

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ZEYTİNYAĞI KATI ATIĞINDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus sp* L1S LİPAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin KÖKSAL

EKİM 2016

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ZEYTİNYAĞI KATI ATIĞINDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus sp* L1S LİPAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yasemin KÖKSAL

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

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09 / 09 /2016

Tezin Savunma Tarihi : 12 / 10 /2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Trabzon 2016

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalında
Yasemin KÖKSAL Tarafından Hazırlanan

ZEYTİNYAĞI KATI ATIĞINDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus sp* LİS LİPAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

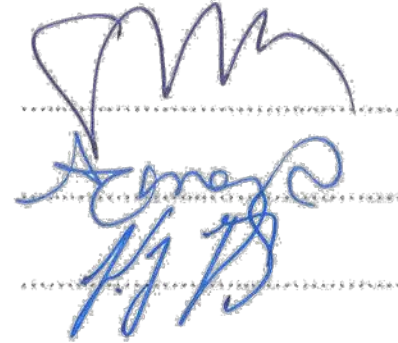
başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 23 / 08 / 2016 gün ve 1666 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Zeytinyağı Katı Atığından İzole Edilen *Bacillus Sp* L1S Lipazın Saflaştırılması ve 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 danışman hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya, laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden her daim yararlandığım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ' e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Yrd. Doç. Dr. Dilşat Nigar ÇOLAK 'a, Arş. Gör. Fulya AY ŞAL' a, Miray ŞAHİNKAYA' ya, Merve BEKTAŞ ve Murat KAÇAĞAN' a ve tüm K.T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarının tüm çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her alanında maddi ve manevi destek veren beni bugünlere getiren değerli babam Haydar KÖKSAL' a, annem Fatma KÖKSAL' a minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca ablam Elif KÖKSAL' a, abim Adem KÖKSAL ve kardeşim Ayşegül KÖKSAL' a, desteğini benden esirgemeyen abim Ali KÖKSAL' a ve tüm aile fertlerime teşekkür ederim.

Bu zorlu sürecin her anında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen değerli dostlarım Büşra Sena AKÇAY, Emine AYDIN, Fidan ULUSOY ve Öykü HOCAOĞLU' a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yasemin KÖKSAL

Haziran, 2016

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Zeytinyağı Katı Atığından İzole Edilen *Bacillus Sp* L1S Lipazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” başlıklı çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. 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 kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.12/10/2016

Yasemin KÖKSAL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÖZET.....	IX
SUMMARY	XI
TABLOLAR DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Zeytinyağı Katı Atığı.....	2
1.3. Enzimler.....	3
1.4. Lipazlar.....	4
1.4.1. Lipazların Arayüzey Aktivasyonu.....	10
1.4.2. Lipazların Sınıflandırılması	11
1.4.2.1. 1,3- Spesifik Lipazlar.....	11
1.4.2.2. Spesifik Olmayan Lipazlar.....	12
1.4.2.3. Yağ Asidi Spesifik Lipazlar.....	12
1.5. Bakteriyel Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması.....	13
1.6. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar.....	15
1.6.1. Hidroliz.....	15
1.6.2. Esterifikasyon.....	15
1.6.3. Ester Değişimi.....	16
1.6.4. Doğal Olmayan Substratların Katalizi.....	16
1.7. Bakterilerde Lipaz/Esteraz Aktivite Tespit Yöntemleri	17
1.7.1. Kalitatif Analiz.....	17
1.7.2. Titrimetri	18
1.7.3. Spektrofotometrik Analiz	19
1.7.4. Florimetrik Analiz	19
1.7.5. Kromatografik Prosedür	20

1.7.6.	İmmunolojik Metodlar	20
1.8.	Lipaz Üretimi	20
1.9.	Lipazların Saflaştırılması.....	21
1.10.	Lipazın Endüstriyel Kullanım Alanları.....	22
1.10.1.	Gıda Endüstrisinde Lipazlar.....	23
1.10.2.	Deterjan Endüstrisinde Lipazlar.....	23
1.10.3.	Deri Endüstrisinde Lipazlar.....	24
1.10.4.	Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisinde Lipazlar.....	24
1.10.5.	Biyodizel Üretiminde Lipazlar.....	24
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	26
2.1.	Kullanılan Kimyasallar.....	26
2.2.	Mikroorganizma Seçimi.....	26
2.2.1.	Mikroorganizma ve Kültür Koşulları.....	26
2.2.2.	Lipaz Aktivitesi Olan Mikroorganizmaların Seçimi	27
2.2.2.1.	Lipaz Varlığının Petride Belirlenmesi	27
2.2.2.2.	Seçilen Mikroorganizmalara Substratlarla Muamelesi	27
2.3.	Moleküler Çalışmalar.....	28
2.3.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	28
2.3.2.	16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Arttırılması.....	29
2.4.	Biyokimyasal Çalışmalar.....	30
2.4.1.	Lipazın Ekstrasyonu.....	30
2.4.2.	Lipaz Aktivitesinin Araştırılması.....	30
2.4.3.	Lipaz Varlığının SDS PAGE ile Teyit Edilmesi.....	30
2.4.4.	Lipaz Aktivitesinin SDS PAGE İle Teyit Edilmesi.....	31
2.5.	Lipazın Saflaştırılması.....	31
2.5.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	31
2.5.2.	Çöken Enzimlerde Spektrofotometrik Olarak Lipaz Aktivitesi Tayin.....	32
2.5.3.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi.....	32
2.5.4.	Protein Konsantrasyonu Tayini.....	33
2.6.	Lipazın Karakterizasyonu.....	34
2.6.1.	Optimum Sıcaklık.....	34

2.6.2.	Optimum pH.....	34
2.6.3.	pH Kararlılığı.....	34
2.6.4.	Isıl Kararlılığı.....	34
2.6.5.	Metal İyonların Etkisi.....	35
2.6.6.	İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi...	35
2.6.7.	Lipazın <i>Km</i> ve <i>Vmax</i> değerlerinin hesaplanması.....	35
3.	BULGULAR	36
3.1.	Mikroorganizma Seçimi.....	36
3.2.	16S rRNA Geninin Benzerlik Değerlendirilmesi.....	36
3.3.	Lipaz Aktivitesinin SDS Jel PAGE ile Belirlenmesi.....	37
3.4.	Lipaz Aktivitesinin Zimogram ile Varlığının Belirlenmesi.....	37
3.5.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	38
3.6.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi ve Jel Görüntüsü	38
3.7.	Lipazın Karakterizasyonu.....	39
3.7.1.	Optimum Sıcaklık.....	39
3.7.2.	Optimum pH.....	40
3.7.3.	Isıl Kararlılığı.....	40
3.7.4.	pH Kararlılığı.....	41
3.7.5.	Metal İyon Etkisi.....	42
3.7.6.	İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi..	43
3.7.7.	Lipazın <i>Km</i> ve <i>Vmax</i> değerlerinin hesaplanması.....	44
4.	TARTIŞMA.....	45
5.	SONUÇLAR	49
6.	ÖNERİLER	51
7.	KAYNAKLAR.....	52
8.	EKLER	60

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

ZEYTİNYAĞI KATI ATIĞINDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus pp* L1S LİPAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yasemin KÖKSAL

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2016, 59 Sayfa, 1 Ek Sayfa

Lipazlar karboksilik ester bağları üzerinde etkili olan hidrolazların bir parçasıdır. Lipazların fizyolojik rolü, trigliseritleri içinde bulunan digliseritleri, monogiliseritleri ,yağ asitlerini ve gliserolü hidrolize etmektedir Bu çok yönlülük lipazı gıda, deterjan, ilaç, deri, tekstil, kozmetik ve kağıt sektörlerinde potansiyel uygulamalar için tercih edilen enzim yapar.

Bu çalışmada, Yusufeli (Artvin, Türkiye) ve Söke (Aydın, Türkiye) iki zeytin fabrikası atıksular dikkatle toplandı. Farklı koloni morfolojileri dikkate alınarak 13 farklı suş izole edildi ve tanımlama yapılmak için saflaştırıldı. 16S rRNA analizi izolatlar *Bacillus* cinse ait olduğunu ortaya koymuştur. Biz bu çalışmada 13 farklı izolattan *Bacillus sp.* L1S seçildi. Saflaştırılan enzimin optimum aktiviteyi 45°C ve pH 8 göstermiştir. Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 27 kDa olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında, enzimin biyokimyasal özellikleri, enzimin önemli bir endüstriyel enzim olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelime: *Bacillus sp.* L1S ,lipaz, karakterizasyon

Master Thesis

SUMMARY

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE OF *Bacillus sp.* L1S
ISOLATED FROM OLIVE OIL WASTE

Yasemin KÖKSAL

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2016, 59 Pages, 1 Appendix Pages

Lipases are the part of the hydrolases that act on carboxylic ester bonds. The physiologic role of lipases is to hydrolyze triglycerides into diglycerides, monoglycerides, fatty acids ,and glycerol. This versatility makes lipase the enzyme of choice for potential applications in the food ,detergent , pharmerceutical, leather, textile, cosmetic, and paper industries.

In this works, wastewater of an olive factory from Yusufeli (Artvin,Turkey) and Söke (Aydın,Turkey) were collected carefuluy. Based on differenciess of colony morphologies, 13 isolates were selected and purified for identification. 16S rRNA analayses revealed that the isolates belong to *Bacillus* genus. In this study , we choice *Bacillus sp* L1S isolates the bacterial lipase. The purified lipase showed optimal activity at 45°C in pH 8. The molecular mass of the lipase was determined approximately 27 kDa on SDS-PAGE. In the light of all data it has been suggested that the enzyme's biocatalytic properties proved to be one of the important industrial enzymes.

Key Words: *Bacillus sp.* L1S ,lipase, characterization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Trigliserid'in gliserol ve yağ asidine hidrolizi	5
Şekil 2. Lipazların görev aldığı biyokimyasal yolda enzim substrat etkileşimi.....	7
Şekil 3. α / β hidrolaz katlanma.....	8
Şekil 4. Lipazın üç boyutlu yapısı <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Şekil 5. <i>Mucor miehei</i> lipazının kapalı (A) ve açık (B) formlarının yapısı.....	11
Şekil 6. Farklı pozisyon spesifikliğine sahip lipazlar.....	13
Şekil 7. Sulu ve susuz ortamlarda lipaz tarafından katalizlenen çeşitli reaksiyonlar..	17
Şekil 8. <i>Bacillus sp</i> L1S nin lipazın Native Jel görüntüsü.....	40
Şekil 9. <i>Bacillus sp</i> .L1S izolatının Lipazı saflaştırılmış görüntüsü.....	41
Şekil 10. <i>Bacillus sp</i> .L1S izolatına ait lipazın optimum sıcaklık grafiği.....	41
Şekil 11 . <i>Bacillus sp</i> L1S izolatına ait lipazın optimum pH grafiği.....	42
Şekil 12. <i>Bacillus sp</i> . L1S izolatına ait lipazın ısı kararlılık grafiği.....	43
Şekil 13. . <i>Bacillus sp</i> L1S izolatına ait lipazın pH kararlılık grafiği.....	44
Şekil 14. <i>Bacillus sp</i> . L1S izolatına ait lipazın metal iyon etkisi.....	44
Şekil 15. <i>Bacillus sp</i> . L1S izolatına ait lipazın inhibitör ve aktivör etkisi.....	45
Şekil 16. <i>Bacillus sp</i> . L1S izolatının lipazına ait Michaelis- Menten grafiği.....	46

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Pirina bileşimi	2
Tablo 2. Tablo 2 Mikrobiyal lipazların sanayide önemli kullanım alanları.....	6
Tablo 3. L1S izolatının 16S rRNA benzerlik yüzdeleri.....	39



1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimlere ait ilk bilgiler 1570'li yıllarda karşımıza çıkmaktadır. Yıllar içerisinde enzimler ait bilgiler arttıkça kullanım alanları genişledi. Sanayi alanındaki üretim çeşitliliğinin artması ve enzim biyoteknolojisi gelişmesi, bilim insanlarının bu yönde yeni araştırmalara teşvik etmektedir. Enzimlerin geliştirilmesi bilim insanları için büyük önem arz etmektedir. Hayvan, bitki ve mikroorganizmalara kadar çok çeşitli canlı gruplarında enzimler mevcuttur. Endüstriyel enzim kaynaklarına bakıldığında ise büyük çoğunluğu mikroorganizmaların oluşturulduğu bilinmektedir. Mikroorganizmaları hızlı şekilde farklı ekolojik ortamlarda gelişebilmesi, ekstrem koşullarda çoğalabilmesi, üretim maliyetinin düşük olması gibi birçok özelliğinden dolayı enzim endüstrisinde çok tercih edilmiştir. Biyokatalizör olarak adlandırılan enzimler, ilaç ve kimya endüstrisi başta olmak üzere bilinen 300'ü aşkın işlemden kimyasal süreçte kullanıldığı bilinmektedir. Mikroorganizmaların enzim üretiminin hem fizyolojik hem de fizikokimyasal açıdan kontrol edilebilir. Enzim miktarı, bitki ve hayvansal enzim kaynaklarına göre mikroorganizmalarda daha yüksektir. Mikrobiyal kaynaklı enzimler kolay indüklenebilir ve ucuz üretim maliyetine sahiptirler.

Endüstrilerin ihtiyaç duyduğu enzim gruplarından lipaz/esterazlar organik çözücü ortamında ester bağlarının oluşumunu ve sulu ortamlarda ise bu bağların hidrolizini ve modifikasyonu (transesterifikasyon) katalizleyen hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Bu enzimler tarafından katalizlenen esterleşme/hidroliz reaksiyonları genellikle yüksek bir stereoseçicilik ile yani sadece tek bir ürünün oluşmasıyla gerçekleşir ki, bu durum lipazların/esterazların farmakoloji, gıda mühendisliği ve kimya endüstrilerinde önemli bir biyokatalizör olmasını sağlar.

Böylece enzimler kullanılarak ılımlı şartlarda ve çok kısa zaman dilimlerinde, yüksek verim ve saflıkta endüstrinin ihtiyaç duyduğu maddeler üretilebilmektedir (Bornshcheuer ve Kazlauskas, 1999)

1.2. Zeytinyağı Katı Atığı

Tüm dünyada sağlık açısından önemli avantajları nedeniyle zeytinyağı tüketimi her geçen gün artmaktadır. Zeytinyağı üretiminin yoğun olarak yapıldığı Akdeniz ülkelerinde yılda ortalama 30 milyon m³ karasuyun çevresel ortamlara deşarj edildiği sanılmaktadır.

Prina zeytinyağı fabrikalarının bir atığı olup, Akdeniz ülkelerinde görülen önemli bir biyokütle çeşididir. Prina düşük maliyetle oldukça büyük miktarlarda elde edilebilir. Bitkisel yağlar ve prina, kükürt içermeyen alternatif yakıtlar olarak dikkate değer bir alternatif olamaya başlamıştır. Prina aslında bir atık madde olduğu için diğer atıklar gibi uygun ve kabul edilebilir bir kullanım olmaması halinde problemler yaratabilir. Enerji üretiminde verimli ve uygun bir şekilde prina kullanımı, temiz enerji üretimi ve zeytinyağı tesislerinin atığı olan bu maddenin tekrar kullanımı gibi, iki probleme birden çözüm sağlamaktadır.

Tablo 1 Pirina bileşimi (Ortalama ve yaklaşık değerler) (Haddadin vd. 1999)

Bileşen	Ortalama Değerler
Nem (g/kg)	515
Kül (g/kg)	19
Ham Protein (g/kg)	57
Yağ (g/kg)	112
Lignin (g/kg)	354
Hemiselüloz (g/kg)	155
Seluloz (g/kg)	184
İndirgen şekerler (mg/kg)	17

Pirininin yukarıda belirtilen mevcut kullanımlarına ilaveten, karasu da olduğu gibi, uygun optimizasyonlar yapılarak, farklı mikroorganizmalarla ve katı kültür (veya katı-hal) fermantasyon tekniği ile daha faydalı ürünlere dönüşümü mümkündür. Yıllık, yaklaşık 1 milyon ton zeytin, zeytinyağı üretimine girmekte ve yaklaşık 450.000 ton prina bu işlemden

sonra elde edilmektedir. Prinanın ısı değeri yaklaşık 12.500-21.000 kJ/kg'dır. Odun ve yıkanmış kömürün ısı değerleri sırasıyla 17.000 ve 23.000 kJ/kg'dır. Prinanın kükürt oranı kütlece % 0.05-0.1 değerindedir. Halen Türkiye'de zeytin üretim bölgelerine ve prina fabrikalarına yakın bazı sanayi kuruluşlarında da yağsız kuru prina, 2800 kCal/kg alt ısı değeri ve fiyatının odun ve petrol ürünleri fiyatlarının çok altında bulunması ile yakıt olarak kullanımının ülke ekonomisine getireceği faydalar açıktır (URL 1)

1.3. Enzimler

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Diğer katalizörler gibi enzimlerde girdikleri reaksiyonların hızını artırarak çalışırlar. Enzimleri biyolojik katalizörler olması sebebi ile canlılar için büyük önem arz ettiği bilinmektedir. Enzimler canlı hücreler tarafında sentezlenmekte ve enzimlerin bir kısmı hücre içinde aktivite göstermekte diğer bir kısmı ise hücre dışında aktivite gösterdiği bilinmektedir. Enzimlerin etkileşime girdiği ve değişime uğrattığı moleküllere substrat adı verilir. (Öztürk ve ark, 2007). Biyokimyasal reaksiyonlarda enzimler substratları yapısal olarak değiştirerek istenilen ürüne dönüştürürken kendi yapısında her hangi bir değişiklik meydana gelmemektedir. Enzimler moleküler açıdan incelendiğinde; üzerinde kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin şekillendiği aktif merkez bölgeleri ihtiva ederler. Aktif merkezde substrat bağlanma merkezi ve bir veya daha fazla katalitik aktivite bölgeleri mevcuttur. Buralar aminoasit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometrisi olan yerlerdir.

