

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORGANİK ÇÖZÜCÜLERE DİRENÇLİ LİPAZ ÜRETEN
BAKTERİLERİN TOPRAKTAN İZOLASYONU ve ENZİMİN
KARAKTERİZASYONU

Kadriye KOÇOĞLU

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER

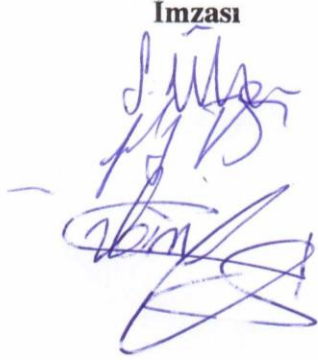
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE 2014

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORGANİK ÇÖZÜCÜLERE DİRENÇLİ LİPAZ ÜRETEN
BAKTERİLERİN TOPRAKTAN İZOLASYONU ve ENZİMİN
KARAKTERİZASYONU

Bu çalışma, 24/04/2014 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı, Soyadı	İmzası
Tez Danışmanı	: Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER	
Jüri Üyesi	: Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ	
Jüri Üyesi	: Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ	


Prof. Dr. Fatih YILMAZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Organik çözücü dirençli lipaz üreten bakterilerin araştırıldığı bu çalışma, Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgisini, sabrını ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER'e, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları yardımlarından dolayı doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanlığı'na ve maddi desteklerinden dolayı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: 2013.102.03.3) teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili aileme teşekkür ederim.

Kadriye KOÇOĞLU

Rize 2014

ÖZET

Organik Çözücülere Dirençli Lipaz Üreten Bakterilerin Topraktan İzolasyonu ve Enzimin Karakterizasyonu

Bu çalışmada çeşitli topraklardan izole edilen 30 bakteri izolatının ekstraselüler lipaz üretim kapasiteleri test edilmiştir. En iyi lipaz üreticisi olarak B5 izolatı seçilmiştir. İzolatın tanınması 16S rRNA gen bölgesine göre yapılmış ve Gen Bankası'ndaki baz dizisi çakışmasına göre *Burkholderia cenocepacia* olarak belirlenmiştir. Kantitatif ekstraselüler lipaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür ve 24 saat inkübasyon sonunda lipaz aktivitesi 7.59 U/mL, spesifik aktivitesi ise 263.16 U/mg olarak bulunmuştur.

B. cenocepacia B5 lipazının molekül kütlesi yaklaşık 30 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin Michaelis-Menten kinetik sabitleri olan K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 0.072 mM ve 263.16 U/mg olarak tespit edilmiştir. Enzimin 30-60 °C ve pH 5.0-10.0 arasında aktif olduğu, optimum aktiviteyi 50 °C ve pH 10.0'da gösterdiği tespit edilmiştir. Enzim, en yüksek aktiviteyi substrat olarak *p*-nitrofenil palmitatta göstermiştir. Metanol, etanol, 2-propanol, asetonitril ve aseton gibi organik çözücüler lipaz aktivitesinde artışa, DMSO ise azalmaya neden olmuştur. Bazı metal ve kimyasalların aktiviteyi arttırdığı (Al^{3+} , EDTA) görülürken bazılarının (Tween 80, Cr^{3+}) ise aktiviteyi azalttığı görülmüştür. B5 lipazının zeytinyağını yağ asitlerine parçaladığı ince tabaka kromatografisinde gösterilmiştir. *B. cenocepacia* B5 lipazının özellikleri incelendiğinde bu enzimin organik çözücülerde aktivitesinin iyi olması onun biyoteknolojik uygulamalar ve biyodizel üretiminde kullanılabilceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Burkholderia*, organik çözücü, lipaz.

SUMMARY

Isolation of Organic Solvents Tolerant Lipase Producing Microorganisms from Soil and Characterization of the Enzyme

In this study, extracellular lipase production capacity of 30 bacteria, isolated from various soils, were tested. Isolate B5 was selected as the most lipase producer. Identification of the microorganism was done by its 16S rRNA gene sequencing and it was determined *Burkholderia cenocepacia* according to the GeneBank sequence comparison. Quantitative extracellular lipase activity was determined spectrophotometrically and the maximum lipase activity was observed with 7.59 U/mL at 24 hours and the specific activity was found 263.16 U/mg.

The molecular mass of lipase enzyme was observed approximately 30 kDa with SDS-PAGE. Michaelis-Menten kinetic constant K_m and V_{max} values of *B. cenocepacia* B5 lipase were determined as 0.072 mM and 263.16 U/mg, respectively. It was observed the lipase was active at pH range of 5.0-10.0 and temperature on 30-60 °C, the optimum pH of the lipase was 10.00 and optimum temperature was 50 °C. The enzyme showed the highest lipase activity when *p*-nitrophenyl palmitate used as a substrate. Organic solvents such as methanol, ethanol, 2-propanol, acetonitrile, and acetone cause an increase in lipase activity but DMSO cause decrease. Some metals and chemicals increased activity (Al^{3+} , EDTA), whereas some were found to inhibit the activity (Tween 80, Cr^{3+}). It was displayed that lipase enzyme broke down the olive oil into fatty acids by thin-layer chromatography. It was concluded that the enzyme can be used in biotechnological applications and biodiesel production due to good activity in organic solvents when the characteristics of *B.cenocepacia* B5 lipase was investigated.

Keywords: *Burkholderia*, organic solvent, lipase.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	I
ÖZET	II
SUMMARY	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Lipaz Enzimi	2
1.3. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar.....	4
1.4. Lipazların Kullanım Alanları	5
1.5. Organik Çözücüler ve Enzimler.....	7
1.6. Biyodizel	8
1.7. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Katalizörler	9
1.7.1. Asit Katalizörler	9
1.7.2. Alkali Katalizörler.....	10
1.7.3. Enzim Katalizörler	10
1.8. Biyodizelin Önemi ve Avantajları	12
1.9. Biyodizelin Dezavantajları.....	12
1.10. Dünyada Biyodizel.....	13
1.11. Türkiye’de Biyodizel	13
1.12. Çalışmanın Amacı.....	14
1.13. Literatür Özeti	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	17
2.1. Materyal	17
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri	17
2.1.2. Kullanılan Tamponlar	18
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.2. Yöntem.....	19
2.2.1. Toprak Örneklerinin Alınması	19
2.2.2. Toprak Örneklerinin Seyreltilmesi.....	19
2.2.3. Lipolitik Bakterilerin Kalitatif Yöntemle Seçilmesi	19

2.2.4. Enzim Özüütünün Hazırlanması	19
2.2.5. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	20
2.2.6. Protein Tayini.....	20
2.2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	21
2.2.7.1. Substrat Boyaması	22
2.2.8. SDS Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	22
2.2.9. Organik Çözücü İçeren Besiyerinde Lipaz Üretimi	23
2.2.10. Saf Kültür Hazırlanması.....	23
2.2.11. Biyokimyasal Tanılama	23
2.2.11.1. Gram Boyama	23
2.2.11.2. İndol Oluşum Testi.....	23
2.2.11.3. Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer Testi (MR-VP)	24
2.2.11.4. Sitrat Kullanımı Testi	24
2.2.11.5. Maltoz, Laktoz, Trehaloz Kullanımı Testi	25
2.2.11.6. Kligler Iron Agar (KIA) Testi	25
2.2.11.7. Katalaz Testi.....	25
2.2.11.8. Oksidaz Testi.....	25
2.2.11.9. Jelatin Hidrolizi Testi	25
2.2.12. Moleküler Tanılama	26
2.2.12.1. DNA izolasyonu.....	26
2.2.12.2. Genomik DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi	26
2.2.12.3. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması	27
2.2.13. Lipaz Enziminin Karakterizasyonu.....	28
2.2.13.1. Enzim Aktivitesine İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	28
2.2.13.2. Enzim Aktivitesine Farklı Yağların Etkisi	28
2.2.13.3. Enzim Aktivitesine pH'ın Etkisi ve pH Kararlılığı.....	28
2.2.13.4. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi ve Sıcaklık Kararlılığı.....	28
2.2.13.5. Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	29
2.2.13.6. Enzim Aktivitesine Farklı Substratların Etkisi	29
2.2.13.7. Enzim Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi	29
2.2.13.8. Enzim Aktivitesine Çeşitli Kimyasalların Etkisi	29
2.2.13.9. Enzim Aktivitesine Organik Çözücülerin Etkisi.....	30
2.2.13.10. Zeytinyağı Hidrolizi.....	30

