eğitimine devam etmekte olup, iyi derecede ingilizce bilmektedir.