Hücre içerisinde önemli görevleri yerine getiren enzimler, günlük ve ekonomik gibi birçok alanda da kullanılmaktadır. Enzimler endüstrinin hemen hemen her alanında kullanılmakta olduğu günümüzde bilinmektedir. Enzimlerin bu kadar fazla alanda kullanılabilir olmasının sebepleri; maliyet bakımından ucuz olması, in-vitro şartlarda aktif olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasıdır (Çelik, 2006).

Enzimler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğine (IUBMB) bağlı Enzim komisyonu (E.C.) tarafından 4 numarayla tanımlanırlar ve E.C. X.Y.Z.V şeklinde gösterilir. Bu gösterimde, X; 6 büyük sınıftan birini, Y; birinci alt sınıf, Z; ikinci alt sınıf ve

V; ise enzim numarasını işaret eden semboller olarak kullanılırlar. Enzim Komisyonu, enzim sınıflandırılmasını 6 büyük grup altında toplamaktadır (Tsai, 2007).

E.C.1.: Oksidoredüktazlar: Bir çok kimyasal gruba etki edip hidrojen ekleyerek veya çıkararak yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalizlerler.

E.C.2.: Transferazlar: Alıcı hidrojen dışında bir fonksiyonel grubun bir molekülden diğerine transferini katalizlerler.

E.C.3.: Hidrolazlar: Su katılmasıyla kimyasal bağların parçalanmasını katalizleyerek hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler.

E.C.4.: Liyazlar : Çift bağ oluşturmak için, oksidasyon ve hidroliz dışındaki yollarla bağ kıran tepkimeleri katalizlerler.

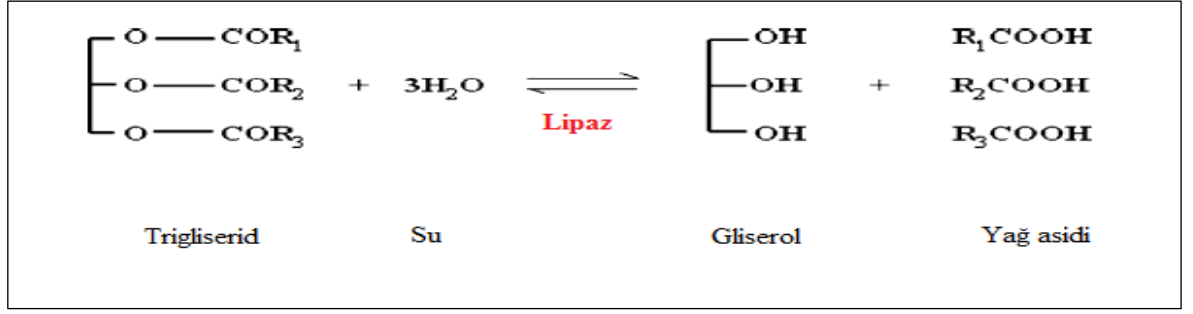
E.C.5.: İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişikliklerin gerçekleştirildiği izomerasyon tepkimelerini katalizlerler.

E.C.6.: Ligazlar : ATP enerjisi kullanarak iki molekülü birleştirirler.

1.4. Lipazlar

Dünya bioması incelendiğinde lipitlerin yüzdesinin oldukça fazla olduğu bilinmektedir. Lipolitik enzimler suda çözünmeyen bu bileşiklerin hidrolizinde önemli rol oynamaktadır. İlk olarak Claude Bernard 1856'da pankreatik sıvıdaki bir lipazı keşfetmiştir ve onu çözünür olmayan yağ damlalarını hidrolizleyen ve onları çözünür ürünlere dönüştüren enzimler olarak tanımlamıştır. Mikrobiyal kaynaklı lipazların varlığı ilk olarak 1901'de *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* ve *B. fluorescens*'de gözlenmiştir (Hasan ve ark,2006)

Lipazlar (triacilgliserol ester hidrolaz, EC 3.1.1.3) triacilgliserollerini yağ asitleri ve gliserole hidroliz eden hidrolaz enzim grubudur. Lipazlar hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalara kadar çeşitli canlı gruplarında bulunur. (Candenas ve ark. , 2001; Mohamed ve ar., 2000; Villeneuve ve ark., 2000, Aksoy 2003). Lipazlar esterlerin sentezlerini yapar. Ayrıca esterleri sentezinin yanı sıra esterlerin hidrolizi ,transesterleşmesini reaksiyonlarını katalizler ve enantioselektif özellikler göstermektedirler.



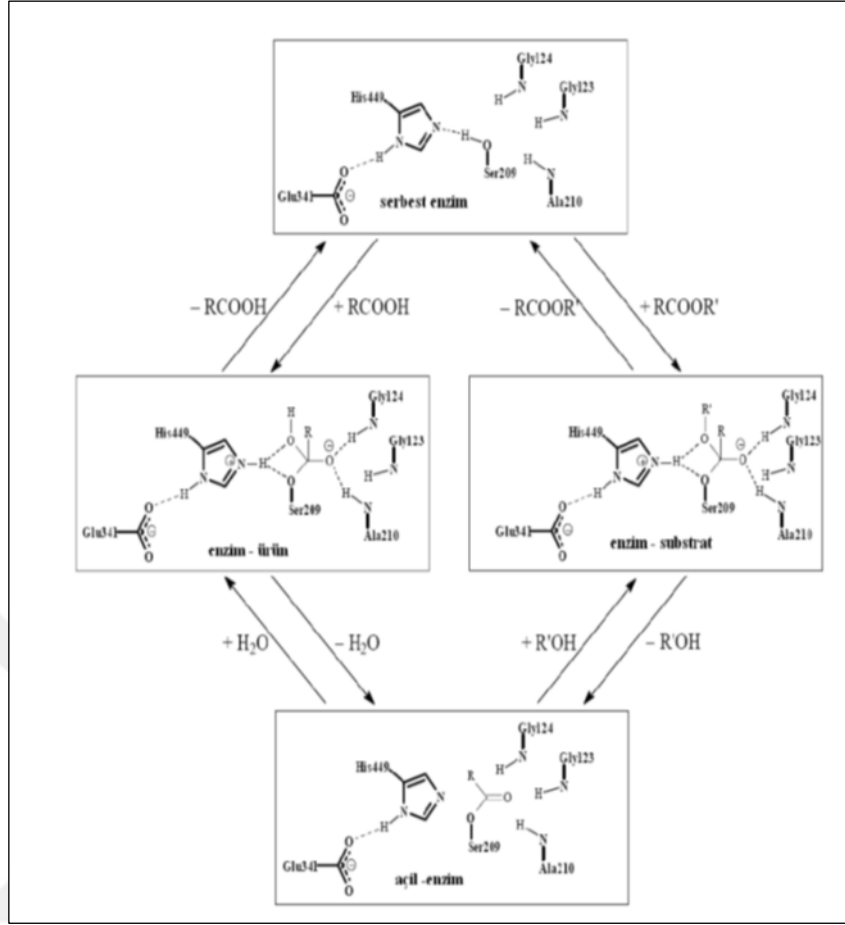
Şekil 1. Trigliserid'in gliserol ve yağ asidine hidrolizi (İşbakan, 2006)

Lipazlar çok spesifik kimyasal reaksiyonları gerçekleştirme yeteneklerinden dolayı gıda, deterjan, kozmetik, organik sentez ve ilaç endüstrisi gibi endüstriyel alanlarda aranan enzimlerden biri olmuştur. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin çoğunluğu lipazlardır ve dolayısıyla çalışılan lipazlara birçok örnek, literatürler de ve son yayınlarda rastlanabilir (Kourist ve ark, 2010; Shu ve ark, 2010). Lipazlar hem sulu hem de susuz ortamlarda reaksiyonları gerçekleştirebilen biyokatalizörlerdir. Lipazlar geniş substrat kullanabilme, ekstrem koşullarda (pH, sıcaklık, organik çözücüler, vs) yapılarını büyük oranda korumaları gibi özelliklerinden dolayı aranan enzim gruplarındandır. Lipazlar serin hidrolazları sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Saxena ve ark, 2008). Son yapılan çalışmalar ile birlikte üç boyutlu yapıları aydınlatılması birlikte yapı ve özelliklerini ortaya konulmuştur. Lipazlar kolay elde yöntemleri ve doğada yaygın yayılış göstermeleri sebebi ile fizyolojik ve endüstriyel öneme sahiptir.

Tablo 2. Mikrobiyal lipazların sanayide önemli kullanım alanları (Öztürk, 2002)

Sanayi Dalı	Etki	Ürün
Unlu mamuller	Lezzet artırıcı, raf ömrü uzatıcı	Unlu mamuller
İçecek	Aroma geliştirici	İçecekler
Kimya	Enantiyo seçicilik	Kiral kimyasallar
Temizleme	Sentez Hidroliz	Kimyasallar Sörfektanlar gibi temizleme Ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, Nemlendirme ajanlar
Süt ve süt mamulleri	Süt yağının hidrolizi Peynirin olgunlaştırılması Tereyağın modifiye edilmesi	Lezzet ajanları Peynir Tereyağı
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon Hidroliz	Kakao yağı, margarin Yağ asitleri, gliserol, mono ve digliseridler
Soslar	Kalite geliştirilmesi	Mayonez, krema
Sağlıklı gıdalar	Transesterifikasyon	Sağlıklı gıdalar
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Et ve balık	Lezzet geliştirilmesi ve yağın uzaklaştırılması	Et ve balık ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Eczacılık	Transesterifikasyon	Ozellikle lipitler Sindirim destekçileri

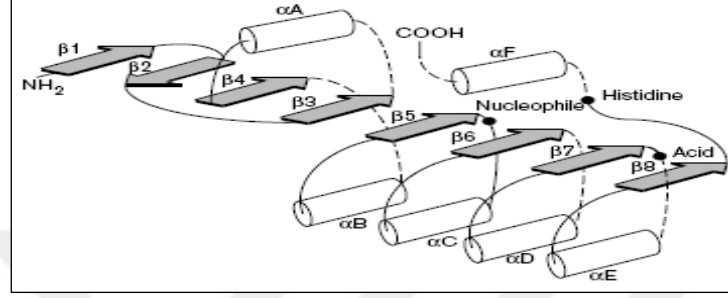
Lipazların görev aldığı biyokimyasal yolda enzim substrat etkileşimi iki basamakta olmaktadır (Şekil 2). Birinci basamakta tetrahedral etkileşim ile açilenzim kompleksi meydana gelir. Bu esnada etkileşim bölgesindeki oksijen atomları negatif yüklenerek peptit zincirindeki iki NH grubunun kararlı hale gelmesini sağlar. Oluşan bu yapıya oksianyon deliği denir. İkinci basamak ise açil-enzim kompleksinin hidrolizidir. His kalıntısı nükleofilik su molekülünü aktifleştirir ve reaksiyon ikinci etkileşim ile devam eder. Oluşan asidik ürün ayrılarak su molekülü serbest kalmaktadır.



Şekil 2. Lipazların görev aldığı biyokimyasal yolda enzim substrat etkileşimi (Gül, 2013)

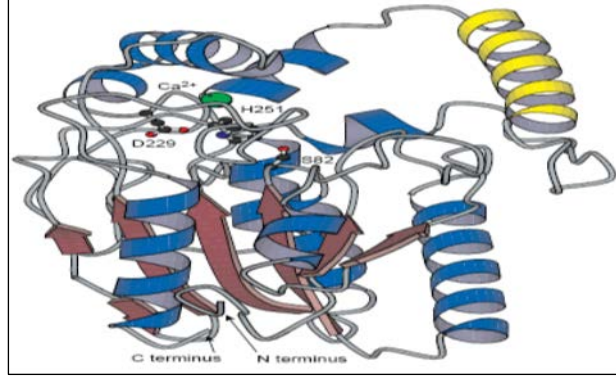
Farklı kaynaklardan izole edilen lipazlar incelendiğinde üç boyutlu yapıları birbirlerine büyük oranda benzerlik gösterdiği görülmüştür. Lipazların bilinen üç boyutlu yapılarının molekül ağırlıklarının 19-60 kDa aralığında değiştiği bilinmektedir. (Garrett ve Grisham, 1999; Gao 2004) Lipazlar, genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Bunlardan N- kısmı, katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır (Akoh ve Min, 1998). Lipazın yapısında en önemli özelliklerinden biri GX SXG pentapeptiddir, burada G:glisin, S: serin, X:herhangi bir aminoasittir. Bu sıra bütün lipazlarda bulunur. Diğer ortak özellik serin, aspartik asit ve histidin amino asitlerinin varlığında yaklaşık ayrı 50 kalıntı bulunur. Bu üçlüde serin pentapeptid bulunur (Brady ve ark, 1990; Svendsen 1994).

Lipazlarda karakteristik olarak katalitik grupları içeren merkezi bir β -bandı göze çarpmaktadır. α/β hidrolaz yapıdaki proteinlerin moleküler yapısı incelendiğinde paralel β kıvrımlı bantların heliks şeklindeki α yapıları ile ayrıldığı ve süper heliksel dönüşlerle bir şerit şeklini aldığı görülmüştür (Öztürk, 2002)



Şekil 4. α/β hidrolaz katlanma (Jaeger ve ark, 1999)

Merkezi β -bandı ile α -bandı arasında lipaz enziminin aktif bölgesi bulunmaktadır. Aktif bölgede yapılan çalışmalar bir üçlünün varlığını göstermiştir. C ucuna yakın kısımda bulunan histidin amino asidi, üç boyutlu yapıda nükleofilik amino aside hidrojen bağları ile bağlı bulunmaktadır. Ayrıca bir asidik amino asit (aspartik asit ya da glutamik asit) yine hidrojen bağları ile nükleofilik amino aside bağlanır. Bu üçlü grubun, enzimin katalitik aktivitesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Jaeger ve ark, 1993). Üçlü, üç boyutlu yapıda bir α bandı ile oluşturulan kapak yapısı ile korunmaktadır. Katalitik aktivitenin başlaması için bu kapak yapısının ayrılması şarttır. Lipaz enziminin aktivite koşulu olan ara yüzeyin oluşmasıyla beraber kapak yapısı ortadan kalkar ve lipaz enzimi aktiflik kazanır. Rhizomucor miehei ve insan pankreatik lipazında yapılan çalışmalar ile bu kapak yapısı gösterilmiştir (Brzozowski ve ark, 1991).



Şekil 4. Lipazın üç boyutlu yapısı *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger ve Reetz 1998)

Lipazlar sadece belirli pH değerlerinde katalitik olarak aktiftirler ve aktif bölgelerindeki grupların iyonlaşma durumu ve orjinlerine bağlıdır. Bazik, asidik ve nötral fonksiyoneller lipazların aktif bölgelerini kapsar ve bundan dolayı katalitik bölgedeki fonksiyonel gruplar iyonlaşma halinde aktiftirler. Çoğu Lipazlar için optimum pH 7 ile 9 arasında değişir (Öztürk, 2001). Mikrobiyolojik kaynaklı lipazlar pH 6,0–7,5 civarında yüksek kararlılık gösterirler. Bakterinin doğasına kolayca uyum sağlaması sonucunda aktivite ve dayanıklılığının pH'a bağlılığı kültür şartlarına bağlıdır. Eğer bu organizmalar alkali pH'da yetişirse, üretilen bu lipazların da optimumu alkali bir pH'a olabilirler (Öztürk, 2001, Fadiloğlu, 1996).

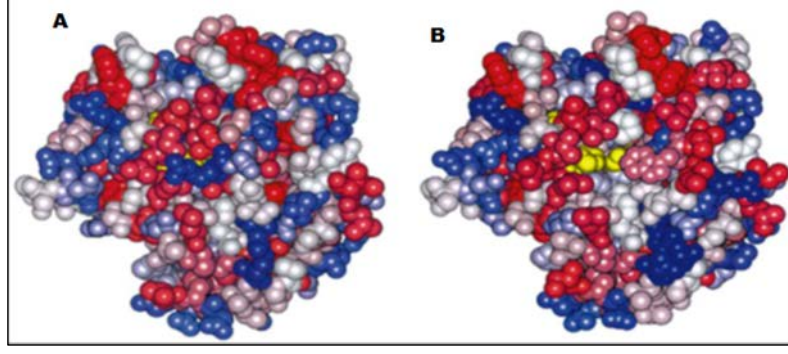
Lipazlar sadece belirli pH değerlerinde katalitik olarak aktiftirler ve aktif bölgelerindeki grupların iyonlaşma durumu ve orjinlerine bağlıdır. Bazik, asidik ve nötral fonksiyoneller lipazların aktif bölgelerini kapsar ve bundan dolayı katalitik bölgedeki fonksiyonel gruplar iyonlaşma halinde aktiftirler. Çoğu Lipazlar için optimum pH 7 ile 9 arasında değişir (Yılmaz, 2010). Mikrobiyal lipazların pH'ı 6 – 7,5 arasında yüksek kararlılık gösterdikleri bilinmektedir. Fakat bazı mikrobiyal lipaz pH 5 ile 5,5 arasında da kararlılık gösterdikleri bilinmektedir. Bakterinin doğasına kolayca uyum sağlaması sonucunda aktivite ve dayanıklılığının pH'a bağlılığı kültür şartlarına bağlıdır. Eğer bu organizmalar alkali pH'da yetişirse, üretilen bu lipazların da optimumu alkali bir pH'a olabilirler (Yılmaz, 2010).