3. BULGULAR.....	31
3.1. Lipolitik Bakterilerin Kalitatif ve Kantitatif Yöntemle Seçilmesi	31
3.2. Organik Çözücü İçeren Besiyerinde Lipaz Üretimi.....	32
3.3. Biyokimyasal Tanılama	33
3.4. Moleküler Tanılama.....	33
3.5. <i>p</i> -NPP Standardı.....	34
3.6. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	35
3.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve SDS Jel Elektroforezi	35
3.8. Lipazın Biyokimyasal Karakterizasyonu	36
3.8.1. Enzim Aktivitesine İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	36
3.8.2. Enzim Aktivitesine Farklı Yağların Etkisi	37
3.8.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi ve pH Kararlılığı.....	38
3.8.4. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi ve Sıcaklık Kararlılığı.....	39
3.8.5. Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	40
3.8.6. Enzim Aktivitesine Farklı Substratların Etkisi.....	41
3.8.7. Enzim Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi	42
3.8.8. Enzim Aktivitesine Çeşitli Kimyasalların Etkisi	43
3.8.9. Lipaz Aktivitesine Organik Çözücülerin Etkisi	43
3.9. Zeytinyağı Hidrolizi.....	44
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	45
5. ÖNERİLER.....	51
6. KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Transesterifikasyon reaksiyonu	11
Şekil 2. Farklı izolatların Rhodamin B agarda lipaz aktiviteleri	31
Şekil 3. Farklı izolatların kantitatif yöntemle lipaz aktiviteleri	31
Şekil 4. Standart olarak kullanılan 4-nitrofenol grafiği	34
Şekil 5. Ham enzim özütü ve seyreltmelerin Doğal PAGE bantları	35
Şekil 6. Ham enzim özütü ve seyreltmelerin SDS-PAGE profilleri	36
Şekil 7. B5 lipazına inkübasyon süresinin etkisi	37
Şekil 8. B5 lipaz üretimine farklı yağların etkisi	37
Şekil 9. B5 lipazına pH'nın etkisi	38
Şekil 10. B5 lipazının pH kararlılığı	39
Şekil 11. B5 lipazına sıcaklığın etkisi	39
Şekil 12. B5 lipazının sıcaklık kararlılığı	40
Şekil 13. <i>p</i> -NPP varlığında lipazın substrat doygunluk eğrisi	40
Şekil 14. Lineweaver-Burk grafiği	41
Şekil 15. B5 lipazının farklı substratlara karşı spesifitesi	42
Şekil 16. B5 lipazına bazı metal iyonlarının etkisi	42
Şekil 17. B5 lipazına bazı kimyasalların etkisi	43
Şekil 18. B5 lipazının organik çözücülerdeki kararlılığı	44
Şekil 19. B5 lipazının zeytinyağı hidrolizi	44

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri	21
Tablo 2. SDS jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri.....	22
Tablo 3. Organik çözücü içeren besiyerinde üreyebilen izolatlar	32
Tablo 4. B5 izolatının tanılanmasında kullanılan biyokimyasal testler	33
Tablo 5. Moleküler tanılanması yapılan izolatlar	34

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Sığır serum albumini
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
CO ₂	: Karbondioksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E.C.	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
G	: gram
h/h	: hacim/hacim
H ₂	: Hidrojen
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
kDa	: Kilodalton
KIA	: Kligler Iron Agar
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
LB	: Luria Bertani
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MR-VP	: Metil Red-Voges Proskauer
NaDC	: Sodyum deoksikolat
NB	: Nütrient Broth
NCBI	: Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
nm	: Nanometre
<i>p</i> -NPA	: <i>p</i> -nitrofenil asetat
<i>p</i> -NPB	: <i>p</i> -nitrofenil bütirat
<i>p</i> -NPL	: <i>p</i> -nitrofenil laurat
<i>p</i> -NPP	: <i>p</i> -nitrofenil palmitat

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TEMED	: N,N,N,N'-Tetrametiletilendiamin
THL	: Tetrahidrolipsatin
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
vd.	: ve diğerleri
V_{maks}	: Maksimum hız
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Son yıllarda pek çok sanayi dalında uygulama alanı bulan enzimler, günümüzde yeni kullanım alanlarının ortaya çıkmasıyla giderek önem kazanmaktadır. Dünya geneli incelendiğinde endüstriyel enzimlerin ticari pazar payının yaklaşık 1.6 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Schallmey vd., 2004). Günümüzde birçok kullanım alanına sahip olan enzimlerin, uygulama alanlarına göre dağılımına bakıldığında % 29'unun gıda sektöründe, % 15'inin hayvan yemi tüketiminde, % 56'sının ise genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk vd., 2002; Schallmey vd., 2004). Modern üretim tekniklerinin gelişmesine paralel olarak enzim biyoteknolojisi de önemli ölçüde gelişmektedir. Öyle ki endüstriyel enzimlerin üretiminin dünya pazar payı 1995-2000 yılları arasında 1 milyar dolardan 1.5 milyar dolara çıkmıştır (Kirk vd., 2002).

Endüstriyel enzim pazarında büyük paya sahip olan hidrolitik enzimler içinde yer alan lipazlar, endüstriyel uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadır (Jaeger vd., 1994; Pandey vd., 1999). Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ile biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan araştırmalarda önem kazanmaktadır (Gözükara, 2009).

Enzimler çok farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Bunlar bitkisel kaynaklı enzimler, hayvansal kaynaklı enzimler ya da mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir. Günümüz sanayisinde kullanılan enzimlerin yaklaşık % 90'ı mikroorganizmaların fermentasyonu ile üretilmektedir (Gupta vd., 2003).

Mikrobiyal enzimlerin birçok avantajı vardır. Mikroorganizmaların enzim kaynağı olarak yaygın bir şekilde kullanılmasının nedeni, enzim üretme aktivitelerinin yüksek olması, diğer enzim kaynaklarına göre daha az yan ürün oluşturmaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, istenilen büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta üretilibilmeleridir (Kıran ve Çömlekçioğlu, 2003). Mikrobiyal enzimlerin biyoteknolojik süreçlerle daha ekonomik olarak üretilmesi, ayrıca suda çözünmeyen yapılara bağlanıp immobilize hale getirilerek daha uzun süre kullanılabilmesi, ortam koşullarının değiştirilmesiyle ya da genetik manipülasyonlarla, sentezlenen enzim miktarının binlerce kez artırılması sayesinde endüstriyel alanda enzim kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Gümüsel vd., 2002).

Her geçen gün farklı endüstrilerde önemi artan lipazların ticari amaca yönelik kullanımı başlangıç aşamasındadır. Bu nedenle yeni mikrobiyal kaynakların bulunmasına, enzim üretiminin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Gupta vd., 2004).

Enzimlerin, endüstriyel uygulamalarının çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilmektedir. Sucul olmayan ortamlarda ise enzimolojinin gelişimiyle, lipazın uygulama alanları da büyük ölçüde artmıştır. Geçtiğimiz yıllarda lipazlar organik sentez, yağ modifikasyonu ve rasemik kararlılığından dolayı yeni kullanım alanları bulmuştur (Gao vd., 2000). Organik çözücülerde aktif olan birçok lipaz, esterifikasyon, transesterifikasyon, peptitlerin ve diğer kimyasalların sentezini içeren yararlı reaksiyonları katalizlemektedir. Lipazlar, doğal olarak triaçilgliserollerin ester bağlarını parçalayan hidrolitik aktiviteye sahip olsalar da, suyun az bulunduğu ortamlarda ester sentezini katalizleyebilirler. Karışımdaki suyun miktarı, lipaz katalizleme reaksiyonunun yönünü tayin eder. Suyun çok az olması veya hiç bulunmaması halinde esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları tercih edilmektedir. Suyun fazla olduğu durumlarda ise sadece hidroliz reaksiyonu meydana gelmektedir (Sharma vd., 2001).

Bitkisel yağlardan transesterifikasyon reaksiyonu (alkoliz) ile biyodizel elde edilmektedir. Transesterifikasyon reaksiyonunda triaçilgliserol, monohidrik bir alkolle (etanol, metanol), katalizör (asidik, bazik katalizörler ile lipazlar) varlığında ana ürün olarak yağ asidi esterleri ve gliserol vererek esterleşir. Ayrıca esterleşme reaksiyonunda yan ürün olarak di- ve monogliseridler ile serbest yağ asitleri oluşur. Lipaz enzimi ile elde edilen biyodizel daha temizdir ve saflaştırmaya daha az ihtiyaç duymaktadır (Nelson vd., 1996; Öndül vd., 2007). Enzimatik dönüşüm atık oluşturmadığından bu işlemin gerçekleştirilmesi hem daha ucuz hem de çevreye daha duyarlıdır (Shimada vd., 2002).

1.2. Lipaz Enzimi

Triaçilgliserolleri hidroliz ederek yağ asitleri ve gliserole dönüştüren lipazlar lipit-su ara yüzeyinde aktiftir (Chen vd., 2003). Lipazlar pek çok uygulaması ve endüstriyel potansiyeli olan önemli bir hidrolitik enzimdir. Lipazlar, enzim sınıflandırmasında hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) ve triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar (Anonim, 1992).

Lipolitik enzimler, genellikle karboksiesterazlar (EC: 3.1.1.1) olarak adlandırılan esterazları ve lipazları içermektedir. Esterazlar ve lipazlar arasındaki dikkat çekici temel fark; esterazların suda çözünen kısa zincirli trigliseridleri ($C \leq 12$) hidrolizlerken, lipazların suda çözünmeyen uzun zincirli ($C \geq 12$) açığliseridleri hidrolizlemesidir. Yani lipazların substrat hidrofobikliği esterazlara göre daha yüksektir. Lipazlar arayüzey aktivasyonu göstermeleri ve enantiyoseçici özelliğinin daha yüksek olması nedeni ile esterazlardan ayrılmaktadır (Eggert vd., 2002; Faiz, 2005).

Lipazlar normal şartlar altında bitkisel ve hayvansal yağların tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar çok yüksek sıcaklık, pH değerlerinde ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılıktadır. Bu özellikler lipaz enzimine düşük sıcaklık ve basınçta reaksiyonları katalizleme imkanı sağlamaktadır (Paiva vd., 2000, Villeneu vd., 2000).

Lipazları kullanılabilir ve çekici kılan, ilk olarak mükemmel bir kimyasal seçicilik, bölgesel seçicilik ve çift yönlü seçicilik göstermeleridir. İkinci olarak da fungus ve bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından yüksek verimlerle üretildiğinden büyük miktarlarda kullanılabilir olmalarıdır. Üçüncü olarak ise, çoğu lipazın kristal yapılarının sırları bilimsel araştırmalarla çözülmüş olmaları ve mühendislik stratejilerinin tasarımını oldukça kolaylaştırmalarıdır. Bütün bu özelliklerden dolayı, organik kimya sektöründe en çok kullanılan biyokatalizör lipazlardır (Kamini vd., 2000).

Lipazlar, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerden elde edildiği gibi (Bornscheuer vd., 2002), *Candida antarctica* (Bornscheuer vd., 2002) *Trishosporon fermentas* (Chen vd., 1992) gibi maya hücrelerinden ve *Rhizopus arrhizus* (Elibol ve Dursun, 2000) gibi funguslardan da elde edilebilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu mikrobiyal lipazlar, üretildiği mikroorganizmadan mikrobiyolojik işlemlerle izole edilip saflaştırılarak elde edilir. Günümüze kadar mikroorganizmalardan, hayvanlardan ve bitkilerden izole edilen 50'den fazla lipaz çeşidi vardır.

Lipazlar, doğada bulunuş sekline göre şöyle sınıflandırılabilir:

Mikroorganizma Lipazları: Bakteriyel lipazlar: *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus faecalis*. Mantar türü lipazlar: *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*

Hayvansal Lipazlar: Doku lipazları (lipoprotein lipaz, adipoz dokusu lipazı, karaciğer lipazı), sindirim sistemi lipazları (pankreas lipazı, ince bağırsak lipazı), süt lipazları.

Bitkisel Lipazlar: Buğday, yulaf, mısır lipazları.

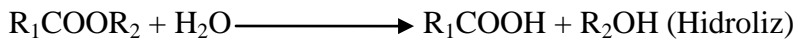
Bakteri kaynaklı lipazlar, aşağıdaki fizyolojik ve fiziksel özelliklerinden dolayı kullanışlıdır;

- Fazla miktarda saflaştırılmış lipaz mevcuttur.
- Bakteri kaynaklı lipazlar genellikle hayvansal veya bitkisel kaynaklı lipazlara göre daha kararlıdır.
- Lipazlar oda sıcaklığında aktiftir; böylece normal şartlarda, yüksek sıcaklık ve basınçlarda yürütülmesi gereken tepkimeler için harcanan enerji ortadan kalkmış olur. Ayrıca yüksek sıcaklık ve basınçta kararsız reaktantların ve ürünlerin zarar görmesi engellenir.
- Termofilik mikroorganizmaların ve enzimlerin yüksek sıcaklıkta, elverişsiz kimyasal ortamlarda kararlı olmaları büyük avantajdır.
- Lipazlar organik çözücü ortamlarında dahi aktifliğini korur.
- İmmobilize lipazlar kullanıldığında reaktör sıcaklığı 70 °C'ye kadar çıkabilmekte ve reaksiyon süresince enzim aktivitesi korunmaktadır (Hasan vd., 2006).

1.3. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

Lipazlar temel olarak triaçilgliserollerin hidrolizinden sorumlu enzimlerdir. Lipazlar geniş substrat spesifitelerinden dolayı çok çeşitli reaksiyonları katalizleyebilirler. Bunun yanında lipazların sentez reaksiyonlarını geri dönüşümlü olarak katalizleyebilme özellikleri de vardır.

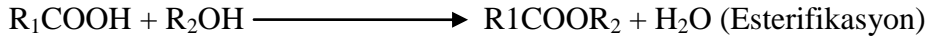
Hidroliz: Bir yağ veya esterin suyun varlığında kendini oluşturan asit ve gliserole veya alkole ayrılmasını ifade eder. Yağların geleneksel kimyasal yöntemlerle parçalanması yüksek sıcaklık ve basınçta gerçekleşir. Enzimatik metotlarda reaksiyon koşulları daha ılımlıdır, çalışma riski daha azdır, enerji tüketimi daha düşüktür ve istenmeyen yan reaksiyonlar oluşmaz (Gandhi, 1997).



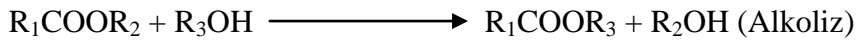
Sentez: Sentez reaksiyonları 2 başlık halinde incelenebilir:

Esterifikasyon: Susuz ortamda veya düşük oranda su bulunan ortamda gerçekleşmektedir (ortamdaki su miktarı kontrol edilebilirse yüksek verimli ürünler elde edilebilmektedir). Temel olarak bir asidin alkolle reaksiyonunu kapsar (Divakar ve Manohar, 2007). Esterifikasyon su ve ester oluşumuna yol açarken, alkoliz, asidoliz ve

interesterifikasyon gibi transesterifikasyon işlemleri sırasında su yerine alkol, asit veya ester oluşur (Gandhi, 1997).