Enzimlerin sıcaklık kararlılıklarını en az iki faktör etkiler, bunlardan ilkini enzimin primer yapısıdır. Enzim molekülünde hidrofobik amino asitlerin yüksek içeriği dış çevredeki bir değişiklik ile kolaylıkla denatüre olmayan sıkı bir yapı sağladığı bilinmektedir. Buna ilaveten disülfit köprüleri ve diğer bağlar hem kimyasal denatürasyona hem de sıcaklık inaktivasyonuna yüksek dayanıklılık sağlar. Enzim sıcaklık kararlılığını etkileyen ikinci faktör ise, polisakkaritler ve iki değerlikli katyonlar gibi spesifik bileşikler eğer varsa molekülü stabilize edilebilirler (Öztürk 2001). Lipazların geniş sıcaklık aralıklarının üzerinde aktif oldukları bilinmektedir.

1.4.1. Lipazların Arayüzey Aktivasyonu

Lipazlarda arayüzey aktivasyonu olgusu Sarda ve Desnuelle tarafından 1958 yılında ara yüzey fenomenine dayanarak tanımlanmıştır. Sulu ortamlarda monomerlerin maksimum konsantrasyonlarına doygunluk denilmektedir. Triasilgliserollerin bu doygunluğa ulaşması için emülsiyon formunun başlangıcıdır. Lipoliz, su yağ arayüzünün oluşumu için gerekli olan olaydır. Esteraz enzimi de lipaz gibi ester bağlarına saldırmasına rağmen aralarında belirgin farklar vardır.

Lipazlar, suda çözünen karboksilik ester moleküllerine karşı aktivite gösteren esterazlardan farklı olarak çözünür olmayan veya kümeleşen substratlara karşı aktiftirler. 1990 yılında iki lipazın X-ışın kristallografisi ile yapıları aydınlatılmış ve diğer enzimlerden farklı olarak özel bir mekanizmaya sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır: Bu enzimlerin üç boyutlu yapılarına bakıldığında, ara yüzey aktivasyonunun aktif bölgeyi çevreleyen kapak benzeri amfifilik peptidik bir ilmekten dolayı olabileceği ileri sürülmüştür. Lipaz substratıyla bir yağ/su ara yüzeyinde karşılaştığında bu kapak konformasyonel olarak yeniden düzenlenir ve aktif bölge substratın ulaşabilmesi için açılır (Şekil 5)



Şekil 5. *Mucor miehei* lipazının kapalı (A) ve açık (B) formlarının yapısı.

Sarı alanlar katalitik üçlüyü temsil etmektedir. Kapaklı yapısının açılması ile (B) katalitik bölgeye (sarı) erişilebilmektedir. Kaynak: (Schmid ve Verger, 1998).

1.4.2. Lipazların Sınıflandırılması

Lipazların sınıflandırılması gliseritleri parçalama yerlerine göre yapıları buan göre lipazları üç ana grupta toplamak mümkündür

1.4.2.1. 1,3 - Spesifik Lipazlar

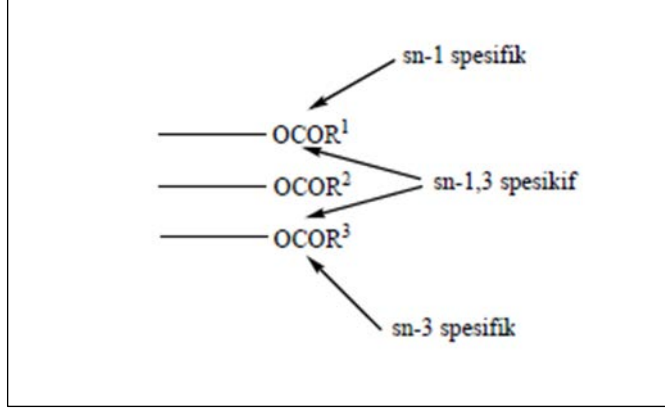
İlk grup lipazlar 2. pozisyondan parçalayamaz (Şekil 6), terminal gruplardan parçaladığından 1,3 spesifik olarak adlandırılırlar. Reaksiyon sonunda triaçilgliserinlerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler oluşur. 1,2 (2,3)-diaçilgliserinler ve özellikle 2-monoaçilgliserinler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçilgliserinlere ve 1(3)-monoaçilgliserinlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilirler ve sonuçta 1,3-spesifik lipazlarda spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseritleri gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalarlar. *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-spesifiktir (Yılmaz, 2010).

1.4.2.2. Spesifik Olmayan (Non-Spesifik) Lipazlar

İkinci grup lipazlar spesifik değildir, hem primer hem sekonder esterleri parçalayabilirler. Reaksiyonda ara ürün olarak diaçil ve monoaçilgliserinler oluşur. Trigliseritler gliserin ve yağ asitlerine parçalanırlar. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar spesifik olmayan lipazlar grubuna girerler (Yılmaz, 2010).

1.4.2.3. Yağ Asiti Spesifik Lipazlar

Üçüncü grup ise pozisyon olarak spesifik olmayan fakat yağ asidi seçimli birkaç lipazın oluşturduğu gruptur. Sadece özel bir tip yağ asidinin bulunduğu ester bağı parçalarlar (*Geotrichum candidum* ve çimlenmemiş yulaf tohumları özellikle 9,10 doymamış yağ asitlerinin esterlerini parçalarlar). Lipazlar ayrıca zincir uzunluğu spesifikliği de gösterebilirler (peynir yapımında kullanılan lipazlar, kısa zincirli esterleri parçalarken, orta ve uzun zincir uzunluğuna sahip esterleri parçalamazlar). Lipazlar, birçok enzimin aksine oldukça geniş substrat spesifikliği ve organik çözücülere karşı toleranslardan dolayı geniş sentetik potansiyele sahiptirler. Çözücü sisteme bağlı olarak hidroliz ya da sentetik reaksiyonlardan birini katalizleyebilirler. Trigliseritlerden başka alifatik, bisiklik ve aromatik esterler hatta organometalik bileşiklerin esterleri lipazlar tarafından substrat olarak kabul edilir. Rasemik esterler ya da birden fazla hidroksil grubuna sahip substratlar kullanıldığında, lipazlar yüksek enantiyo ve bölge seçimlilik ile aktivite gösterirler. Ayrıca oldukça fazla tiyoester ve aktif aminler de substratları olabilirler (Yılmaz, 2010)



Şekil 6. Farklı pozisyon spesifikliğine sahip lipazlar(Yılmaz,2010)

1.5. Bakteriyel Lipolitik Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin sınıflandırılması, substrat spesifitelerine, aminoasit sekanslarına ve gen dizi analizlerine göre yapılabilir. Lipazların ve esterazların yapıları hakkında bilgiler son yıllarda bir çok gen dizisinin açıklanmasıyla ve kristal yapıların aydınlatılmasıyla birlikte büyük ölçüde artmıştır. Diğer taraftan yüksek dizin homolojisi enzimlerin benzer substrat spesifitesine, benzer optimum pH ya da sıcaklığa sahip olduklarını göstermemektedir. Hatta bazı durumlarda da benzer bir dizine sahip enzimlerin tamamıyla farklı reaksiyonları katalizledikleri görülmektedir. Bakteriyel lipolitik enzimler, amino asit sekansları ve biyolojik özellikleri esas alındığında temel olarak 7 sınıfa ayrılmaktadır (Arpigny ve Jaeger, 1999);

Aile I: Aile I olarak da adlandırılan bakteriyel gerçek lipazlar eskiden *Pseudomonas* grupları olarak üç alt grupta inceleniyordu. Çünkü *Pseudomonas* lipazları muhtemelen çalışılan ilk lipazlardır ve endüstride önemli bir role sahiptirler. Önemli lipazlar üreten bazı *Pseudomonas* türlerinin *Burkholderia* olarak yeniden adlandırılmasından ve pek çok lipazın farklı cinslerden elde edilmesinden dolayı gerçek lipazlar 6 alt aile temelinde yeniden sınıflandırılmıştır. Çeşitli *Bacillus* ve *Staphylococcus* türlerine ait lipazlar da bu grupta yer alırlar. Alt aile 5’de yer alan *Staphylococcus hyicus*’un lipazı önemli bir fosfolipaz aktivitesi göstermesi ile lipazlar içinde tektir.

GDSL ailesi: Aile II olarak da adlandırılan bu enzimler geleneksel Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly pentapeptit yapısını göstermezler, bunun yerine aktif bölgedeki serin amino asidi Gly-

Asp-Ser-(Leu) (GDS(L)) motifini gösterir. Bu proteinlerde katalitik rol oynayan bu önemli amino asitler diğer lipolitik enzimlere göre N-terminale çok daha yakındırlar. *Streptomyces scabies* esterazı bu ailede yer almaktadır.

Aile III: Bu enzim ailesi ilk olarak Cruz ve arkadaşları (1994) tarafından tanımlanmıştır. *Moraxella* cinsleri bu sınıfa dahildir.

Hormon duyarlı lipaz ailesi: Birkaç bakteriyel enzim (aile IV), memelilerin hormon duyarlı lipazı (HSL) ile önemli oranda amino asit dizilim benzerliği gösterirler. Memeli hormon duyarlı lipazı ve *Moraxella* sp. lipazının düşük sıcaklıkta (15 °C'nin altında) oldukça yüksek bir aktivite göstermesi bu enzimlerdeki korunmuş amino asit dizilim sıralarına sahip olmalarına bağlanmıştır. Ancak benzer amino asit dizilim sıralarının çeşitli mezofilik (*Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*) ve termofilik (*Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Archeoglobus fulgidus*) türlerde de bulunması bu korunmuş dizilimden sıcaklık adaptasyonunun sorumlu olmadığını göstermiştir.

Aile V: Bu sınıf lipolitik enzimlerin çoğu *Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus* gibi mezofil bakteri kökenlidir. Aminoasit sıraları o/3-hidrolaz yapısına sahip ve katalitik üçlü içeren epoksit hidrolaz, dehalojenaz ve haloperoksidaz gibi lipolitik olmayan enzimlerle benzerlik gösterir.

Aile VI: 23-26 kDa'luk molekül ağırlıklarıyla bilinen en küçük esteraz sınıfını oluştururlar. *Pseudomonas fluorescens* karboksil esterazının üç boyutlu yapısı belirlenmiştir. Bu enzimin aktif formu bir dimerdir ve alt birimleri alfa/beta-hidrolaz yapısına sahiptir ve klasik Ser-Asp- His katalitik üçlüsünü içerir. Bu karboksil esteraz küçük substratları hidrolizlemesine rağmen uzun zincirli trigliseritlere karşı aktivite göstermemektedir. Bu ailede yer alan enzimler hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Aminoasit sırasını veren gen sıraları başka gen sıralarıyla benzerlik göstermemektedir. Bununla birlikte yalnızca bir tane enzimin ökaryotik lizofosfolipaz ile (Ca^{+2} a bağımlı olmayan lizofosfolipaz A2) ile %40 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Arpigny ve Jaeger, 1999). *Spirulina platensis*, *Rickettsia* lipazları bu sınıfa dahildir.

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

Aile VIII: Bu aileyi meydana getiren üç enzim de yaklaşık 380 aminoasit içermekte ve aktamaz sınıfı enzimlerle benzerlik göstermektedir (Arpigny ve Jaeger, 1999). Bu ailedeki esterazların katalitik mekanizmasını açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

1.6. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

Lipazlar çeşitli reaksiyonlar için biyokatalizör olarak kullanıldığı bilinmektedir. Lipazlar birçok değişik reaksiyonu katalizlerler. Örneğin hidroliz ve hidroliz reaksiyonunun tersi de esterifikasyon, transesterifikasyon (asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz), aminoliz, oksimoliz ve tiyotransesterifikasyon. İleri (hidroliz) ve tersi (sentez) reaksiyonları arasındaki denge, reaksiyon karışımının su aktivitesi ile kontrol edilir (Öztürk, 2001).

1.6.1. Hidroliz

Lipazlar su moleküllerinin tüketilmesiyle birlikte triaçilgliserollerin ester bağlarını katalizlerler bu olaya hidroliz denir. Lipazların, gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden ester sentezi reaksiyonlarından başka esterlerin gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerine hidrolizi reaksiyonlarını da katalizledikleri bilinmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998) Özellikle deterjan endüstrisinde yağ kaynaklı kirliliklerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılması, deterjan katkısı olarak lipazların kullanılmasıyla sağlanmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998). Burada lipazların hidroliz yönündeki reaksiyonu katalizledikleri bilinmektedir. Kağıt sanayinde odundan istenmeyen lipidik maddelerin uzaklaştırılmasında da lipazlar kullanıldığı bilinmektedir. (Yılmaz, 2010)

1.6.2. Esterifikasyon

Hidrolizin tersi olan, serbest yağ asitleri ile alkol arasında esterifikasyon reaksiyonları düşük su aktivitesi veya çözücüsüz sistem şartları altında az sulu organik çözücülerde lipazlar tarafından katalizlenir. Ester sentezi asit veya baz katalizli ile kimyasal olarak yapılabilmesine rağmen enzim teknolojisinin kullanımı, ılıman koşullarda çalışma, azalmış yan reaksiyonlar ve spesifitesi gibi avantajlarından dolayı önerilmektedir. Çok kıymetli kimyasallar laurik asit ve mentol veya bütirik asit ve geranolden metil ve geranil esterlerinin

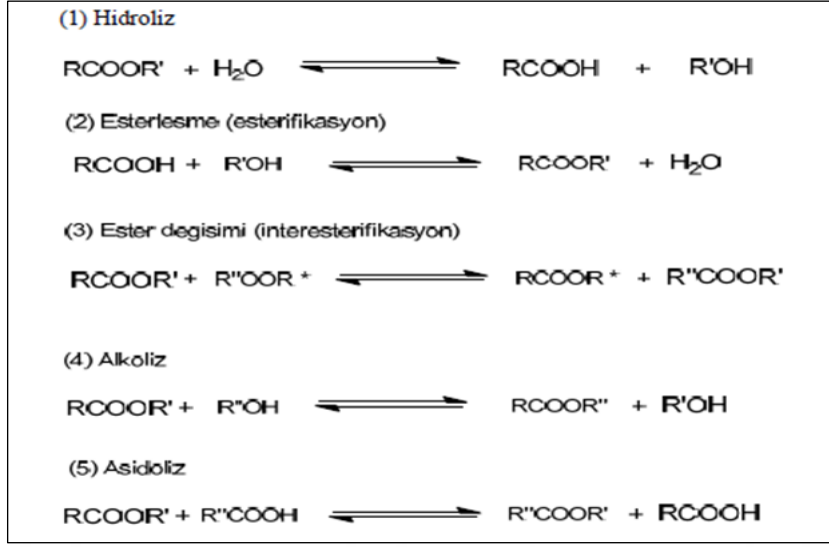
üretimi ve primer ve sekonder alifatik ve terpenik alkollerden oleik asit esterlerinin üretimi lipaz katalizli ester sentezi ile yapılır(Villeneuve ve ark, 2000).

1.6.3. Ester Değişimi (Transesterifikasyon)

Transesterifikasyon terimi bir ester ve bir alkol (alkoliz), bir ester ve başka bir ester (interesterifikasyon) veya bir ester ve bir asit (asidoliz) arasındaki grupların yer değiştirmesi işlemi olarak tanımlanır. Transesterifikasyon, endüstriyel olarak uygun yüksek sıcaklıklarda susuz bir ester ile başka bir reaktant türlerinin bir karışımının ısıtılması sonucu gerçekleştirilir. Alternatif olarak daha düşük sıcaklıklarda alkali metaller veya alkali alkilatlar kullanılabilir. Bununla birlikte, transesterifikasyonla hayvansal ve bitkisel yağların modifikasyonu için lipazların kullanımı ılıman koşullar, azalmış yan reaksiyonlar ve spesifikite avantajlarından dolayı tercih edilir. Daha ucuz yiyecek maddelerinden kakao yağı üretimi buna bir örnektir. Bu reaksiyon palm yağı ve stearik asit veya palm yağı ve tristearogliserol içeren lipaz katalizli transesterifikasyonu ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 7) (Villeneuve ve ark, 2000).

1.6.4. Doğal Olmayan Substratların Katalizi

Lipazlar karboksilik asit esterlerinin hidrolizi ve sentezinin katalizini sınırlamaz. Alkol ve sudan başka bileşenleri de nükleofil olarak tanırlar. Lipazlar, böylece seçicilikle organik çözücülerde oksimoliz, transesterifikasyon, aminoliz gibi farklı reaksiyonları kataliz etme kabiliyetine sahiptirler. Susuz ortamda esterlerin aminolizinde lipazların seçiciliği peptid ve yağ amit sentezi için başarıyla kullanılmıştır. Bu sonuçlar düşük maliyette yeni deterjanlar ve optikçe aktif peptidler, polimerler ve sürfaktantların sentezinde lipaz teknolojisi kullanılarak elde edilmektedir (Şekil 7) (Villeneuve ve ark., 2000).



Şekil 7. Sulu ve susuz ortamlarda lipaz tarafından katalizlenen çeşitli reaksiyonları (Villeneuve ve ark., 2000).

1.7. Bakterilerde Lipaz/Esteraz Aktivitesi Tespit Yöntemleri

Lipazlar, trigliseritleri hidrolize ederler ve serbest yağ asitleri ve gliserolün meydana çıkmasını sağlarlar. O nedenle, bu enzimler için analiz metotları genel olarak serbest yağ asitlerinin oluşumunun analiz edilmesi kriterleri etrafında gelişmiştir (Jensen ve ark, 1983). Serbest yağ asitlerinin oluşumunu araştırmak amacıyla kalitatif olarak jel difüzyon analizleri ve kantitatif olarak titrimetri, kolorimetrik analiz, floresans, kromatografik prosedürler (TLC/GC/HPLC) ve immünolojik metotlar kullanılmaktadır (Jaeger ve ark, 1994; Beisson ve ark, 2000; Gupta ve ark, 2003).