Transesterifikasyon: Bir ester ve bir asit arasında (asidoliz), bir ester ile başka bir ester arasında (interesterifikasyon) veya bir ester ile bir alkol arasında (alkoliz) açıl gruplarının yer değiştirmesidir (Villeneuve vd., 2000; Sökmen, 2005).



1.4. Lipazların Kullanım Alanları

Günümüzde, lipazların birçok sektörde kullanım alanı bulunmaktadır:

Süt ürünleri endüstrisinde; süt yağının hidrolizi için lipazlar kullanılmaktadır. Günümüz uygulamaları, peynir aromasının artırılması, peynir olgunlaşmasının hızlandırılması, peynir benzeri ürünlerin imalatı ve kaymak hidrolizi işlemlerini içermektedir. Lipazların ilavesi öncelikle kısa zincirli (C4 ve C6) yağ asitlerinin uzaklaştırılmasıyla keskin ve hoş aromanın gelişmesine yol açar; orta zincirli (C12 ve C14) yağ asitlerinin uzaklaştırılması ise üründe sabunumsu bir tat oluşumuna yol açmaktadır. *Mucor miehei*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* gibi tamamen bir dizi mikrobiyal lipazlardan hazırlanmış preparatlar peynir imalatı endüstrisi için geliştirilmiştir. Birçok kaliteli peynir sadece mikrobiyal lipazların veya çeşitli preparatlarının karışımlarının kullanıldığı süreçlerde üretilmiştir (Saxena vd., 1999).

Deterjan endüstrisinde lipazlar; deterjanlardaki istenmeyen kimyasalların azaltılmasını sağlar ve zararlı kalıntı bırakmadan biyolojik olarak ayrıştırılabilirler. Ayrıca daha düşük yıkama sıcaklığı sağlayarak enerji tasarrufuna katkıda bulunurlar. Günümüzde hidrolitik lipazların ticari olarak en önemli uygulama alanı ev ve sanayideki çamaşır yıkama ile evde bulaşık yıkama da kullanılan deterjanlara katılmalarıdır. Her sene tahmini olarak üretilen yaklaşık 13 milyar ton deterjana 1000 ton lipaz katılmaktadır. Deterjana suyun eklenmesi ile birlikte deterjandaki lipaz, amilaz, selülaz ve proteaz enzimleri deterjandaki kimyasal bağların parçalanmasına katalizörlük yaparlar (Jaeger ve Reetz 1999; Pandey vd., 1999).

Gıda endüstrisinde lipazlar; katı ve sıvı yağlar gıdaların önemli bileşenleridir. Trigliseritlerin fiziksel özellikleri, besin değeri ve lezzeti; gliserol omurgasındaki

yağasidinin konumundan, zincir uzunluğundan ve doymunluk derecesinden etkilenir. Lipazlar, gliserol omurgasındaki yağasidi zincirinin konumunu değiştirerek, lipitlerin özelliklerinin değişimine olanak sağlar. Göreceli olarak ucuz olan bu yöntem, yağın daha değerli bir yağa dönüşümüne olanak tanır (Sharma vd., 2001).

Kozmetik ve parfüm endüstrisinde; kokuların transesterifikasyon ile üretimi ve rasemik ara ürünlerin ayrıştırılmasında lipazlardan faydalanılmaktadır. *Pseudomonas cepacia* tarafından üretilen lipaz, sitronelolün bromometoksilasyonu sonucu elde edilen rasemik gül oksitlerinin ayrıştırılmasında kullanılmaktadır (Taneja vd., 2005).

Lipazların kağıt endüstrisinde kullanımı; katran veya odunun hidrofobik bileşenleri (başlıca trigliseridler ve balmumu), kağıt hamuru ve kağıt üretiminde pek çok probleme sebep olmaktadır. Lipazlar kağıt yapımı için üretilen kağıt hamurundan katranın çıkarılması için kullanılmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998).

Yağ endüstrisinde lipazlar; yağlar gıda endüstrisinde oldukça önemlidir (Sharma vd., 2001). Gliserol iskeletinde yağ asidinin pozisyonu, yağ asidini zincir uzunluğu ve doymamış yağ oranı gibi faktörler trigliseritin fiziksel yapısını, besinsel değerini önemli ölçüde etkilemektedir (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001). Lipazlar, gliseritteki yağ asit zincirlerinin konumunun değiştirilmesi ve bir veya daha fazla yağ asidinin yeni bir tane ile yer değiştirmesiyle lipitlerin özelliklerinin farklılaşmasına olanak sağlar Böylece diğer yağlardan daha ucuz ve kaliteli yağlar elde edilir (Sharma vd., 2001).

Organik madde sentezinde lipaz kullanımı; lipazlar 'kemo', 'regio' ve 'stereo seçici' transformasyon reaksiyonlarının birçok çeşidini katalizleyebilir. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır. Bu enzimler hidrofilik-lipofilik ara yüzeyde çalışırlar ve reaksiyon karışımındaki organik çözücülere karşı tolerans gösterirler (Sharma vd., 2001).

Kimyasal tarım maddeleri endüstrisinde lipazlar; pestisitler, insektisitler ve kimyasal tarım ürünlerinde, yararlı diğer bileşiklerin üretimindeki ara ürünlerin sentezinde kullanılmaktadır. *Pseudomonas* sp. türlerinden elde edilen lipazlar, insektisit ve fungusitlerin transesterifikasyon ve ayrışma reaksiyonları üzerinde çalışılmıştır (Xu vd., 2005).

Ester sentezlerinde lipazlar; esterlerin sentezinde etkin katalizörler olarak kullanılmaktadır. Kısa zincirli yağasitlerinden elde edilen esterler, gıda endüstrisinde tatlandırıcı ve lezzet arttırıcı olarak, uzun zincirli yağasitlerinin metil ve etil esterleri ise, dizel yakıtları zenginleştirmede kullanılmaktadır. Literatürde *Candida antarctica*'dan

elde edilen lipaz ile hekzan içinde gerçekleştirilen, alkol ve laktik asit esterifikasyon çalışmalarıyer almaktadır (Sharma vd., 2001).

Lipazların atık arıtımı işlemlerine kullanılması; yağ içeren atıkların degradesyonu için lipazlar kullanılır (Masse vd., 2001). Atık su uygulamalarında lipazlar, sulu çamurda ve havalandırılmalı tank yüzeylerinde, yüzeydeki oksijen geçişine imkân sağlanması için yüzeyde biriken ince yağ bariyerinin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bunlar aynı zamanda biyofilm birikintisi, yağla kontamine olmuş topraklar ve zehirli gazların arıtımında da kullanılır (Pandey vd., 1999).

Oleokimyasal endüstride lipazlar; alkoliz, hidroliz, asidoliz reaksiyonlarında termal dereceyi en aza indirmek ve enerjiyi korumak için lipazlar kullanılır (Vulfson, 1994).

Biyodizel üretiminde lipazlar; çift yönlü kataliz özelliğine sahip olan lipaz enzimi organik çözücülerin varlığında ve yokluğunda aktivite gösterir. Literatürde lipaz katalizli, ayçiçeğinden, soya yağından, karışık bitkisel yağlardan, gres ve donyağından ve çeşitli yağlardan biyodizel çalışmaları mevcuttur (Mittelbach, 1990; Nelson vd., 1996; Kaieda, 1999; Abigor vd., 2000; Watanabe, 2000; Kamini ve Lefuji, 2001). Son yıllarda biyodizel üretiminde kullanılacak enzim katalizörlerinden, doğal substratı yağlar olan lipazlar araştırılmaktadır (Çoban, 2009).

1.5. Organik Çözücüler ve Enzimler

Organik çözücüler, substratların çözünürlüğünün artmasına, ürünlerin kolayca geri kazanılmasına ve sentetik reaksiyonlarda değişken dengenin ileri yönde gitmesine yardımcı olmaktadır (Zhang vd., 2009). Organik çözücülerde stabilite, lipazların düşük su oranı içeren sistemlerde gerçekleştirilen sentez reaksiyonlarında kullanımında istenen önemli bir özelliktir (Lima vd., 2004). Organik çözücülere dayanıklı lipazlar biyopolimerlerin sentezinde, transesterifikasyon reaksiyonlarında ve biyodizel üretiminde etkili katalizörler olarak rol oynamaktadır (Dizge vd., 2009; Singh vd., 2010).

Enzimler fizyolojik koşullarda genellikle sulu ortamda, normal sıcaklık, basınç, nötral pH'da reaksiyonları katalizlemektedir. Su, iyi bir çözücü olmasına rağmen yüksüz organik moleküllerin düşük çözünürlüğü nedeniyle pek çok sentetik organik reaksiyon için zayıf bir çözücüdür. Endüstriyel açıdan bakacak olursak yüksek kaynama

noktası ve düşük buhar basıncı, su-temelli biyotransformasyon reaksiyonları sonucu oluşan ürün(ler)in izolasyonunun pahalı olmasına neden olur (Çadircı, 2009).

Enzimlerin su yerine çözücü içeren organik ortamlarda kullanımının avantajları şöyledir:

- Apolar substratların çözünürlüklerinin artması,
- Termodinamik dengenin hidrolizden senteze değişmesi,
- Suya bağımlı yan reaksiyonların baskılanması,
- Substrat spesifikliğinin değişimi,
- Enzimin filtrasyon veya santrifüj ile kolayca geri kazanılması,
- Ürün geri kazanımının düşük buhar basınçlı ve kaynama noktalı çözücülerde kolay olması,
- Enzimlerin kimyasal süreçlerde doğrudan kullanılabilmesi ve mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesidir (Çadircı, 2009).

Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakterilere göre, daha yüksek organik çözücü toleransı gösterirler. En yüksek organik çözücü toleransı *Pseudomonas* türleri gösterir. *E. coli* göreceli olarak yüksek tolerans göstermektedir. Organik çözücü direnç düzeyleri bazı durumlarda aynı cins suşları arasında dahi değişiklik göstermesine karşın, bazı cinslerin organik çözücülere karşı direnç seviyeleri hemen hemen aynıdır (Nakajima vd., 1995). Her bir mikrobiyal hücrenin organik çözücü direnç düzeyi, onun fizyolojik durumu ile ilişkili olmasına karşın, büyük bir olasılıkla genetik olarak belirlenmektedir. Organik çözücülere dirençli lipaz üreten bakteriler kullanılarak biyodizel üretiminde önemli adımlar atılmış olacaktır (Aono vd., 1992).

1.6. Biyodizel

İlk olarak Walton'un, dizel motorda bitkisel yağları kullanması üzerine çıkan problemler karşısında trigliseridleri yapışları olan yağ asitlerine parçalayarak yakıt olarak kullanmayı önermesiyle "biyodizel" kavramı ortaya çıkmıştır. Bitkisel ve hayvansal yağlarda bulunan trigliseritlerin metil alkolle ester değişimi reaksiyonundan elde edilen yakıt biyodizeldir (Graboski ve McCormick, 1998).

Biyodizel, biyolojik olarak parçalanabilen, yenilenebilen, yanmaz ve toksik olmayan bir yakıttır. Biyodizel yağ asidinin bir metil esteri olarak tanımlanmakta ve FAME (yağ asidi metil esteri) adıyla ifade edilmektedir. Yükselen petrol fiyatlarına

bağlı olarak biyodizele olan ilgi de artmaktadır. Biyodizel soya fasülyesi yağı, pirinç kepeği yağı, ayçiçek yağı, hurma yağı gibi sebze yağlarından, pamuk yağı, jatrofa (tropikal bir bitki) yağı, hayvan yağı, atık sıvıyağlar ve endüstriyel asit yağlarından üretilmektedir. Gerek tarımsal hammaddelerdeki yağdan kolaylıkla elde edilebilmesi, gerekse petrol dizeli ile her oranda karışabilmesi ve dizel motorlarda herhangi bir değişiklik gerektirmeden doğrudan yakıt olarak kullanılabilmesi gibi özellikleri nedeniyle biyodizel alternatif sıvı yakıtlar içerisinde en avantajlı konuma sahiptir (Lin ve Lin., 2005; Tesser vd., 2005).

Biyodizel yüksek oranlarda elde edilmesine rağmen, yüksek fiyatından dolayı kullanımı sınırlıdır. Biyodizel, fiyatını aşağılara çekmek ve kullanımını artırmak için, düşük maliyetli veya atık sayılan substratların biyodizel üretiminde kullanımı iyi bir alternatif olabilir. Lipazlar çift yönlü kataliz özelliğine sahip olan ve organik çözücülerin varlığında ve yokluğunda reaksiyonu gerçekleştirebilen enzimlerdir. Literatürde lipaz katalizli, ayçiçek yağından, soya yağından, karışık bitkisel yağlardan, gres ve donyağından biyodizel üretimi çalışmaları mevcuttur (Mittelbach, 1990; Nelson vd., 1996; Kaieda, 1999; Abigor vd., 2000; Watanabe, 2000; Kamini ve Lefuji, 2001).

1.7. Biyodizel Üretiminde Kullanılan Katalizörler

Trigliserid bağlarının kırılabilmesi için bitkisel yağ içerisine “katalizör” eklenmektedir. Biyodizel üretiminde kullanılan katalizörler, trigliserid bağlarını kırarak esterlerin serbest hale gelmesini sağlamaktadırlar. Serbest hale geçen esterler, ancak serbest hale geçtikten sonra alkol ile birleşebilmektedir. Biyodizel üretimindeki ester değişimi tepkimesini hızlandırmak için kullanılan katalizörler asit, alkali (baz) ve enzim katalizörler olarak üç grupta incelenebilir:

1.7.1. Asit Katalizörler

Asidik katalizli ester değişimi reaksiyonunda sülfürik, fosforik, hidroklorik ve sülfonik asitler kullanılır (Fukuda vd., 2001). Asidik katalizörler varlığında sıcaklık yüksektir, gliserol tekrar geri kazanılmaz. Bu katalizörle çalışmada ortamın kuvvetli asit olması, kullanılan ekipman, malzemenin korozyona ve basınca dayanıklı olmasını, pahalı malzemedan yapılmasını gerektirir ki bu da maliyeti arttıracaktır ve kullanıcı açısından tehlike arz ettiğinden daha dikkatli olunmalıdır (Yağız, 2006).

1.7.2. Alkali Katalizörler

Alkali katalizör olarak NaOH, KOH, karbonatlar ve alkoksitler (sodyum metoksit, sodyum etoksit, sodyum bütoksit v.b.) biyodizel üretiminde kullanılır. Alkali katalizörlü ester değişimi, asit katalizörlü olanlara göre yaklaşık 4000 kez daha hızlı olduğundan ticari olarak en çok kullanılan yöntemdir. Yaygın olarak metanol ve etanol gibi polar ve kısa zincirli alkoller kullanılmaktadır. Alkali katalizleme ile genel olarak saflaştırılması zor, kirli biyodizel ve gliserol elde edilmektedir (Hideki vd., 2001).