1.7.1. Kalitatif Analiz

Lipaz üreten suşlar tribütrin içeren agarda incelenebilmektedir. Dört karbonlu (Lee ve ark, 2001) sentetik bir trigliserit olan (Gao, 2000) tribütirinin hidrolizi ile oluşan zon ya esteraz ya da lipaz aktivitesini göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, zeytinyağı ilave edilen katı besiyerleri lipaz üreten kolonilerin seçilmesinde kullanılmıştır (Hube ve ark, 2000; Martinez ve Soberón-Chávez, 2001). Alternatif olarak katı besiyerlerine indikatör eklenerek renkli zon oluşumu gözlenmiştir (Gupta ve ark., 2003). Nile blue sülfat, Victoria

blue, metil red, fenol red indikatör olarak kullanılmıştır (Lawrence ve ark, 1967; Converse ve ark, 1981; Christen ve Marshall, 1984; Samad ve ark, 1989). Bu testler katı besiyerlerinde lipolitik mikroorganizmaların gelişimlerini hızlı bir şekilde araştırmak için uygundur. Ancak bazı pozitif yanlış sonuçlar görülebilir. Bu mikrobiyal lipazlar tarafından serbest bırakılan yağ asitlerinin, asidik metabolitler üretmesinden dolayı ortamın asidifikasyonundan kaynaklanmaktadır (Beisson ve ark, 2000; Gupta ve ark, 2003). Bunu engellemek için Kouker ve Jaeger (1987) floresan Rhodamine B boyasını kullanarak 350 nm dalga boyunda UV ışığı altında turuncu floresan olarak lipolizis zonlarını göstermişlerdir. Rhodamin, serbest yağ asitleriyle floresan bir kompleks oluşturur. Böylece lipaz üreten koloniler UV ışığı altında floresan haleler oluşturur. Burada substrat olarak triolein (trioleoilgliserol) kullanılır (Gupta ve ark, 2003). Ayrıca bunun yerine zeytinyağı kullanılmaktadır (Jette ve Ziomek, 1994; Jarvis ve Thiele, 1997).

1.7.2. Titrimetri

Hidrolaz sınıfı enzimlerin katalizlediği reaksiyonların büyük çoğunluğunda H^+ açığa çıkar. Oluşan H^+ konsantrasyonu reaksiyon hızı ile orantılıdır (Telefoncu, 1986). Özellikle substratları suda iyi çözünmeyen hidrolazların (lipazlar gibi) aktivite tayinleri için titrasyon çok uygun bir yöntemdir (Telefoncu, 1986; Ghosh ve ark, 1996). Burada substrat olarak uluslararası kabul gören triolein veya buna ucuz bir alternatif olan zeytinyağı kullanılır (Jensen, 1983). Bundan başka tribütrin, triasetin (triasetilgliserol) ve tripropiyonin (tripropiyonilgliserol) de enzimatik aktivite tayininde substrat olarak kullanılabilir (Lanz ve Williams, 1973; Staubmann ve ark, 1999). Bununla birlikte lipazlar, kısa zincirli triaçilgliserollerle karşılaştırıldığında, triolein gibi uzun zincirli triaçilgliserollerini daha yüksek oranda hidrolize etmektedir (Gupta ve ark, 2003). Lipolitik reaksiyonda, asidin serbest bırakılması titrimetrik olarak analiz edilebilir. Nicel yöntemde reaksiyon yönünde pH ölçülür (Jaeger ve ark, 1994). Titrimetrik metotlar zamana bağlı olarak serbest yağ asitlerinin serbest bırakılmasıyla sodyum veya potasyum hidroksitin nötralizasyon oranını ölçmektedir (Naka ve Nakamura, 1992).

1.7.3. Spektrofotometrik Analiz

Genel olarak yağ asidi zinciri çeşitli uzunluğa sahip p-nitrofenil esterleri substrat olarak kullanılır ve meydana gelen p-nitrofenol 410 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür (Winkler ve ark, 1979) Kısa zincirli esterler suda çözünür ve o nedenle bu hidroliz lipaz aktivitesinden ziyade esteraz aktivitesinin ölçülmesini sağlar. Bununla birlikte p-nitrofenil palmitat lipaz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılır. Bu analiz için sınırlayıcı olan enzimatik aktivitenin asidik pH’da p-nitrofenol’ün absorpsiyon vermemesinden dolayı asidik pH’da yapılamamasıdır. Enzimatik aktivite sadece nötral veya alkali pH değerlerinde bu prosedürle tespit edilebilir (Kademi ve ark, 2000). Kalorimetrik analiz, renksiz alfa-naftil karpilat (oktanat) esterinin hidrolizi ile meydana gelen renkli alfa-naftol’un 560 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle de yapılabilir (Degrassi ve ark, 1999; Gandolfi ve ark, 2000). Alfa-naftil asetat, naftil propiyonat ve naftil bütirat gibi alfa-naftil esterleri substrat olarak kullanılmaktadır (Gupta ve ark, 2003). Renk üretiminin ölçülmesinden başka spektrofotometrik analizler yağ asitlerinin, kalsiyum veya bakırla çöktürülmesiyle yapılabilir. Substrat olarak Tween kullanılır. Absorpsiyon artışı 500 nm’de ölçülür (Von Tigerstrom ve Stelmaschuk, 1989) ve bu türbidimetrik metot, basit bir yöntem olup Tween 20 ile yapılan titrimetrik analizden 36 kat, p-nitrofenil palmitatla yapılan spektrofotometrik analizden en az dört kat daha hassastır.

1.7.4. Florimetrik Analiz

Floresan bileşikler lipaz analizi için kullanılırlar. Metot, lipaz aktivitesinden dolayı serbest bırakılan floresan yağ asitlerinin ölçümünü gerektirir. Triaçilgliserollerin alkil grubunun, pirenil gibi floresan grupla yer değiştirmesiyle analiz gerçekleşir. Floresan özellikte serbest pirenil grupları oluşur. Triaçilgliseroller hidrolize olduktan sonra pirenil grupları 400 nm’de yer değiştirir (Thuren ve ark., 1987; Negre-Salvayre ve ark., 1991). Floresan olmayan 4-metilumbelliferil oleat substratı, lipaz etkisinden sonra floresan 4-metilumbelliferonu serbest bırakır (Jacks ve Kircher, 1967). Hızlı bir yöntem olmasına rağmen substratların pahalı olması bunların kullanımını sınırlandırmaktadır (Gupta ve ark, 2003).

1.7.5. Kromatografik Prosedür

Kromatografi; lipit substratında, enzim katalizinin hidrolizini takiben serbest bırakılan yağ asitlerinin doğrudan tespit edilmesi için kesin bir metottur. Spesifik kolonlar vasıtasıyla ürün veya artakalan substratın miktar tayini ve analizi yapılır. Rutin analizler için zaman alıcı olmasına rağmen substrat spesifikliğinin tayininde kullanımı tavsiye edilmektedir (Gupta ve ark., 2003). TLC; triaçilgliserollerden serbest yağ asitlerinin kalitatif analizde, işaretleme yapılmış triaçilgliseroller densitometrik veya autoradiografik metotları kullanılarak uygulanır. Bunlar çok hassas metotlar olmalarına rağmen zaman alıcıdır (Ruiz ve Rodriguez, 1982). GC; resmi American Oil Chemists Society metoduna göre; yağ asitleri bunların metil esterlerine çevrilir ve GC ile miktar tayinleri yapılır. HPLC; lipolizis ürünleri kolaylıkla HPLC kullanılarak tanımlanabilir. Alfa-naftil laurat'ın substrat olarak kullanıldığı Maurich ve ark. (1991) tarafından lipaz aktivitesini tanımlanması için HPLC metodu geliştirilmiştir.

1.7.6. İmmünolojik Prosedür

İmmünolojik metotlar veya ELISA yüksek hassasiyet ve lipazların tespiti ve miktar analizleri için spesifik sistemlerdir. Bu immünolojik metotlar aktif veya aktif olmayan lipazların tespit edilmesinde kullanılırlar (Grenner ve ark, 1982) Lipazların immünolojik tespitinde doğal veya rekombinant kaynaklardan enzimin saflaştırılmasına ihtiyaç vardır (Beisson ve ark, 2000).

1.8. Lipaz Üretimi

Sharma ve arkadaşları (2001), mikrobiyal lipazların çoğunlukla sıvı kültür olarak üretildiklerini, fakat katı kültür fermentasyon metotlarının ve birkaç çalışmada da immobilize hücre kültürlerinin kullanıldığını bildirmişlerdir. Sıvı kültür yöntemiyle lipaz üretiminde optimum kültür koşullarının ve besin gereksinimlerinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışma yapılmaktadır. Lipid yapıdaki karbon kaynakları genellikle lipaz verimini artırmaktadırlar, bununla beraber birkaç araştırmacı yağ kullanmadan iyi bir verim elde ettiklerini bildirmişlerdir (Sharma, 2001). Karbon ve azot kaynaklarının uygunluğu, aktivatörlerin, stimülatörlerin, inhibitörlerin, surfaktanların bulunması, inkübasyon sıcaklığı ve pH'sı, inokülüm seviyesi ve kaynağı ve oksijen miktarı gibi büyüme koşulları lipaz

sentezini etkileyebilmektedir (Hasan ve ark, 2009). Shelley (1987), lipaz-pozitif bir bakterinin belirlenebilmesi için üç faktörün birlikte bulunması gerektiğini söylemiştir: (1) organizma üremeli; (2) organizma genel büyüme koşulları altında lipaz üretmeli veya ortama salmalı ve (3) aktivite tayini için kullanılan metot yeterli hassasiyette olmalı (Hasan ve ark, 2009).

1.9. Lipazların Saflaştırılması

Woolley ve Peterson (1994), pek çok lipazın pH, sıcaklık, metal iyonları ve şelatlayıcı ajanlar karşısındaki aktivite ve stabiliteleri göz önüne alınarak geniş ölçüde saflaştırılıp karakterize edildiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kullanılan saflaştırma metotlarının genellikle presipitasyon, hidrofobik etkileşim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi spesifik olmayan teknikler olduğunu fakat bazı durumlarda saflaştırma adımlarının sayısını azaltmak için afinite kromatografisinden yararlandığını bildirmişlerdir (Sharma ve ark, 2001). Mikrobiyal lipazların çoğu ekstraselülerdir ve fermentasyon işleminden sonra hücreler kültür sıvısından santrifüjle veya filtrasyonla uzaklaştırılır. Daha sonra kültür sıvısı ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi veya organik çözücülerle ekstraksiyon işlemlerinden biriyle konsantre edilir (Saxena ve ark, 2003). Eğer enzim hücre içi ise bu defa hücreler santrifüjle kültür sıvısından ayrılır ve tekrar tamponda çözülerek parçalanır. Hücrelerin parçalanmasında sonikasyon veya French pres gibi fiziksel yöntemler kullanılabilir gibi enzimler (bakteriler için lizozim ve mayalar için zimoliyaz) veya çeşitli kimyasalların (safra tuzu, SDS ve Triton gibi deterjanlar) kullanıldığı kimyasal yöntemler de kullanılabilir (Metin, 2007). Hücreler parçalandıktan sonra santrifüjle hücre atıkları uzaklaştırılır ve süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılır.

Saflaştırma işlemlerinin yaklaşık % 80'inde ilk olarak çöktürme işlemi yapılır. Çöktürme işlemlerinin % 60'ında amonyum sülfat ve % 35'inde etanol, aseton veya bir asit (genellikle hidroklorik asit) kullanılır. Aires-Barros ve ark (1994), diğer tekniklerle karşılaştırıldığında çöktürme yöntemlerinde genellikle yüksek bir ortalama verim (% 87) elde edildiğini bildirmişlerdir (Saxena ve ark, 2003). Çöktürme işlemi çeşitli kromatografik yöntemler izlemektedir. Çoğu zaman istenilen saflaştırma düzeyine ulaşmak için tek bir kromatografik basamak yeterli değildir ve birkaç kromatografi adımı ard arda

kullanılır. Lipazların saflaştırılmasında, iyon değişim kromatografisi en çok kullanılan kromatografik yöntemdir; saflaştırma işlemlerinin % 67'sinde kullanılmışlardır ve bunların % 29'unda birden çok kez kullanılmışlardır. En çok kullanılan iyon değiştiriciler, bir anyon değiştirici olan dietilaminoetil (DEAE) (% 58) grubu ve bir katyon değiştirici olan karboksimetil (CM) (% 20) grubudur. Jel filtrasyon kromatografisi en çok kullanılan ikinci saflaştırma yöntemidir; saflaştırma işlemlerinin % 60'ında kullanılmışlardır ve bunların % 22'sinde birden çok kez kullanılmışlardır. Afinite kromatografisi saflaştırma işlemlerinin % 27'sinde, hidrofobik etkileşim kromatografisi ise % 18'inde kullanılmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde en çok kullanılan hidrofobik adsorbenler oktil veya fenil fonksiyonel grubuna sahip olanlardır (Saxena ve ark, 2003). Aires-Barros ve ark (1994), bir proteini, % 30 verimle ve 320 katlık bir saflaştırma katsayısı ile saflaştırmak için dört veya beş tane saflaştırma adımının gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bu değerleri her bir saflaştırma planından elde edilen verimlerin ve saflaştırma katsayılarının ortalamalarından elde etmişlerdir (Saxena ve ark, 2003). Lipaz saflaştırmasının alışılmış işlemleri oldukça güç ve zaman alıcı olabilmektedir ve sonuçta oldukça düşük bir verim elde edilebilmektedir.

Lipazların saflaştırılmasında son zamanlarda bazı yeni saflaştırma teknolojileri uygulanmaktadır. Bunlar arasında, membran işlemleri, immüno saflaştırma, durgun faz olarak epoksi bağlanmış ligand ve sefaroza immobilize edilmiş polietilen glikolün kullanıldığı hidrofobik etkileşim kromatografisi ve sıvı iki-faz sistemleri sayılabilir (Saxena ve ark, 2003).

1.10. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Günümüzde yaklaşık olarak 4000 enzim bilinmekte olup, bunlardan 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır (Sharma ve ark, 2001). Bu ticari enzimler içerisinde % 3 pazar payına sahip olan lipazlar, hem sulu hem de susuz çözücü sistemlerinde aktivite gösterdikleri için (Gupta ve ark, 2004; Nie ve ark, 2006), endüstride ve tıp alanında önemli bir yere sahiptirler (Bjokling ve ark, 1991). Bu enzimlerin lipit içeren atık suların enzimatik degradasyonu, organik sentez, deterjan formülasyonu, biyosurfektanların sentezi, oleokimyasal endüstri, süt endüstrisi, agrokimyasal endüstri, kağıt yapımı, besin, kozmetik, kimyasal analiz ve ilaç prosesinde umut verici uygulama alanları bulunmaktadır. Lipaz teknolojisindeki gelişmelerle birlikte yeni bileşiklerin sentezi için de bu enzimlerin kullanımları hızla

artmaktadır (Ghosh ve ark, 1996; Sharma ve ark, 2001). Mikrobiyal lipazların, biyosensör olarak kullanılmaları ise yeni bir alan olarak ümit vaat etmektedir (White ve White 1997; Kazlauskas ve Bornscheuer 1998; Schmid ve Verger 1998).

1.10.1. Gıda Endüstrisinde Lipazlar

Gıda endüstrisinde lipazların önemli bir kısmı lipitlerin özellikle bitkisel ve hayvansal yağların biyokatalizinde rol oynarlar (MacRae ve Staines, 1994 ; McGee, 1986). Depolama sırasında lipit fraksiyonunda olan en önemli değişikliklerden biri de bu ürünlerin karakteristik lezzeti için çok önemli olan serbest yağ asitleri tutularak lipazlar ile katalizlenmiş trigliseritlerin hidrolizidir (Langrand ve ark, 1990). Aksitakdirde trigliseritin istenilen fonksiyonel grubu, kontrollü ester yer değiştirme reaksiyonları ve esterifikasyon ile çıkarılabilir veya yer değiştirilebilir.

Lezzet ve güzel kokuca zengin dondurmalar modern yaşamda büyük bir pazara sahiptir. Dondurmada kullanılan kısa veya orta zincirli yağ asitleri içeren lezzetli esterleri üretmek için birçok bilim adamı tarafından araştırılmıştır (Langrand ve ark, 1990 ;Takahata ve ark, 1993). Bununla birlikte, çözücüsüz sistemlerde üretilen lezzet bileşikleri leziz krema yapmak için güvenilir avantajlara (ürünler kirlilik olarak çözücü içermezler) sahiptirler (Oguntimein, 1994). Ester değiştirme reaksiyonları istenilen lezzetli esterleri elde etmek için günümüzde kullanılmaktadır (McCrae ve ark, 1990).

1.10.2. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar

Lipazların en önemli ticari uygulamalarının başında çamaşır deterjanlarındaki kullanımları gelmektedir. Toplam lipaz satışının % 32'sini deterjan enzimleri oluşturmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998 ; Akkuş 2006).Enzimler deterjanlardaki istenmeyen kimyasalların azaltılmasını sağlar ve zararlı kalıntı bırakmadan biyolojik olarak ayrıştırılabilirler. Ayrıca daha düşük yıkama sıcaklığını sağlayarak enerji tasarrufuna katkıda bulunurlar (Karaca, 2006). Lipazların yağları hidrolizleme yeteneklerinden dolayı, endüstride ve evlerde kullanılan deterjanlarda ilave katkı maddesi olarak büyük bir kullanım alanı bulunmaktadır. Sert yıkama koşullarına dayanıklılığı, farklı kompozisyonundaki yağları hidroliz etme yeteneği ve zarar verici yüzey aktif maddelere dayanabilme yeteneği

deterjan endüstrisinde aranan özelliklerdir. Ayrıca deterjan uygulamalarına lipazlar yanında selulaz, amilaz, proteazlarda katkıda bulunurlar (Pandey ve ark. 1999).

1.10.3. Deri Endüstrisinde Lipazlar

Deri üretimindeki post ve deri işleme işlemi gelenekseldir. Deri işleme, deri altı yağlarının kaldırılması, kılların ayıklanması ve doldurma işlemlerini gerektirir. Proteazlar gibi diğer hidrolitik enzimlerle birlikte lipazlarda içeren bir enzim karışımı deri işlemede kullanılır (Pandey ve ark, 1999, Karaca, 2006).

1.10.4. Kağıt Hamuru Ve Kağıt Endüstrisinde Lipazlar

Kağıt endüstrisinde üretilen kağıt hamurundan katranı ayırmakta lipaz kullanılır. Katran, kağıt hamuru ve kağıt üretiminde ciddi sorunlara sebep olan trigliseridler ve balmumu olarak adlandırılan ağacın hidrofobik bileşenlerini tanımlamak için kullanılır. Ağacın hidrofobik içeriği olarak tanımlanan 'pitch' (trigliseritler ve mumlar), kâğıt hamuru yapımında sorun yaratmaktadır. Lipazlar kâğıt yapımı için kullanılan kâğıt hamurundan belirtilen maddelerin uzaklaştırılması için kullanılır (Yılmaz,2010)

1.10.5. Biyodizel Üretiminde Lipazlar

Petrol rezervlerinin kritik boyuta ulaşması, çalışmalarını ister istemez yeni enerji kaynakları yönüne çevirmiştir. Bu çerçevede içerisinde alkil esterlere yani biyodizele olan ilgi de artmış ve bu konuda birçok yeni araştırmalar yapılmıştır. Biyodizel, toksik olmayan, biyobozulur ve yenilenebilir bir enerji kaynağıdır. Ayrıca, eksoz emisyonu ve CO, CO₂, SO_x gibi sera etkisi yaratan gazların düşük oranda olması diğer avantajları arasındadır. Alkil esterlerin konvansiyonel sentezi, kimyasal transesterifikasyonla kısa sürelerde ve yüksek verimle elde edilmesine rağmen, ortamda su bulunması durumunda kullanılan substratın önceden işlenmesini gerektirmektedir. Katalizörün ve reaksiyon sonrası açığa çıkan gliserinin geri kazanımı ve ayrıca yüksek enerji gereksinimi, asit ya da alkali katalizli proseslerdeki mevcut dezavantajlardır. Biyodizelin petrol kökenli yakıtların yerine kullanılabilirliği, biyolojik yollarla biyodizel üretimi çalışmalarının artmasına neden

olmuştur (Shimada ve ark, 1999; Samukawa ve ark, 2000; Ban ve ark, 2001; Matsumoto ve ark, 2001).

Biyodizel yüksek oranlarda elde edilmesine rağmen, yüksek fiyatından dolayı kullanımı sınırlı kalmaktadır. Biyodizel fiyatını aşağılara çekmek ve kullanımını artırmak için, düşük maliyetli veya atık sayılan substratların biyodizel üretiminde kullanımı şüphesiz iyi bir alternatif olabilir. Özellikle enzimatik yolla biyodizel üretimi hem diğer konvansiyonel üretimdeki ağır proses şartlarını hafifletecek, hem de üretilen biyodizelin ve gliserin gibi yan ürün olarak açığa çıkan maddelerin kalitesini artıracaktır.

Lipazlar çift yönlü kataliz özelliğine sahip olan ve organik çözücülerin varlığında ve de yokluğunda reaksiyonu gerçekleştirebilen enzimlerdir. Literatürde lipaz katalizli, ayçiçeğinden, soya yağından, karışık bitkisel yağlardan, gres ve donyağından ve çeşitli lokal yağlardan biyodizel çalışmaları mevcuttur. (Yılmaz,2010)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Tripton (Merck V441613949), Yeast ekstrakt (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), Etil alkol, Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega A1125), Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas K0513), EDTA (Merck 84211000), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega A1360), CaCl₂ (Aktar Kimya), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck 2C2133453), Sodyum Asetat (Merck TA867065), K₂HPO₄ (Merck A678671), KH₂PO₄ (Merck 567300), Trizma Baz (Sigma T1503), SDS, Akrlamid (Sigma A8887), Bis-akrlamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbu 080702), β-merkaptotanol (Merck 805740), Metanol, Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), Gliserol (Merck K40789992008), NaH₂PO₄·2H₂O (Merck K91147745938), MgSO₄·7H₂O, Glukoz (Sigma G7528), Triptofan, MgCl₂, EDTA (Sigma), CaCO₃ (Botaforma lab), Amonyum Sülfat (Merck A734116), Malt Ekstrakt (Merck VM264491106), C₄H₁₂N₂O₆, CuSO₄·5H₂O, MgSO₄·7H₂O, Fe₄(SO₄)₄, CaCl₂·2H₂O, MnSO₄·H₂O, Agar (Himedia RM026), KMnO₄ (Merck), Sodyum Sitrat tribasic dihidrat (Sigma S4641).

2.2. Mikroorganizmaların Seçimi

2.2.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Artvin Yusufeli ilçesi ve Aydın Söke ilçesinde bulunan zeytinyağı fabrikalarından alınan pirina örnekleri soğuk zincir şartlarında laboratuvara getirilmiştir. İki ayrı fabrikadan getirilen pirina örnekleri karıştırılmış ve 1000- 2000 g santirfüj edilmiştir ve posası uzaklaştırılarak sıvı kısmı alınmıştır. Alınan sıvı örnek 0,45 µm filtreden geçirilmiştir. Filtre LB agar üzerine koyuldu bir gün 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan

petriler kolonilerden tek koloni seçimi yapılmış ve LB agar üzerinde tekrar büyüme bırakılmıştır.

2.2.2. Lipaz Aktivitesi Olan Mikroorganizmaların Seçimi

2.2.2.1. Lipaz Varlığının Petride Belirlenmesi

Saflaştırılan bakterilerden lipaz aktivitesini petride gözlemlemek için Rhodamine B ve substrat olarak zeytinyağı içeren LB agar kullanılmış. 1 mg/ml'lik Rhodamine B ddH₂O da çözülerek hazırlanmış ve filtre ile steril edilmiştir. LB sıvı besiyeri (5g/l NaCl, 5 g/l yeast extract ve 10 g/l tripton) hazırlanarak pH'sı 7,4 e ayarlanmıştır. İçerisine substrat olarak %2,5 w/v olacak şekilde zeytinyağı ilave edilmiş ve otoklavda steril edilmiştir. Sıcaklığı yaklaşık 60°C 'ye düşünce, %0,001 w/vol olacak şekilde filtre ile steril edilen rhodamine B besiyeriye eklenerek iyice karışması için bir süre çok hızlı bir şekilde sallayıcıda karıştırılmıştır. Petrilere dökülerek saflaştırılan bakteriler ekim yapılmış ve 48 saat 37 °C 'de büyüme bırakılmıştır. 48 saat sonunda petrilere UV ışık altında bakılmıştır.

2.2.2.2. Seçilen Mikroorganizmalara Substrat Muamelesi

UV altında ışığa yanan 13 izolattan 3 ml LB sıvı besiyerine gece kültürü atılmıştır. 1000 'lik erlene 500 ml LB sıvı besiyeri eklenmiş ve yapılan gece kültüründen bu besiyeri üzerine OD'si 0,1 olacak şekilde ekim yapılmıştır. 12 saat sonunda %1 zeytin yağı (ticari) eklendi ve 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücre solüsyonları 8000 g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi . Süpernatantlar ve pelletler ayrılmıştır. . Elde edilen pelletler Fosfat (pH 8) tamponunda çözülerek %70 şiddetinde, 0,6 devirde 5 dk Sartorius Labsonic sonikatör ile sonike edilmiştir. Elde edilen hücre solüsyonları 14800 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Her farklı izolata ait olan süpernatant ve pellet kısımlar; sırası ile 4-nitrofenil – butirat, 4- nitrofenil-kaprilat, 4- nitrofenil-laurat, 4- nitrofenil- miristat,4- nitrofenil-palmitat substralları ile muamale edilmiştir.

2.3. Moleküler Çalışmalar

2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapılmıştır. Lipaz aktitesi belirlenen 13 farklı koloni 3 ml LB besiyerine ekilmiş ve 37°C'de gece boyunca bir sulu çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Büyümüş olan gece kültürü 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atılmıştır. Hücreler 480 µl 50 mM EDTA içerisinde çözüldü. 120 µl 10 mg/ml lizozim ilave edilmiş, hafifçe pipetleyerek karıştırılmış ve 37°C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen karışım 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpe 600 µl Nuclei Lysis solüsyonu eklendi ve hafifçe pipetle karıştırılmıştır. Karışım 80°C'de 5 dk inkübe edildi ve oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 3 µl RNase solüsyonu eklenmiştir. Tüp 2-5 kez alt-üst edilmiş ve 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Karışım oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 200 µl Protein Precipitation solüsyonu eklenmiş ve 20 sn vortekslelendikten sonra 5 dk süreyle buza bırakılmıştır. 5 dk sonunda 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant içinde 600 µl izopropanol bulunan yeni bir ependorfa aktarılmıştır. Ependorf pelet oluşuncaya kadar alt üst edilmiş ve 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant döküldü ve kurutma kağıdı kullanarak tüm süpernatant sıvısının atıldığından emin olunmuştur. Pelletin üzerine 600 µl oda sıcaklığında % 70'lik etanol eklendi ve alt üst edildikten sonra 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Pipetörle süpernatant uzaklaştırılmış ve etanolün tamamının uzaklaşması için mikrosantrifüj tüpü 15 dk 37°C'de bekletilmiştir. Pellet üzerine 100 µl DNA Rehydration solüsyonu eklenmiş ve 65°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zaman kadar +4 °C'de saklanmıştır.

2.3.2. 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Artırılması

16S rRNA genleri Sambrook ve arkadaşlarının prosedürüne göre izole edilen genomik DNA'lar UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA) geri primerleri kullanılarak PCR yardımıyla çoğaltılmıştır. PCR reaksiyon şartları Beffa ve arkadaşlarına (1996) göre oluşturulmuştur. 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 ;500mM steril KCl), 1,5mM MgCl₂ ,1 U Taq DNA Polimeraz ,0,25 mM ileri primeri, 0,25mM geri primeri, 170mM dATP, 170 dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril dH₂O ile 50 µl tamamlanmıştır. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde ,” Biometr Personal Cyler ‘da gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95 °C de 2 dakika olarak gerçekleştirilmiş sonra ,36 döngü 94 °C ‘de 1 dakika (denatürasyon için), 56 °C’de 1 dakika (hibridizasyon için)ve 72 °C’de 2 dakika (polimerazasyon için) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilecek PCR ürünlerinin 5 µl’si %1,1 ‘lik agaroz jelde yürütülmüş ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyanmış ve daha sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntülenmiştir. PCR reaksiyonu ile çoğaltılmış 16S rRNA genleri, pGEM-T Esay Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Esay Klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konstrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlanmıştır. Klonlama sonucunda oluşan rekombinat plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edilmiştir. Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlenecek ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizi analizi,baz dizini otomatik dizi analizatörleri aracılığıla (Macrogen ,Hollanda) belirlenmiştir. Elde edilecek yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan diğer bakteriyel dizilerle karşılaştırılır aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarılmıştır. Cins seviyesinde izolatların sınıflandırılması sağlanmıştır.

2.4. Biyokimyasal Çalışmalar

2.4.1. Lipazın Ekstraksiyonu

Seçilen izolattan 3 ml LB sıvı besiyerine gece kültürü atılmıştır. 1000 'lik erlene 500 ml LB sıvı besiyeri eklenmiş ve yapılan gece kültüründen bu besiyeri üzerine OD'si 0,1 olacak şekilde ekim yapılmıştır. 12 saat sonunda %1 zeytin yağı (ticari) eklenmiş ve 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücre solüsyonu 8000 g'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım atılmış ve elde edilen pellet Fosfat (pH 8) tamponunda çözülerek %70 şiddetinde, 0,6 devirde 5 dk Sartorius Labsonic sonikatör ile sonike edilmiştir. Elde edilen hücre solüsyonu 14800 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kontrol olarak enzim aktivitesi yapılmış ve protein SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek tespit edilmiştir.

2.4.2. Lipaz Aktivitesinin Araştırılması

Enzim aktivitesinin spektrofotometrede tayini için substrat çözeltisi; 1:4:95 (v/v/v) oranında olacak şekilde sırasıyla; asetonitrilde çözülmüş PNPB, etanol, tampon bileşenlerinden hazırlanmıştır. Rutin çalışmalarda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazında kör olarak; 900 µl substrat çözeltisi ve 300 µl 50 mM Fosfat (pH 8) tamponu, numune olarak 900 µl substrat çözeltisi, 250 µl 50 mM Fosfat (pH 8) tamponu ve 50 µl enzim kullanılarak 405 nm de ölçümleri yapılmıştır (Lee ve ark, 1999).Reaksiyonun gerçekleştirildiği tüm koşullar (reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon pH'sı, enzim miktarı) enzim karakterize edildikçe yeniden düzenlenmiştir.

2.4.3. Lipaz Varlığının SDS PAGE ile Teyit Edilmesi

Protein jel elektroforezleri Hoeffler SE 600 marka elektroforezde % 12'lik jel kullanılarak 15 mA'lik akım altında gerçekleştirilmiştir. Seçilen izolatın lipazının moleküler ağırlığını hesaplamak ve saflığını kontrol etmek amacıyla saflaştırılan enzim, moleküler

ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek belirlenmiştir. Her bir örnekten 50 µg protein kullanılarak yürütülmüştür. Her bir örnek üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; %20 Gliserol; % 6 β-merkaptoetanol) tamponu ilave edilmiştir ve sonrasında 95°C’de 4 dakika bekletilerek Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12’lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklenmiş ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütülmüştür. 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 bekletilmiştir. Daha sonra 2. yıkama solüsyonunda (%7 asetik asit ve %5 metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildikten sonra bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflanmıştır.

2.4.4. Lipaz Aktitesinin SDS PAGE ile Teyit Edilmesi

Enzim SDS PAGE’de lipaz aktivitesinin tayini için %12 ‘lik native jel kullanılmıştır. Enzim muamele tamponu eklendikten sonra ısıtmadan veya herhangi bir işlem yapılmadan direk jele yüklenmiştir. Yürüttükten sonra ayrı ayrı hazırlanmış solüsyon A ve solüsyon B karıştırılıp bu jel karışımında, koyu kahverengi –kırmızımsı bantlar oluşuncaya kadar beklenmiştir.

2.5. Lipazın Saflaştırılması

2.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Hazırlanan hücre içi enzim özütü ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutuldu. Bu enzim özütü (20 ml) 100 ml ‘lik bir beher içerisine aktarılıp buz dolu bir kap içerisinde manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Enzim özütü %40, %50 ,%60,%60, %70 amonyum sülfat ile doyuruldu. Bu yüzdelerdeki amonyum sülfat miktarları aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V= Enzim çözeltisinin hacmi

S₁= 1'in kesri olarak amonyum sülfat doygunluğu

S₂ = 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Her seferinde gereken amonyum sülfat miktarı oldukça yavaş bir şekilde enzim özütüne azar azar eklenmiş ve eklendikten sonra 1 saat boyunca karışmaya bırakılmıştır. Ardından 9.000 rpm de 10 dakika santirfüj edilerek pellet ayrılmıştır. Ayrılan pellet 50 mM Fosfat (pH 8) tamponunda çözülmüştür. Süpernatant ile diğer doygunluk yüzdeleri için aynı şekilde çalışmaya devam edilmiştir.

2.5.2. Çöken Enzimlerde Spektrofotometrik Olarak Lipaz Aktivitesinin Tayini

Amonyum sülfatın, aktivite tayinin de kullanılan substrat çözeltisi ile reaksiyona girdiği fark edildiğinden dolayı lipazın hangi amonyum sülfat doygunluk yüzdesinde çöktüğünü tespit etmek için, her bir doygunluk yüzdesinde çökerek ayrılan enzimler diyaliz edilmiştir Spektrofotometrik olarak lipaz aktivitesi veren enzimler seçilmiştir.

2.5.3. İyon Değişimi Kromatografisi

İyon Değişimi Kromatografisi için 50 cm uzunluğundaki ve 1,5 cm çapındaki bir kolon kullanılmıştır. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak anyonik iyon değiştirici olan DEAE-Sepharose kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 20 mM Fosfat (pH 8) tamponu kullanılmıştır. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompasında alınmış ve sonrasında bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde doldurulmuştur. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 500 ml 20 mM Fosfat (pH 8) tamponu ile dengeye getirilmiştir. Özüt kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu

malzemesine bağlanmaları sağlanmıştır. Sonrasında kolondan 50 ml daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,6 molara kadar çıkarıldı. Bunun için 200 ml'lik NaCl gradient köprüsü kullanılmıştır. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içinde 3,5 ml olacak şekilde toplanmıştır. İyon değişimi grafiğinden kullanılmak üzere, elde edilen tüm tüplerde spektrofotometrik olarak 405 nm'de protein absorbansları ölçülmüştür. Diğer taraftan tüm tüplerde lipaz taraması yapılarak aktivite veren tüplerde yine iyon değişimi grafiğinde kullanılmak üzere ünite hesabı yapılmıştır. En fazla enzim bulunduran tüpler seçilerek birleştirildi ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edilmiştir.