1.7.3. Enzim Katalizörler

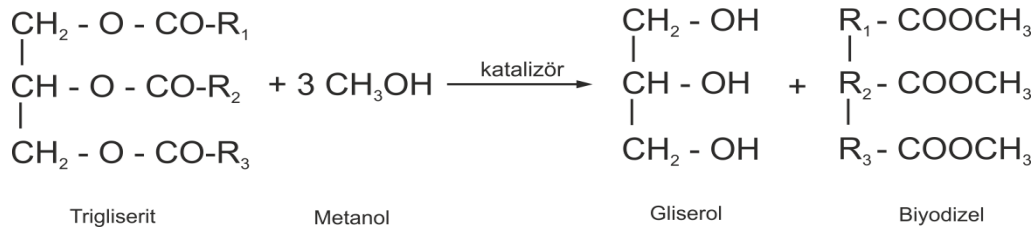
Enzim katalizörlü ester değişimi tepkimesinde, yağları yağ asitlerine parçalayan enzim olan lipaz kullanılmaktadır. Bitki yağının metil veya diğer kısa zincirli alkol esterlerine dönüşümü organik çözücülere dayanıklı lipazlar kullanılarak basit bir transesterifikasyon reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Her ne kadar enzimlerin pahalı olması ve metanol tarafından inhibisyona maruz kalması gibi sınırlamalardan dolayı endüstriyel olarak kullanılamamasına rağmen, literatürde gelecek yıllarda enzimlerin biyodizel üretimlerinde yer almaları için araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Ranganathan vd., 2008). Enzim katalizörlerin avantajları şunlardır:

- Lipaz enzimi ile elde edilen biyodizel daha temiz, daha az saflaştırmaya ihtiyaç duymaktadır (Nelson vd., 1996; Fukuda vd., 2001).
- Enzimatik dönüşüm atık oluşturmadığından bu işlemin gerçekleştirilmesi hem daha ucuz hem de çevreye daha duyarlıdır (Nelson vd., 1996; Shimada vd., 1999; Shimada vd., 2002).
- Enzimatik katalizleme ile ortama alkali tuzları katılmadığından alkali masrafı yoktur. Bu nedenlerle, alkali katalize göre çok daha temiz daha az saflaştırma ve yıkamaya gereksinim duyan biyodizel ve gliserol elde edilebilmektedir (Nelson vd., 1996; Fukuda vd., 2001).
- Enzim katalizörlü tepkime, alkali katalizörlü tepkimeye göre daha düşük sıcaklıkta (30-40 °C) gerçekleşir (Yuji vd., 2002).
- Enzimatik yolla elde edilen biyodizelin, sadece gliserol kısmı ayrıldıktan sonra doğrudan yakıt olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (Shimada vd., 2002).

Lipaz katalizörlüğünde biyodizel üretiminin belirtilen bu avantajları öngörmesine rağmen, henüz endüstriyel uygulamaya girmiş enzimatik biyodizel üretimi

mevcut değildir (Shimada vd., 1999). Lipazlarla biyodizel üretim maliyetinin alkali katalizöre kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Fukuda vd., 2001). Enzimlerin endüstriyel biyodizel uygulamalarında yer almalarının önündeki en önemli engeller olarak; enzimlerin yüksek fiyatı (Shimada vd., 1999; Du vd., 2004), işlem şartları altında kararsızlıkları ve düşük aktiviteye sahip olmalarıdır (Watanabe, 2000; Iso vd., 2001; Xu vd., 2003; Gaur vd., 2006).

Transesterifikasyon: Lipitlerde bulunan gliseritlerin bir katalizör varlığında bir alkol ile reaksiyona girerek ester ve gliserol oluşturmaya transesterifikasyon denir. Bitkisel ve hayvansal yağların bileşiminde bulunan trigliseritler ester yapılı bileşiklerdir. Trigliseritlerin alkollerle reaksiyonu sonucu yeni alkil esterleri meydana gelir ve bu alkil esterlere biyodizel denir. Transesterifikasyon işlemi, yağa incelik kazandırır ve viskozitesini azaltarak gliserinin bitkisel yağdan uzaklaşmasını sağlar.



Şekil 1. Transesterifikasyon reaksiyonu

Reaksiyonda kullanılan katalizörler, reaksiyonun hızını ve verimini arttırmaktadır. Bu amaçla kullanılan alkoller genellikle 1 ve 8 arasında karbon atomuna sahip alkollerdir. Alkol olarak metanol, etanol, propanol, bütanol kullanılmaktadır. Metanol ve etanol en çok kullanılanlardır. Özellikle metanolün fiyatı çok düşüktür. Metanoliz (yağların metanol ile transesterleşmesi) tepkimesinin başlıca önemi, yağlardan metil ester oluşturmaktır.

Enzimle katalize edilen metanoliz tepkimelerinde bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bunların başında metanol inhibisyonu gelir. Metanol/yağ mol oranı, (1.5:1.0) veya (1:1) değerinin üstünde kullanıldığında enzim aktivitesini yitirmektedir. Metanolün fazlası yağın içinde damlacıklar halinde kalır. Enzim, yağın içinde çözünmeyen metanol molekülleriyle karşılaşır inaktif olabilir. Çünkü, metanol enzimin üç boyutlu yapısını bozar (Fukuda vd., 2001; Kaieda vd., 2001; Nie vd., 2006).

Metanol inhibisyonundan kaynaklanan enzim inaktivasyonunun önlemek için bazı yöntemler geliştirilmiştir. Örneğin, Fukuda vd., (2001), Nie vd., (2006) ve Shimada

vd., (1999), metanolü aşamalı olarak tepkime ortamına ekleyerek lipazın inaktivasyonunu önlemişlerdir.

Metanoliz tepkimelerinde karşılaşılan bir diğer sorun da tepkimenin yan ürünü olan gliseroldür. Tepkime süresince ortaya çıkan gliserol, enzim etrafında birikip, substrat ve ürün difüzyonunu kısıtlayarak tepkimeyi inhibe eder. Yağda ve organik çözücülerde çözünmeyen gliserol, silika jel veya diğer yüzeye tutucu maddeler kullanılarak uzaklaştırılmaktadır (Soumanou ve Bornscheuer, 2003).

1.8. Biyodizelin Önemi ve Avantajları

Biyodizel kullanımıyla % 100 daha kükürtsüz, % 80 daha az hidrokarbon, % 60 daha az karbonmonoksit ve % 50 daha az katı zerrecikler ve % 20 daha az karbondioksitin çevreye verilmesi sağlanmaktadır. Biyodizel, fosil dizel egzoz dumanı içinde bulunan kanserojen benzen türevleri ve aromatik hidrokarbonlar gibi bileşikler içermediğinden, biyodizel egzoz gazı insan sağlığına zarar vermemektedir (Graboski ve Mc Cormick, 1998). Biyodizelin toksik bir etkisi olmadığı gibi, çevrede kolaylıkla parçalanabilmektedir. Biyodizel, ABD Çevre Bakanlığının (Environmental Protection Agency) Temiz Hava Kanunu'nun sağlık etkileri testini başarılı bir şekilde tamamlayabilmiş tek alternatif yakıttır (Lin ve Lin, 2005). Sonuç olarak biyodizel, egzoz gazlarının atmosferi daha az kirletmesinden dolayı, sera etkisi yapan gazlarda % 90'ın üzerinde bir düşüş sağlamakta, hava kirliliği ile ilişkili sağlık sorunlarının azaltılmasına yardım etmektedir (Gonzalez vd., 2002).

1.9. Biyodizelin Dezavantajları

- Isıl değeri petrodizele göre bir miktar daha düşüktür. Bu durum motordaki yanma sonucunda azda olsa güç düşüşüne neden olmaktadır.
- Soğuk hava şartlarından petrodizele göre daha çabuk etkilenir. Özellikle bulutlanma daha erken görülmektedir. Bu durum biyodizelin soğuk iklim bölgelerinde kullanımını sınırlandırıcı bir faktördür. Bunu aşabilmek için B20 (% 20 biyodizel ve % 80 dizel karışımı) kullanım formu tercih edilmektedir.
- Azot oksit salınımı petrodizele göre bir miktar yüksektir.
- Saf biyodizel (B100) kullanımında motor malzemelerinin (özellikle yakıt sistemindeki hortum, bağlantı elemanı ve contalar) biyodizele uygun seçilmesi, uygun değilse değiştirilmesi gerekmektedir (URL- 1).