2.5.4 Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein konsantrasyonu tayini Bradford'un (1976) yılında geliştirdiği yöntemle yapılmıştır. 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 eklenmiştir. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı ile filtre edilmiştir. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturulmuştur. Standart grafik için 12, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Her bir örneğin üzerine 3 ml hazırlanan boyadan eklenmiştir. 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 3 ml boya eklenmiştir. Protein ve boya karışımı vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Süre sonunda standart grafiğin yüklendiği Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapılmış ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplanmıştır.

2.6. Lipazın Karakterizasyonu

2.6.1. Optimum Sıcaklık

Seçilen izolatin lipazının en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta gerçekleştirilen bir seri reaksiyonlar ile belirlenmiştir. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

2.6.2. Optimum pH

Seçilen izolatin lipazının aktivitesine pH'nın etkisinde, 50 mM fosfat tamponu (pH 5-8), 50 mM glisin tamponu (pH 9-10) kullanıldı. Reaksiyonlar belirlenen optimum sıcaklık değerinde gerçekleştirildi. Gözlenen optimum pH aktivite değeri daha sonra yapılacak olan kinetik parametrelerin belirlenmesi gibi çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanılmıştır.

2.6.3. pH Kararlılığı

Seçilen izolatin lipazının pH kararlılığı belirlemek için enzim, pH'sı 5 – 8 olan 50 mM fosfat tamponunda pH'sı 9-10 olan glisin tamponlarında, optimum sıcaklıkta 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi.

2.6.4. Isıl Kararlılığı

Seçilen izolatin lipazının kararlılığına ısının etkisini incelemek için 30 dakika 50 mM Fosfat (pH 8) tamponunda, 4,25,30,37 ve 45°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü.

2.6.5. Metal İyon Etkisi

Bacillus sp. L1S izolatının lipazının aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; Mg^{+2} , Li, Ca^{+2} , K, Zn^{+2} ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzları ile gerçekleştirilmiştir. Enzim, ilave edilen 1 mM metal iyonlarıyla 30 dakika inkübe edilmiştir. Bekletilen enzimlerle para-nitrofenilbutirat substrat olarak kullanılarak aktivite bakıldı. Enzimin metalsiz hali 100 kabul edilerek metal içeren enzimlerin % kalan aktivitesi hesaplanmıştır.

2.6.6. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Deterjan ve organik çözücülerin *Bacillus sp.* L1S izolatının lipazının aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzim, 30 dk, % 1 (v/v) DMSO, β - merkaptoetanol, twen 20 etanol, izopropanol, tripton 10X, 5 mM EDTA, %0,1 (v/v) SDS içerecek şekilde 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü. Enzimin kimyasalları içermeyen hali 100 kabul edilerek kimyasalları içeren enzimin % kalan aktivitesi hesaplandı.

2.6.7. Lipazın K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması

Bacillus sp. L1S izolatının kinetik verileri, değişik substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile belirlenmiştir. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk grafiğinde, x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlenmiştir. (Lineweaver ve Burk, 1934). K_m ve V_{max} değerleri OriginPro8.1 programıyla hesaplanmıştır.

3.BULGULAR

3.1. Mikroorganizma Seçimi

LB besiyerine 1 mg/ml'lik Rhodamine B eklenen petrilere ekim yapılmıştır. Deneyde kontrol olarak lipaz negatif E.coli BL21 suşu kullanılmıştır. 1 günlük bir inkübasyon süresi sonunda E.coli BL21 suşunun lipaz aktivitesi göstermediği aktivite gösteren koloniler UV' nin altında turuncu renk vermekte, aktivite göstermeyenler pembe görüldüğü bilinmektedir. 13 farklı koloni UV altında turuncu ışımaya yapıldığı görülmüştür. Işıma yapan koloniler %1'lik zeytinyağı (ticari) içeren LB içerisinde 3 gün inkübe edilmiştir. 13 farklı suşun süpernatant ve pellet kısımları sırası ile 4-nitrofenil – butirat, 4- nitrofenil-kaprilat, 4-nitrofenil-laurat, 4- nitrofenil- miristat,4- nitrofenil- palmitat substraları ile muamale edilmiştir. Hücre içi ve hücre dışı aktivitelerine bakılmıştır. Biz bu çalışmada L1S izolatını seçtik. L1S izolatı UV ışık altında bir günlük inkübasyonun ardından turuncu renk gözlenmiştir.

3.2. 16S rRNA Geninin Benzerlik Değerlendirilmesi

UV altında ışımaya yapan 13 farklı suşa 16S rRNA ve PCR yapılmıştır.16S rRNA dizin analizi sonuçlarına göre elde edilen izolatların; L1S Bacillus sp. , L2 Bacillus sp. ,L3 Bacillus sp., L5 Bacillus sp. , L6 Bacillus sp. , L7 Bacillus sp. , L8 Bacillus sp. , L9 Bacillus sp. , L10 Bacillus sp ,L11 Bacillus sp. ,L12 Bacillus sp. , L13 Bacillus sp. ,L15 Bacillus sp. 'dır. L1S bakterisinin benzerliği aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo3) (EK1).

Tablo 3. L1S izolatının 16S rRNA benzerlik yüzdeleri

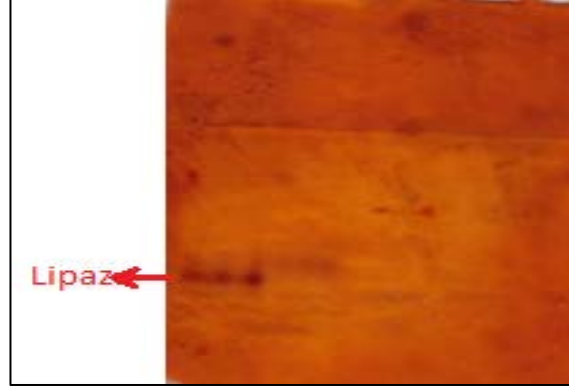
Benzerlik	Yüzde (%)
<i>Bacillus subtilis subsp. Inaquosorum</i>	%99,80
<i>Bacillus tequilensis</i>	%99,80
<i>Bacillus mojavensis</i>	%99,70
<i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i>	%99,70
<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii</i>	%99,70
<i>Bacillus atrophaeus</i>	%99,59
<i>Bacillus siamensis</i>	%99,39
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	%99,36
<i>Bacillus vallismortis</i>	%99,29
<i>Bacillus vanillea</i>	%98,79
<i>Bacillus licheniformis</i>	%98,08

3.3. Lipazın SDS PAGE ile Varlığının Belirlenmesi

Bacillus sp. izolatu 24 ,48 ,72 saat büyüme bırakıldı. Kültür çökütürüldü ve hücreler sonikatörle patlatılmıştır. Enzimler hücre dışına alınmış ve alınan örnekler %12'ilk SDS jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

3.4. Lipazın Aktitesini Zimogram ile Varlığının Belirlenmesi

Zimogram jeli hazırlandı ve hazırlanan örnekler jelde yürütülmüştür. Jel üzerine Solüsyon A ve B eklendi bir saat inkübasyon sonunda kahverengi bant oluşumu görülmüştür (Şekil 8).



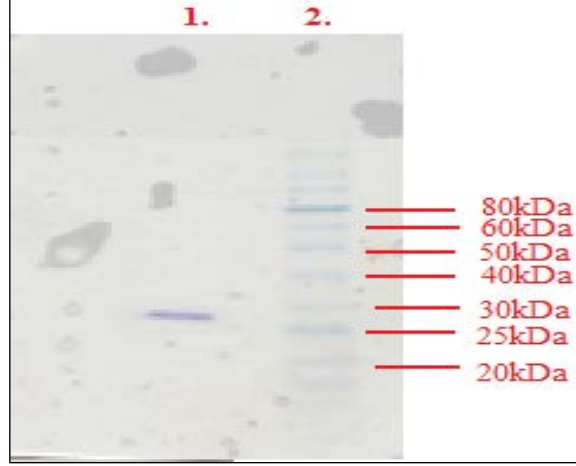
Şekil 8 . *Bacillus sp* L1S izolatının hücre içi lipazın Native Jel Görüntüsü

3.5. Amonyum Sülfat Çöktürülmesi

Yapılan % 40, 50, 60, 70 'lik çöktürmeler yapıldı. Daha sonra yapılan örneklerle spektrofotometrik olarak lipaz aktivitesi bakıldı. % 40 ve %50 'lik çöktürmelerde aktivite görüldü.

3.6. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi ve Jel Görüntüsü

Amonyum sülfat çöktürme sonucunda alınan 100 µl enzim kolona yüklendi ve 70 tüp elde edildi. Elde edilen tüplere aktivite bakıldı ve 55. tüpte aktivite tespit edildi. Örnek SDS jel elektroforezine protein markeri ile yüklendi ve Lipazın ağırlığının yaklaşık $27 \approx$ kDa olarak tespit edildi (Şekil 9).

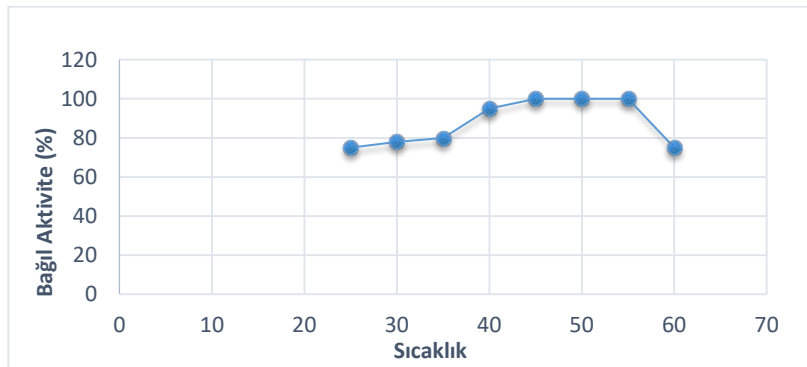


Şekil 9. Saflaştırılmış *Bacillus sp.* L1S izolatının hücre içi lipazının SDS PAGE analizi 1. Saf lipaz 2. Marker

3.7. Lipazın Karakterizasyonu

3.7.1. Optimum Sıcaklık

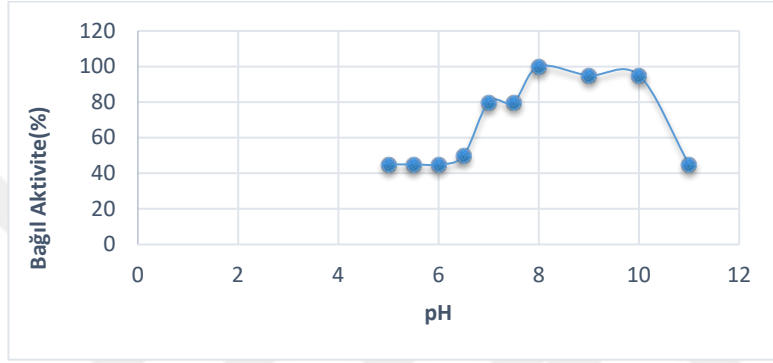
Bacillus sp. lipazının 25, 30, 40, 50, 55, 60°C’de aktivitesi ölçülerek enzimin çalışmasına sıcaklığın etkisi araştırıldı ve sıcaklık-aktivite grafiği oluşturularak enzimin optimum sıcaklığı 45°C olarak belirlendi, sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirildi (Şekil 10).



Şekil 10. *Bacillus sp.* L1S izolatına ait Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği

3.7.2. Optimum pH

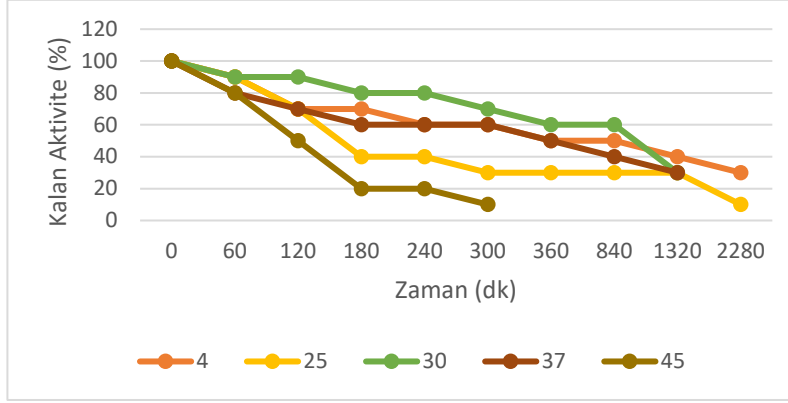
Bacillus sp. pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi pH 5-10 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-Aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 'da da görüldüğü üzere lipaz aktivitesi en yüksek pH 8'de gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11. *Bacillus sp.* L1S izolatına ait lipazın optimum pH grafiği

3.7.3. Isıl Kararlılığı

Bacillus sp. lipazının kararlılığına ısının etkisini incelemek için enzim, 4 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon boyunca belirli zaman aralıklarında tüplerden alınan örneklerde kalan aktivite, optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçüldü. Deney başlangıcında yani sıfırıncı dakikada tüplerden alınan örneklerin aktivitesi ile istenilen zamanlarda alınan örneklerdeki aktiviteler kıyaslanarak bir ısıl kararlılığı grafiği çizildi (Şekil 12).

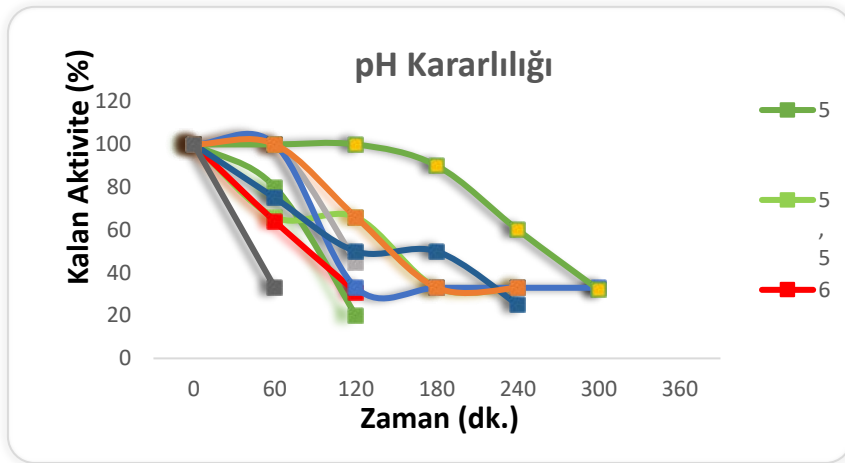


Şekil 12. *Bacillus sp* L1S izolatının lipazına ait ısıl kararlılık grafiği

Lipazın ısıl kararlılık grafiğine bakıldığında 4°C iki güne kadar kararlılığı olduğu , 25,30,37 °C’de ise bu kararlılığı 38 saate kadar koruduğu gözlemlendi. Optimum sıcaklığı olan 45°C ‘de ise 240. Dakikada aktivitesinin %20’lere düştüğü gözlemlendi.

3.7.4. pH Kararlılığı

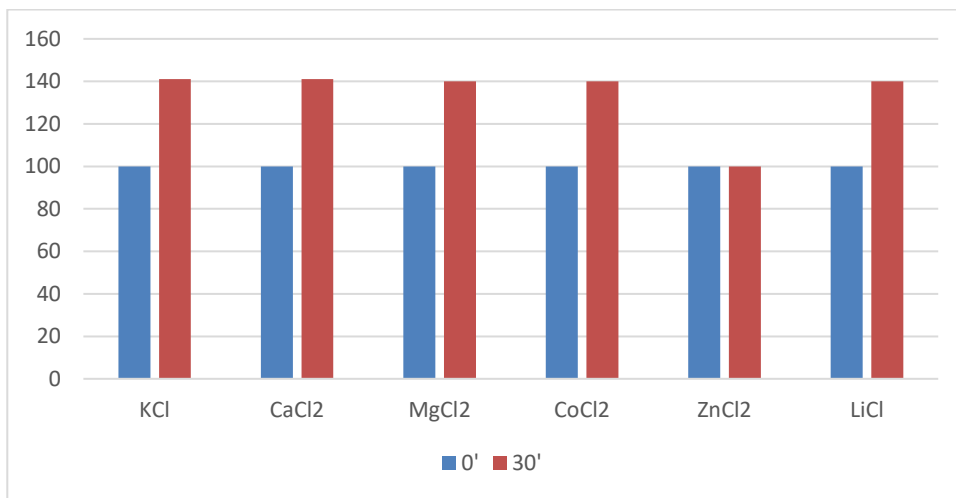
Lipazın pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim pH’sı 5,0 - 8,0 olan 50 mM fosfat tamponlarında, ve pH ‘ı 9,0 -10,0 olan 50 mM glisin tamponlarında enzimin en iyi çalıştığı optimum sıcaklıkta 360 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH’nın, optimum pH’sı olan 7 ve pH ‘ı 7,5 yakın olan pH değerleri olduğu görüldü. pH 10,0 ve 5’de ilk 60 dakikada enzim aktivitesinde önemli bir düşüş olduğu belirlendi (Şekil 13).



Şekil 13. *Bacillus sp.* L1S izolatının lipazına ait pH kararlılık grafiği

2.6.5. Metal İyon Etkisi

Bacillus sp. L1S izolatının lipazının aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; Mg^{+2} , Li, Ca^{+2} , K, Zn^{+2} ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzları ile gerçekleştirilmiştir. Enzim, ilave edilen 1 mM metal iyonlarıyla 30 dakika inkübe edilmiştir. Bekletilen enzimlerle para-nitrofenilbutirat substrat olarak kullanılarak aktivite bakılmıştır.(Şekil 14)

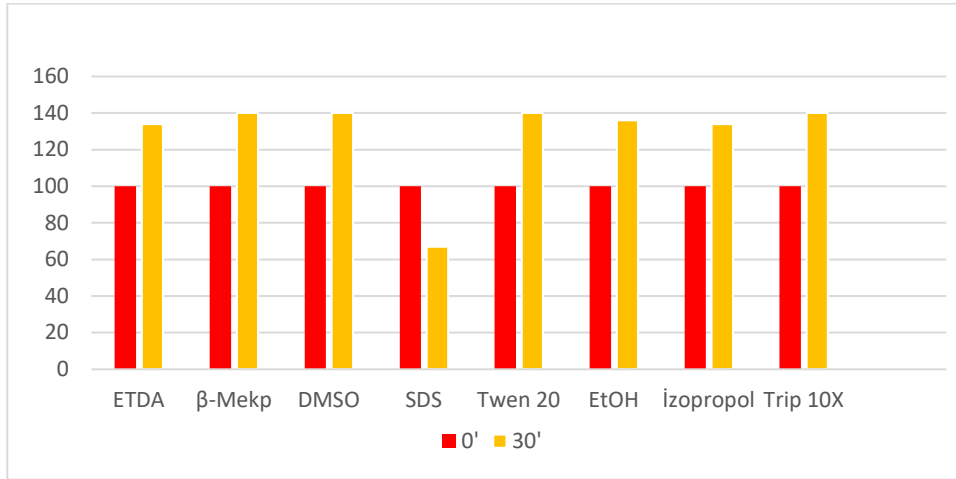


Şekil 14. *Bacillus sp.* L1S izolatına ait lipazın metal iyon etkisi grafiği

İnkübasyon sonucunda *Bacillus sp.* L1S izolatının Mg^{+2} , Li , Ca^{+2} , K ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzlarının enzim aktivitesini % 40 oranında artırdığı gözlemlenmiştir. Zn^{+2} metal tuzunun lipazın üzerine herhangi bir aktivite değişimi olmadığı gözlemlenmiştir.

3.6.6. İnhibitör ve Aktivatörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

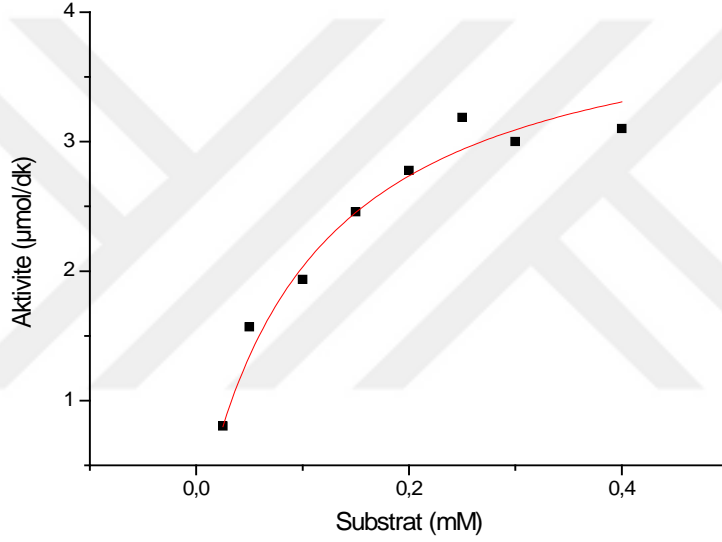
Deterjan ve organik çözücülerin *Bacillus sp.* L1S izolatının lipazının aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzim, 30 dk, % 1 (v/v) DMSO, β - merkaptoetanol, twen 20 etanol, izopropanol, tripton 10X, 5 mM EDTA, %0,1 (v/v) SDS içerecek şekilde 50 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta pNPB ile 20 dakikalık bir reaksiyon sonucunda ölçülmüştür. Enzimin kimyasalları içermeyen hali 100 kabul edilerek kimyasalları içeren enzimin % kalan aktivitesi hesaplanmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. *Bacillus sp.* L1S izolatına ait lipazın inhibitör ve aktivatör etkisi

3.6.7. Lipazın K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması

Bacillus sp. L1S izolatının lipazının substrat olarak *p*-nitrofenilbutirat varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Substrat olan *p*-nitrofenilbutirat için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/ K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri 0,11 mM y-eksenini kestiği nokta ise $1/ V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri 24,85 $\mu\text{mol/dk/mg}$ olarak hesaplandı (şekil 16).



şekil 16. *Bacillus sp.* L1S izolatının lipazına ait Michaelis- Menten grafiği

4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışma ile Artvin Yusufeli ve Aydın'ın Söke ilçesinden alınan Zeytinyağı katı atığından (pirina) lipaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalar aranmıştır. Rhodamine B ve substrat olarak zeytinyağı içeren LB agar içeren petirlere ekim yapılan mikroorganizmalardan UV altında ışımaya yapan 13 farklı suş seçilmiştir. Seçilen suşları %1'lik yağ içeren LB besiyerinde büyütülmüş ve her bir izolatın hem hücre içi hem hücre dışında ile 4-nitrofenil – butirat, 4- nitrofenil-kaprilat, 4- nitrofenil-laurat, 4- nitrofenil-miristat, 4- nitrofenil- palmitat substratları ile muamale edilmiş ve suşlar 16S rRNA analizi yapılmıştır. UV altında 1 günde ışımaya yapan ve C16 substratını parçalayan *Bacillus sp* L1S suşu seçilmiştir. L1S suşundan lipaz enzimi üretilmiş, saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Lipazlar (triasilgliserol asilhidrolazları; EC 3.1.1.3) yağ-su interfazı üzerinden trigliseridlerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen bir çeşit hidroliz sınıfıdır. Ayrıca, lipazlar esterlerin sentezinin yanı sıra diğer esterlerin hidrolizini ve transesterleşmesini katalizlerler ve enantioselektif özellikler gösterirler. Lipazların çok spesifik kimyasal transformasyon gerçekleştirme yeteneği onlara gıda, deterjan, kozmetik, organik sentez ve ilaç endüstrisinde gittikçe artan bir popülerite kazandırmıştır (Park ve ark, 2005; Gupta ve ark, 2007; Grbavcic ve ark, 2007; Franken ve ark, 2009). Lipazlar pek çok lipid teknolojisi biyoendüstrisine katkıda bulunmak amacıyla başta gelen biyokatalizörlerden biri olarak önem arz etmektedir ve hem in situ lipid metabolizması hem de ex situ kompleks endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadırlar (Joseph ve ark, 2008). 1980'lerden beri mevcut lipaz sayısı artmaktadır. Bu temel olarak; spesifikite, stabilite, pH ve sıcaklık gibi yeni ve spesifik özellikleri ile bu biyokatalizörlere olan talebin artmasının yanı sıra, mikroorganizmalardan elde edilen enzimin klonlanması ve ekspresyonunda elde edilen büyük başarıların sonucudur (Bornscheuer ve ark, 2002; Menoncin ve ark, 2009).

Bacillus sp. L1S izolatının lipazının aktivitesine hem floresans bir boya olan Rhodamine B ve zeytinyağı içeren LB agarda hem de p-nitrofenil butirat ile spektrofotometrik olarak bakılmıştır (Lee, vd. 1999). Lipaz üreten bakteriler petri üzerinde genellikle tribütrin (Lawrence ve ark. 1967) veya Tween 80 (Sierra.,1957) substrat olarak kullanılarak seçilmektedir. Bu substratlar gerçek lipazı tespit etmek için uygun değildir çünkü esterazlar da lipazlar gibi bu substratları parçalamaktadır. Bu nedenle lipazların

varlığını tespit etmek için bir çeşit triaçilgliserol olan zeytinyağı substrat olarak kullanılmıştır (Gisela kouker and Karl-Erich Jaeger, 1987). Lipaz aktivitesiyle serbest kalan yağ asitleri sayesinde Rhodamine B ile UV altında koloniler turuncu gözükmetedir. Lipaz geninin kaynağını oluşturan *Bacillus sp.* L1S kolonileri rhodamin B ve zeytinyağı içeren LB agarda UV altında turuncu renk vermektedir.

Endüstriyel reaksiyonlar göz önünde bulundurulduğunda ısıtma işlemi işletme için fazladan masraf ve enerji kaybına neden olur. Oda sıcaklığına yakın sıcaklıkta çalışabilen enzimlerle ısıtma işlemi yapılmaksızın aktivite gözlenmektedir. Deterjanlar da soğuk suda bile aktivite gösteren enzimler son zamanlarda rağbet görmektedir. Deterjan endüstrisinde tercih edilen *Acinetobacter radioresistensis* optimum sıcaklığı 45 °C olarak görülmüş ve yüksek sıcaklıklarda da aktivite göstermiştir. İzolatımız olan *Bacillus sp* L1S suşu 30°C ve oda sıcaklığına yakın sıcaklıklarda da aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu özelliğinden dolayı endüstriyel işlemlerde tercih edilebilir.

Ortamın pH'sı enzimin primer ve sekonder yapısını, dolayısıyla aktivitesini etkiler. Lipazlar sadece belirli pH değerlerinde katalitik olarak aktiftirler ve aktif bölgelerindeki grupların iyonlaşma durumu ve orjinlerine bağlıdır. Bazik, asidik ve nötral fonksiyoneller lipazların aktif bölgelerini kapsar ve bundan dolayı katalitik bölgedeki fonksiyonel gruplar iyonlaşma halinde aktiftirler. Çoğu Lipazlar için optimum pH 7 ile 9 arasında değiştiği bilinmektedir (Yılmaz,2010). Çalıştığı optimum pH bakımından *Bacillus sp* L1S izolatının lipazı, alkali ortamda asidik ortamdakinden daha iyi çalışması açısından literatürdeki diğer lipazlara benzediği görülmektedir.

Literatürde bulunan diğer lipazların moleküler ağırlıkları 30 kDa ile 103 kDa arasında değişmektedir. Bu çalışmada kullanılan *Bacillus sp* L1S kaynaklı lipazının moleküler ağırlığı ise yaklaşık 27 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu, endüstride kullanılan enzimlerin düşük moleküler ağırlıkta olmasının istenen bir özellik olması açısından bir avantaj olarak görülebilir.

Deterjan enzimlerinin ısı kararlı olması istenmektedir. Soğuk aktif lipazların deterjan formülasyonlarında enerji tüketimini azaltır ve tekstil liflerinin yıpranmaması için tercih edilir. (Feller ve Gerdey, 2003) . Soğuk aktif enzimler çevresel yükü azaltma için endüstriyle çevrelerde tercih edilmeye başlanmıştır (Vakhlu ve Kour, 2006). Deterjanlara soğuk aktif lipazlar eklenince doğada daha kolay çözülebilir hale getirilmekte, bununla birlikte doğaya herhangi bir tehlikeli kalıntı bırakmazlar sucul yaşamada zarar vermezler (Joseph ve ark., 2007). Deterjan endüstrisinde yaygın kullanılan lipazın kaynağı olarak

kullanılan *Acinetobacter radioresistens* ısı kararlılığı ve pH stabilitesi açısından değerlendirildiğinde 37 °C de enzimin aktivitesinin az olduğu 70 °C ise stabilitesini 2 saat koruyabildiği literatürde görülmüştür. (Khoramnia ve ark, 2011). Bir diğer tercih edilen ticari lipaz kaynağı olan *Pseudomonas mendocina* M-37 suşu incelendiğinde 30 °C 'de 2 saat boyunca stabilitesini koruduğu gösterilmiş. pH 7-11 arasında da stabilitesini 2 saat boyunca koruduğu ortaya konmuştur(Dahiya p.ve ark, 2010)*Bacillus sp* L1S izoları ısı kararlı kararlılığı incelendiğinde ise lipaz +4 °C aktivitesini 60 dakikalık inkübasyonda aktivitesini % 90 oranda, 25,30, 37 ve 45 °C de ise aktivitesini %80 oranında koruduğu gözlenmiştir. Optimum sıcaklığı olan 45 °C 'de ise enzim aktivitesi 180 dakikalık inkübasyon sonunda ölçüldüğünde aktivitenin % 20 olduğu görülmüştür. *Bacillus sp* L1S izolatının lipazı +4 °C aktivitesini 48 saat boyunca koruduğu gözlemlenmiştir. Endüstriyel açıdan değerlendirildiğinde *Bacillus sp* L1S izolatı lipaz açısından deterjanlarda tercih edilebilirliği görülmüştür. *Acinetobacter sp* (Khoramnia ve ark ,2011) stabilitesi 6 -11 arasında incelenmiş pH 10 da 2 saat boyunca stabil olduğu görülmüştür. *Bacillus sp* L1S izolatı pH kararlılığı açısından değerlendirildiğinde ise pH 5 – 10 aralığında 60 dakikalık inkübasyon sonucunda aktivitesinin aktivitesinin %80' e düştüğü gözlemlendi. Aynı pH aralıklarda ölçüm yapıldığında 180 dakikalık inkübasyon sonunda ise enzim aktivitesinin %40'a düştüğü gözlemlendi. Enzimin bu pH 'larda aktivitesini %40 oranında koruyor olması, alkali tolerant olarak kabul edilebilir düzeydedir. Langrand ve ark (1990) alkali pH'larda (pH=8.0-11.0, aralığında, kalan aktivite %50 ve üzeri) stabil olan enzimler, enzim katkılı toz ve sıvı deterjanlarda kullanılabilir potansiyelde olduğunu rapor etmişlerdir. optimum pH literatürdeki bakteriyal lipazlarla karşılaştırıldığında ise ortalama seviyede olduğu görülmektedir.

Farklı kimyasallar enzim aktivitesini, enzim çeşidi, reaksiyon koşulları, kimyasalın konsantrasyonu gibi pek çok parametreye bağlı olarak etkileyebilmektedir. Bu etkiler enzimin kullanılacağı prosese göre olumlu ve/veya olumsuz yönde olabilir. Kullanılacak proseste enzimin etkinliğini artırmak, uygun proses seçimi için öngörüle bulunmak veya proseste bulunması muhtemel kimyasalları değiştirmek gibi koşulların saptanması açısından bu parametre enzim karakterizasyonunda önem arz etmektedir. Hatta bazı enzimlerin çeşitli inhibitör, şelatör gibi kimyasallarla etkileşimi ile enzimleri belirli düzeyde sınıflandırmak mümkün olmaktadır. Yapılan çalışmada belirli kimyasalların *Bacillus sp*. L1S lipazın üzerinde etkisi incelenmiş. Çeşitli metal tuzları ile enzim muamele edilmiş ve 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda *Bacillus sp*. L1S izolatının Mg^{+2} , Li,

Ca^{+2} , K ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzlarının enzimin aktivitesini % 40 oranında artırdığı gözlemlenmiştir. Zn^{+2} metal tuzunun lipazın üzerine herhangi bir aktivite değişimi olmadığı gözlemlenmiştir. ETDA, β -merkaptoethenol, DMSO yapılan inkübasyon sonucu enzim aktivitesinde % 40 'a yakın bir aktivite gözlenmiştir ve SDS ile yapılan çalışma sonucu 30 dakikalık inkübasyon sonucunda enzim aktitesinde %20 oranında bir azalma görülmüştür. Twen 20 ,Trypton 10X , izopronanol ve etil alkol ile inkübasyonu ile yapılan deneylerde enzim aktivitesinin %40 oranında arttığı gözlemlenmiştir. Khoramnia ve ark 2011 yılında çalıştıkları *Acinetobacter sp.*'la karşılaştırıldığın da aktivite artış oranlarının benzer olduğu görülmüştür.



5. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada zeytinyağı katı atığından (pirina) lipaz aktivitesi olan mikroorganizmalar aranmış ve aktivitesi iyi olan *Bacillus sp* L1S izolatının optimum sıcaklık, optimum pH, metal iyon, inhibitör gibi kinetik parametreleri incelendi.

Aydın Söke ve Artvin Yusufeli ilçesinde alınan pirina örnekleri karıştırıldı. Karıştırılan pirina 0,45 µm filtreden geçirildi. LB üzerine bırakılan filtre üzerinde koloniler saflaştırıldı. Saflaştırılan kolonilerden lipaz aktivitesini petride gözlemlemek için Rhodamine B ve substrat olarak zeytinyağı içeren LB agar kullanıldı. 13 farklı suşun UV altında turuncu renk ışımaya yapıldığı görüldü. Işıma yapan izolatlar %1 yağ içeren LB içinde 3 gün inkübasyona bırakıldı. Her bir izolatın hem hücre içi hem hücre dışı lipaz aktivitesine bakıldı. Substrat olarak sırası ile 4-nitrofenil – butirat, 4- nitrofenil-kaprilat, 4- nitrofenil-laurat, 4- nitrofenil- miristat, 4- nitrofenil- palmitat substratları ile muamale edildi.

13 farklı suşa 16S rRNA analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucu gen sekans benzerliklerine göre izolatlar ; L1S *Bacillus sp.* , L2 *Bacillus sp.* , L3 *Bacillus sp.* , L5 *Bacillus sp.* , L6 *Bacillus sp.* , L7 *Bacillus sp.* , L8 *Bacillus sp.* , L9 *Bacillus sp.* , L10 *Bacillus sp.* , L11 *Bacillus sp.* , L12 *Bacillus sp.* , L13 *Bacillus sp.* , L15 *Bacillus sp.*'dir. UV altında 1 günde turuncu ışımaya yapması ve substratlar yapılan deneylerde C₁₆ parçalayan *Bacillus sp.*L1S izolatı seçildi.