1.10. Dünyada Biyodizel

Biyodizel konusundaki ilk adımlar, 1981 yılında Güney Afrika'da, daha sonra ise 1982 yılında Avusturya, Almanya ve Yeni Zelanda'da atılmıştır. 1985 yılında, Avusturya'da küçük bir pilot tesis, biyodizelin yeni bir teknolojiyle üretimini test etmiştir. 1990 yılında ilk çiftçi kooperatifi, ticari anlamda biyodizel üretmiştir. Başlıca Avrupa Birliği ülkelerinde ayrıca Doğu Avrupa, Malezya ve Amerika'da biyodizel üretim tesisleri kurulmaya başlanmıştır (Akunal ve Tolay, 2003).

Almanya, Avustralya, İtalya başta olmak üzere tüm Avrupa ve Amerika'da biyodizel üretimi ve tüketimi hızla çoğalmaktadır. Avrupa Birliği sürecinde ve Kyoto protokolüne göre % 2, 2010 yılında da % 5 biyodizel kullanılmasının mecburi olması öngörülmüştür. Bu durum AB ülkelerinin de biyodizel talebini artıracak ve ihracı mümkün olacaktır. Avrupa'da biyodizel üretim kapasitesinin 2003'te 2.3 milyon ton iken 2010'daki hedefin 8.5 milyon ton olduğunu bilinmektedir (Karaosmanoğlu, 2002).

1.11. Türkiye'de Biyodizel

Ülkemizde mevcut olanaklarla uygulamaya alınabilecek en önemli alternatif yakıt seçeneklerinden biri, biyodizeldir. Petrol tüketimimizin sadece % 15'inin yerli üretimle sağlandığı günümüzde, petrol ürünleri tüketimi içinde de en büyük pay % 34 oranında dizele aittir. Türkiye'de biyodizel ilk kez 2001 yılı sonunda üretilmiştir (Sarıyıldız, 2005).

Türkiye, biyodizel üretimi için yeterli teknolojiye sahiptir ve yakıtın kullanımına kolaylıkla uyum sağlayabilir. Öncelikle kırsal kesimde çeşitli kapasitelerde biyodizel üretim tesisleri kurularak tarım makinelerinin ve kamyonların bu yakıtı kullanımı özendirilmelidir. Ayrıca egzoz kirliliğinin yoğun olduğu büyük şehirlerin toplu taşıma araçlarında da biyodizel kullanımı teşvik edilmelidir. Gebze, Adana, İzmir, Bursa, Polatlı, Şanlıurfa, Tarsus, Kırıkkale, Ankara bölgelerinde üretim 50.000 tonu aşmış ve üretici sayısı 87'ye ulaşmıştır. Yeni tesislerle birlikte ve Enerji Verimliliği Kanunu'nun yürürlüğe girmesi ile yıllık üretim miktarının 200 bin tonun üzerine çıkabileceği tahmin edilmektedir (URL-2).

Biyodizelin ülkemizde üretimi ve tüketimi tamamen yaygınlaşınca, biyodizelin alternatif yakıt olarak dizel motorları dışında da yaygın olarak kullanımı beklenmektedir. Kükürt içermeyen biyodizel, tarımda kullanılan seralar için mükemmel bir yakıt olabilir. Yer altı madenciliğinde, gıda işleme sanayi dahil olmak üzere

sanayinin bütün alanlarında ve ayrıca jeneratör yakıtı ve kalorifer yakıtı olarak da değerlendirilmesi mümkündür. Biyodizel ulaştırma sektöründe dizel yakıt yerine kullanıldığı gibi konut ve sanayi sektöründe de fuel oil yerine kullanılabilir çok yönlü bir yakıttır (Yağız, 2006).

1.12. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, toprak örneklerinden lipolitik enzim aktivitesine sahip bakterileri belirlemek ve bu bakterilerin çeşitli organik çözücülere dayanıklılığını tespit etmektir. Organik çözücülere dayanıklı bir türün ürettiği lipaz enzimi de organik çözücülere dayanıklı olacaktır. Bu yargı göz önüne alınarak elde edilecek lipazın biyodizel sentezinde kullanılabilmesi mümkün olacaktır. Böylece enzimin endüstriye kazandırılması hedeflenmektedir.

1.13. Literatür Özeti

Lipaz ilk defa 1856 yılında Claude Bernard tarafından pankreas salgısında keşfedilmiştir. Hayvan pankreas özütleri, lipazın ticari uygulamalarında geleneksel olarak kullanılmaktaydı. Ancak lipazın endüstriyel potansiyelinin büyümesiyle ve ihtiyacın haysansal kaynaklardan karşılanamaması üzerine lipazın mikrobiyal kaynakları keşfedilmiştir (Tekiner, 2011).

Mikrobiyal lipazların varlığı ilk olarak 1901'de *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* ve *B. fluorescens*'de gözlenmiştir. Günümüzde ise en çok çalışılmış lipaz üreten bakteriler sırasıyla *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens*'tir (Hasan vd., 2006).

İzmir'de yapılan bir çalışmada 21 farklı çevreden toprak ve su örnekleri alınmış, izole edilen toplam 38 tane organik çözücü tolerant mikroorganizma arasından en toksik organik çözücü olan % 30 toluende üreyebilen P21 (*Pseudomonas fluorescens*) izolatu aynı zamanda en iyi lipaz üreticisi organizma (35 U/L) olarak belirlenmiştir (Çadircı, 2009).

Değişik kaynaklardan izole edilen 104 termofilik bakteri izolatının ekstraselüler termostabil lipaz üretim kapasiteleri kalitatif olarak taranmıştır. Bunlardan sadece 26'sı Rhodamin B Agar'lı modifiye *Thermoactinomyces* besiyerinde pozitif sonuç vermiştir ve potansiyel lipaz üreticisi olarak izolat EFTL17 bundan sonraki çalışmalar için seçilmiştir. İzolatın tanınması 16S rRNA gen bölgesine göre yapılmış ve Gen

Bankası'ndaki baz dizisi çakışmasına göre *Thermobifida fusca* EFTL17 olarak adlandırılmıştır. Kantitatif ekstraselüler lipaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür ve 5 günde lipaz aktivitesi 558.7 U/L bulunmuştur (Koçyiğit, 2009).

Bacillus megaterium AKG-1'den hücre dışı bir lipaz saflaştırmışlar ve bu enzimin 55 °C ve pH 7'de optimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Enzim, 50 °C'de yarım saat bekletilince aktivitesini (% 100 aktivite) tamamen korurken, 70 °C'de yarım saat tutulunca aktivitesinin yarısını kaybetmiştir. Aseton (% 20), DMSO (% 20) ve izopropanol (% 10) varlığında lipaz aktivitesinde % 20-70'lik bir artış gözlenmiştir. Enzim aktivitesi, sırasıyla asetona (% 10), benzen ve izopropanol ile muamelesi sonucu 24 saat sonra % 92, % 98 ve % 107'dir (Sekhon vd., 2005).

Pseudomonas sp S5, organik çözücülere dirençli olan lipazın moleküler ağırlığı 60 kDa olarak saptanmıştır. Optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 45 °C ve 9.0 olarak bulunmuştur. Saflaştırılan lipaz 45 °C ve pH 6.0-9.0 aralığında kararlı olduğu görülmüştür. n-dodekan, 1-pentanol ve toluen gibi çeşitli organik çözücüler varlığında en yüksek kararlılığı göstermiştir. Ca^{2+} ve Mg^{2+} lipazın aktivitesini uyarırken EDTA'nın aktivite üzerine hiçbir etkisi görülmemiştir. S5 lipazı en yüksek aktiviteyi doğal yağlardan palm yağı ve sentetik trigliseridlerden triolein varlığında göstermiştir (Rahman vd., 2005).