Bacillus sp. L1S izolatının hem hücre içi hemde hücre dışı lipaz aktivitesine bakıldı. Hücre içi aktivitesinin aktivitesinin daha iyi olduğuna karar verildi. *Bacillus sp.* L1S izolatını lipazının optimum pH değerinin 8 optimum çalışma sıcaklığının ise 45°C olduğu tespit edildi. pH kararlılığı incelendiğinde 7,7,5,8 tamponlarında enzimin aktivitesini 2 saat süresince devam ettiği gözlemlendi. 3. Saatin sonunda ise aktivitenin %30 'lara düştüğü görüldü. Isıl kararlılığı incelediğinde ise 25,30 ve 37 °C sıcaklıklarda enzim aktivitesini 38 saat boyunca korumuş, 48 saat boyunca 4 °C enzim aktivitesini koruduğu görülmüştür.

Bacillus sp. L1S lipazın üzerinde etkisi incelenmiş. Çeşitli metal tuzları ile enzim muamele edilmiş ve 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda *Bacillus sp.* L1S izolatının Mg⁺², Li, Ca⁺², K ve Co⁺² metal iyonlarının klorür tuzlarının enzimin aktivitesini % 40 oranında artırdığı gözlemlenmiştir. Zn⁺² metal tuzunun lipazın üzerine

herhangi bir aktivite değişimi olmadığı gözlemlenmiştir. ETDA , β - merkaptobenol, DMSO yapılan inkübasyon sonucu enzim aktivitesinde % 40 'a yakın bir aktivite gözlenmiştir ve SDS ile yapılan çalışma sonucu 30 dakikalık inkübasyon sonucunda enzim aktitesinde %20 oranında bir azalma görölmüştür. Twen 20 ,Tripton 10X , izopronanol ve etil alkol ile inkübasyonu ile yapılan deneylerde enzim aktivitesinin %40 oranında arttığı gözlemlenmiştir.



6. ÖNERİLER

Lipaz enzimi, kolay ulaşımı, düşük substrat spesifitesi, yüksek kararlılık gibi birçok özelliğinden dolayı zaten endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadır. Lipazın prokaryotlardan ökaryotlara kadar çok çeşitli organizmalardaki yayılışı ve her türlü ortamda bulunabilirliğine dayanarak endüstride kullanımı için endüstriyel şartlara en iyi derecede uyum gösteren mikroorganizmalardan lipazın varlığı ve bu organizmalardaki moleküler yapı ve işlevleri araştırılabilir. Bu nedenle düşük sıcaklığa, yüksek pH ya ve kimyasal denatürasyona dayanıklı yeni enzimlerin elde edilmesine ihtiyaç vardır. Yapılan bu çalışmada enzimin çalışma pH ve sıcaklığının endüstride kullanılacak bir enzim olduğu tespit edildi fakat enzim daha ileri derecede karakterize edilmeli ve organik çözücü ortamlarındaki kararlılığı ve kimyasal sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği ayrıntılı bir şekilde ele alınmalıdır. Bunun için endüstride kullanılabilir olan lipaz enzimi taşıyan mezofilik bakteriler araştırılabilir. Ayrıca lipazın çeşitli tipteki organizmalarda yapılan değişken moleküler yapıları ve aktiviteleri göz önüne alınarak mutasyon ve mobilizasyon çalışmaları ile performansı artırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abigor R.D., Uadia P.O., Foglia T.A., Haas K.C., Okpefa J.E.ve Obibuzor J.U., 2000. Lipasecatalyze production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Bioche SocTrans*, 28, 979-81.
- Akkuş, P. 2006. Lipaz Kullanılarak Şeker Esteri Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Akoh, C.C.ve Min, D.B. 1998. Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification In Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Marcel Deccer, Inc,New York, 641-698.
- Arpigny, J. L.ve Jaeger, K. E., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343,177-183.
- Banerjee, U. C., Rajesh Kumar Sanı., Wamık Azmı., Raman Sonı, 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Proc Biochem.*, 35, 213-219
- Beisson, F., Tiss A., Riviere, C.ve Verger, R. 2000, Methods for Lipases Etection and Assay: A Critical Review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102, 133-153.
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßeler, M., Stürmer, R.ve Zelinski, T., 2004. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Ed*, 43,788-824.
- Brzozowski A.M., Erewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G. Awson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling F., Iluge-Jensen T., Patkar S.A. and Thim L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase inhibitor complex. *Nature*. 351:491-494.
- Bornscheuer, U.T.ve Kazlauskas, R.J. 1999, Hydrolases in organic synthesis. Weinheim: Wiley-VCH.
- Bornscheuer, U. T., 2002. Microbial Carboxyl Esterases, Classification, Properties and Application in Biocatalysis, *Fems Microbiology Reviews*, 26, 73-81
- Bjokling, F., Godtfredsen, S.E.ve Kirk, O. 1991. The future Impact of IndustrialLipases. *Trends in Biotechnology*, 9: 360-363.
- Candenas, F., Sde Castro, M., Sanchez-Mantero, J. M., Sinister, V. 2001, Novel Microbial Lipases, Catalytic Activity in Reactions in Organic Enzyme and Microbial Technology, 28:145-154

- Christen, G. L. ve Marshall, R. T., 1984. Selected Properties of Lipase and Protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 Produced in Four Media, Journal of Dairy Science, 67,1680-1687.
- Converse, C. A., Cooper, A. ve Nutley, M. A., 1981. A Radial-Diffusion Assay for Serum Lipase, Biochemical Society Transactions, 9, 320-321.
- 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.
- Fadıloğlu, S. 1996. Kinetics of Olive Oil Hydrolysis by Free and Immobilised *Candida rugosa* Lipase, Ph.D. Thesis, University of Gaziantep
- Gandhi, N. N., 1997. Applications of Lipases, Journal of American Oil Chemists Society, 74, 6, 621-634.
- Gandolfi, R., Marinelli, F., Lazzarini, A. ve Molinari, F., 2000. Cell-bound and Extracellular Carboxylesterases From *Streptomyces* Hydrolytic and Synthetic Activities, Journal of Applied Microbiology, 89, 870-875.
- Garrett, R., Grisham, C. 1999, Biochemistry, 2nd edition, edited by S. Kiselica, Saunder College Publishing, 426-435, Orlando, Florida.
- Gao, X. G., Cao, S. G. ve Zhang, K. C., 2000. Production, Properties and Application to onaqueous Enzymatic Catalysis of Lipase From a Newly Isolated *Pseudomonas* strain, Enzyme and Microbial Technology, 27, 74-82
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P. ve Davidson, S., 1996. Microbial Lipases Production and Applications, Science Progress, 79, 2, 119-157.
- Grenner, G., Deutsch, G., Schmidtberger, R. ve Dati, F., 1982. Hochempfindlicher Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Human-Pankreas-Lipase. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 20, 7, 515-519.
- 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.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbial Biotechnology, 64, 763–781.
- Gül, D. Ü, 2013. Fungal Lipazlar ve Endüstride Kullanım Alanları, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi;1-8
- Haddadin M.S., Abdulrahim S.M., Al-Khawaldeh G.Y. and Robinson R.K., 1999. Solid state fermentation of waste pomace from olive processing, J Chem Technol Biotechnol, 74, 613-618.

- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. 2006, Industrial Applications of Lipases. Enzyme Microb. Technol. 39, 235-251.
- Illanes, A. 2008, *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*, Springer, Chile.
- İşbakan, N., 2006. Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Saflıkta 1-fenil-1 Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. 1999, Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Threedimensional Structures and Biotechnological Applications of Lipases. Annu. Rev. Microbiol. 53, 315-351.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M. ve Misset, O., 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev. 5, 29–63.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998, Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology. TIBTECH, 16, 396-403.
- Kademi, A., Ait-Abdelkader, N. ve Fakhreddine, L., 1999. A Thermostable Esteras Activity From Newly Isolated Moderate Thermophilic Bacterial Strains, Enzyme and Microbial Technology, 24, 332-338.
- Karaca, N. 2006. Poli (N,N-Dimetilakrilamit-Ko-Akrilamit) ve Poli(Nİzopropilakrilam_ T-Ko-Akrilamit)/Karragenan Polimerler Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Janssen, P.H., Monk, C.R., Morgan, H.W., 1994. A thermophilic, Lipolytic Bacillus sp., and Continuous Assay of Its p-nitrophenyl-palmitate Esteras Activity, FEMS, Microbiol. Lett. 120, 195–200.
- Jarvis, G. M. ve Thiele, J. H., 1997. Qualitative Rhodamine B Assay Which Uses Tallow as a Substrate for Lipolytic Obligately Anaerobic Bacteria, Journal of Microbiological Methods, 29, 41-47.
- Jacks, T. J. ve Kircher, H. W., 1967. Fluorometric Assay for the Hydrolytic Activity of Lipase Using Fatty Acyl Esters of 4-methylumbelliferone, Analitically Biochememistry, 21, 279-284.
- Jensen, R.G. 1983. Detection and Determination of Lipase (acylglycerol hydrolase) Activity from Various Sources. Lipids 18, 650–657.
- Jette, J. F. ve Ziomek, Z., 1994. Determination of Lipase Activity by a Rhodamine-Triglyceride-Agarose Assay, Analitically Biochememistry, 219, 256-260.
- Johnson, P., Whateley, T.L. 1971, Use of Polymerizing Silica Gel Systems for Immobilization of Trypsin. J. Colloid Interface Sci. 37, 557-563.

- Langrand, G., Rondot, N., Triantaphilides, C. And Baratti, S. 1990, Short Chain Flavour Esters Synthesis by Microbial Lipases. *Biotechnol. Lett.* 12, 581– 586.
- Lanz, W. W. ve Williams, P. P., 1973. Characterization of Esterases Produced by a Ruminant Bacterium Identified as *Butyrivibrio Fibrisolvens*, *Journal of Bacteriology*, 113, 1170-1176.
- Lee, C.K, Low, K.S.ve Gan, P.Y. 1999. Removal of Some Organic Dyes by Acid- Treated Spent Bleaching Earth. *Process Biochem.* 34, 451-465.
- Lee, D.H., Kim, J.M., Kang, S.W., Lee, J.W., Kim, S.W. 2006. Pretreatment of Lipase with Soybean oil Before Immobilization to Prevent Loss of Activity. *Biotechnol. Lett.* 28, 1965.
- MacRae, A.R.ve Hammond, R.C. 1985. Present and Future Application of Lipases. *Biotechnol. Genetic Eng. Reviews* 3, 193–217.
- MacRae, A.R.ve Staines, H. 1994. Evaluation of Microbial Lipases as Fat Splitting Catalysts. *Fat. Sci. Technol.* 96, 430.
- Matsumoto, M., Sumi, N., Ohmori, K.ve Kondo, K. 1998. Immobilization of Lipase in Microcapsules Prepared by Organic and Inorganic Materials. *Process Biochemistry*,33, 535- 540.
- Matsumoto, M.ve Ohashi, K. 2003. Effect of Immobilization on Thermostability of Lipase from *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal* 14: 75–77.
- Matsuno, H., Nagasaka, Y., Kurita, K.ve Serizawa, T. 2007. Superior Activities of Enzymes Physically Immobilized on Structurally Regular Poly(methy methacrylate) Surfaces *Chem. Mater.* 19, 2174–2179.
- Metin, K., 2007. Moleküler Biyoloji, Protein Sentezi ve Yıkımı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 555-576 .
- Mohamed, M.A., Mohamed, T.M., Mohamed, S.A., Fahmy, A.S. 2000, Distribution of Lipases in the Geraminae. Partial Purification and Characterization Esterase from *Avena Fatua*. *Bioresource Technology*, 73, 227-234.
- Naka, Y. ve Nakamura, T., 1992. The Effects of Serum Albumin and Related Amino Acids on Pancreatic Lipase and Bile Salts Inhibited Microbial Lipases, *Bioscience Biotechnology and Biochememistry*, 57, 7, 1066-1070.
- Nelson, J.M., Griffin, E.G. 1916. Adsorption of Invertase. *J. Am. Chem. Soc.* 38: 1109–1916.
- 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.

- Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T. 2006. Lipase Catalyzed Methanolysis to Produce Biodiesel: Optimization of the Biodiesel Production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 142-147.
- Oguntimein, G.B. 1994. Lipase-catalysed Synthesis of Flavour Compounds in a Solvent-free Medium. *Meded. Fac. Landbouwwet, Rijksuniv. Gent*. 59, 2377.4
- Ruiz, L. ve Rodriguez-Fernandez, M. F. C., 1982. Kinetic Study of Hepatic Triglyceride Lipase From Rat Liver Soluble Fraction, *Enzyme*, 27, 215-219.
- Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, S.W., Bradoo, S., Gulati, R., 2008. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science Online*, 95,2.
- Sharma, R., Chistib, Y. and Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19; 627–662.
- Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Gupta, L.K. and Gupta, J.K. 2002. Purification and Characterisation of a Thermostable Alkaline Lipase from a new Thermophilic.
- Shu, Z. Y., Jiang, H., Lin, R. F., Jiang, Y. M., Lin, L. ve Huang, J. Z., 2010. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. *J Mol Catal B Enzym*, 62, 1-8.
- 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.
- Svendsen, A. 1994. Sequence Comparison with the Lipase Family. In: Woolley P, Petersen SB, editor. *Lipases, Their Structure Biochemistry and Application*. Cambridge: Cambridge University Press, 1–21.
- Öztürk, B. 2001. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey.
- Öztürk B., 2002. Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*. 12, 20-23.
- Öztürk, N. 2006. Hidrofobik Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Aydın Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Ozturk, N., Akgol, S., Arısoy, M. ve Denizli, A. 2007, Reversible Adsorption of Lipase on Novel Hydrophobic Nanospheres. *Separation and Purification Technology*, 58, 83-90.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29: 119-131.

- Takahashi, M., Koike, R., Ogasawara, K. 1995, Lipase Mediated Resolution of inden-1-ol. *Chem. Pharm. Bull.* 43. 1585–1587.
- Takahata, H., Uchida, Y., Ohkawa, Y., Momose, T. 1993, Enzymatic Resolution of N,Ndialkyl- 3-hydroxy-4-pentanamides, Unsuccessful in Resolution by the Katsuki– Sharpless Asymmetric Epoxidation. *TetrahedronAsymmetry* 4: 1041–1042.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çesme, İzmir-Türkiye, 326 s.
- Thompson, C.A., Delaquis, P.J.ve Mazza, G. 1999, Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity: a review. *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.* 39, 165–187.
- Tsai, S.W., Chen, C.C., Yang, H.S., Ng, I.S., Chen, T.L. 2006, Implication of substrate-assisted catalysis on improving lipase activity or enantioselectivity in organic solvents, *BBA Protein and Proteomics*, 1764, 1424-1428.
- Tsai, S.W., Liu, B.Y.ve Chang. C.S. 1996. Inhancement of (S)-Naproxen ester Productivity from Racemic Naproxen by Lipase in Organic Solvents. *J.Chem. Technol. Biotechnol.* 65, 156–162.
- Tsai, S. W., Lu, C. C. and Chang, C. S. 1996. Surfactant enhancement of (S)- naproxen ester productivity from racemic, naproxan by lipase in isooctane. *Biotechnol. Bioeng.* 51: 148–156.
- Tsai C.S. 2007. Biomacromolecules. Department of Chemistry, Carleton University, New Jersey. 11, 323-325.
- 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.
- Vakhlu, J ve Kour, A., 2006. Yeast Lipases: Enzyme Purification, Biochemical Properties and Gene Cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 69-85.
- Verger, R. 1997. Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts. *TIBTECH* 15: 32 38.
- Villeneuve, P., Mudehwa, J.M., Haas, M.J. 2000, Customizing Lipases for Biocatalysis a Survey of Chemical, Physical and molecular Biological Approaches. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.
- Von Tigerstrom, R. G. ve Stelmaschuk, S., 1989. The Use of Tween 20 in a Sensitive Turbidimetric Assay of Lipolytic Enzymes, *Journal of Microbiology*, 35, 511-514.
- White, J.S., White D.C. 1997. Source Book of Enzymes. Boca Raton: CRC Press.
- Williams, J.M.J., Parker, R.J., Neri, C. 2002. Enzymatic Kinetic Resolution in Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, 2nd ed. New York, NY: Wiley VCH, 1: 287- 12.

- Wilmesmeier S., Steuernagel S. ve Wiermann R, 1993. Comparative FTIR and ¹³C CP/MAS NMR spectroscopic investigations on sporopollenin for different systematic origins. *Z. Naturforsch*, 48, 697–701.
- Winkler, K.W., Ulrich, K., Stuckmann, M., 1979, Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bact.* 138, 663-670.
- Wiseman, A. 1995. Introduction to principles. In: Wiseman A (ed). *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 3rd edn. Ellis Horwood Ltd, Cornwall, 3–8.
- Won, K., Kim, S., Kim, K.J., Park, H.W. ve Moon, S.J. 2005. Optimization of Lipase Entrapment in Ca-alginate Gel Beads. *Process Biochemistry*, 40, 2149–2154.
- Yılmaz ,E ,2010 , Farklı Teknikler Kullanarak Değişik Destek Materyallerine Lipaz İmmobilizasyonu Ve Bir Anti-İnflammatör Olan S-Naproksenin Oluşumunda Kullanılması, Doktora Tezi Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya
- URL1. <http://www.aydinprina.com/>

EKLER

EK -1

Bacillus sp.L1S 16S rRNA sekans sonucu

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTC
GAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTT
GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGC
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCG
GATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGAC
GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC T GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT TAGGGGGTTTTCCGCC
CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCC TGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAG

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Rize’de doğdu. İlköğretimini Mehmet Akif Ersoy İlköğretim okulunda ve lise öğrenimini Fatih Lisesinde tamamladı.2008-2009 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesinde Biyoloji Bölümünde başladı. 2013 yılında Lisans öğrenimini tamamladı. 2013 yılında K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans eğitimine başladı. Halen burada eğitimine devam etmektedir.