Ahmed vd., (2009), termostabil alkalın lipaz üreten mezofilik bir bakteriyi yağ bakımından zengin toprak örneğinden izole etmişler ve *Bacillus subtilis* EH 37 olarak tanımlanmışlardır. Kısmen saflaştırılmış enzim en yüksek aktiviteyi pH 8.0 ve 60 °C'de göstermiştir. Aktivitesini 60 dakika boyunca 50 °C ve 60 °C'de % 100'ünü korumuştur. Fe^{3+} ve Co^{2+} aktiviteyi azaltırken Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Zn^{2+} varlığı lipaz aktivitesi üzerine teşvik edici bir etki göstermiştir. Enzim organik solventlere maruz kaldığında başlangıç aktivitesinin % 80'ini korumuş, % 15 isopropil alkol ve % 30 hegzan varlığında sırasıyla % 107 ve % 115 aktivite göstermiştir (Ahmed vd., 2009).

Bacillus sp. J 33 lipazı % 30'luk metanol, propanol, asetonitril ve dioksan ile 37 °C'de 2 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin yaklaşık % 50'sini kaybetmiştir. Benzen, hegzan ve DMSO'nun ise % 60'luk konsantrasyonda enzimi aktivitesini büyük oranda artırdıkları bildirilmiştir (Nawani vd., 1998).

Bacillus thermoleovorans CCR11'den elde edilen lipazın, % 70'lik metanol, etanol, 2-propanol ve asetonla 30 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu bildirilmiştir (Castro-Ochoa vd., 2005).

Acinetobacter sp. ES-1 lipazı % 10'luk DMSO, metanol, asetonitril, hegzan, izooktan, izopropanol, dekan, hegzadekan ve 1-hegzadekan ile 30 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve DMSO dışındakiler tarafından inhibe edilmiştir (Lee vd., 2006).

Pseudomonas aeruginosa PseA lipazının hem polar (DMSO, metanol, etanol ve propanol) hem de apolar (benzen, toluen, ksilen, siklohegzan, hegzan n-heptan, izooktan, dekan, tetradekan) çözücülerin % 25'lik konsantrasyonları karşısında 24 saat stabilitesini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir (Gaur vd., 2008).

Rhizopus oryzae lipazının alkanlar ve uzun zincirli alkoller karşısında (isooktan, siklohegzan, heptan, hegzan, dodekanol, dekanol, hegzanol ve bütanol) oldukça kararlı olduğu buna karşın aseton ve kısa zincirli alkoller (metanol, etanol ve propanol) gibi hidrofilik çözücüler tarafından denatüre edildiği bildirilmiştir (Hiol vd., 2000).

Pseudomonas fluorescens JCM5963'den elde edilen lipaz % 30'luk organik çözücülerle 1 ve 24 saat inkübe edilmiş ve suyla karışan organik çözücülerin hemen hepsiyle (izopropanol, metanol, etanol, aseton ve gliserol) aktive olmuştur. Enzimin izoamil alkolle 1 saat inkübasyonu sonunda geri kalan aktivitesi % 142 olarak bulunmuştur. Buna karşın siklohegzan, kloroform ve benzen gibi suyla karışmayan organik çözücülerle 1 saat inkübasyon sonunda aktivitenin sırasıyla % 80, % 65 ve % 33'ü korunurken, 24 saat sonunda sırasıyla % 87, % 91 ve % 56'sı korunmuştur (Zhang vd., 2009).

Serratia marcescens ECU1010 lipazı % 10'luk DMSO, metanol, izopropanol, etanol ve aseton ile 30 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin en azında % 85'den fazlasını korumuş hatta DMSO enzim aktivitesini % 8 oranında artırmıştır. Ancak aynı çözeltilerin % 50'lik konsantrasyonları enzimi inhibe etmişlerdir (Zhao vd., 2008).

Almanya'da yapılan bir çalışmada ayçiçek yağından, yağ asidi metil ester dönüşümünü araştırmışlardır. Alkoliz tepkimesinin hızı üzerine organik çözücünün etkisi araştırılmış ve en yüksek dönüşüm % 80 olarak n-hegzan kullanıldığında elde edilmiştir. Çözücüsüz ortamda en iyi dönüşümün, % 90 olarak *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) lipazı kullanıldığında elde edildiği görülmüştür. Tutuklanmış lipaz olan Lipozyme RM-IM ile en yüksek dönüşümün % 80 olduğu ve ester değişimi tepkimesi için en iyi sürenin 120 saat olduğu belirtilmiştir (Soumanou ve Bornscheuer, 2003).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

Rhodamin B Agar besiyeri: 15 g agar, 13 g NB (Nütrient Broth), 4 g NaCl tartılarak 1000 mL distile suda çözüldü ve 121 °C'de 1.1 atm basınçta otoklav edildi. Biraz soğutulduktan sonra içerisine % 1 steril zeytin yağı ve % 0.001 steril Rhodamin B solüsyonundan 1000 µL ilave edilerek lipaz besiyeri hazırlandı (Kouker ve Jeager, 1987).

L1 besiyeri: 3.25 g NB, 1 g CaCl₂, 25 mL zeytinyağı, 10 g Arabic Gum tartılarak 1000 mL distile suda çözüldü ve 121 °C'de 1.1 atm basınçta otoklav edildi. Enzim üretimi için bu besiyeri kullanıldı (Castro-Ochoa vd., 2005).

L2 besiyeri: 1 g pepton, 2.5 g NaCl, 3.5 g (NH₄)₂SO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g MgSO₄, 1800 µL mısır likörü 1000 mL distile suda çözüldü. Otoklavdan sonra steril ortamda % 5 ayçiçekyağı ve % 10 organik çözücü (hegzan) ilave edildi. Bu besiyeri bakterilerin organik çözücülere dayanıklılığının tespit edilmesinde kullanılmıştır (Ji vd., 2010).

LB agar: 25 g LB (Luria-Bertani), 15 g agar tartılarak 1000 mL distile suda çözüldü ve 121 °C'de 1.1 atm basınçta otoklav edildi. Bakterilerin canlandırılmasında bu besiyeri kullanıldı.

İndol besiyeri: 10 g Tripton tartılarak 1000 mL distile su içerisinde çözülerek tüplere 3'er mL dağıtılıp 121 °C'de 1.1 atm basınçta 20-25 dakika otoklav edildi. Bu test mikroorganizmaların bir amino asit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirme yeteneğini belirlemek amacıyla yapıldı.

MR-VP (Metil red-Voges Proskauer): 7 g pepton, 5 g glikoz ve 5 g potasyum fosfat 1000 mL distile su içerisinde çözüldü. Deney tüplerine 4'er mL aktararak 121 °C'de otoklav edildi. Bu test, fermantasyon esnasında glukozdan asit üreten bakterileri nötral aseton üretenlerden ayırmak için kullanıldı.

Sitrat besiyeri: 22.5 g sitrat 1000 mL distile su içerisinde çözüldü ve 121 °C'de 1.1 atm basınçta 20-25 dakika otoklav edildi

KIA (Kligler İron Agar) besiyeri: 55 g KIA 1000 mL distile su içerisinde çözüldü ve 121 °C'de 1.1 atm basınçta 20-25 dakika otoklav edildi. İzolatların hidrojen sülfür (H₂S), karbondioksit (CO₂) ve hidrojen gazı (H₂) üretilip üretilmediklerinin, belirlenmesi amacıyla Kligler Iron Agar (KIA) besiyeri kullanıldı.

Oksidaz testi: Bu test gram negatif aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan önemli bir testir. 10 g 1,4-fenilendiamonyum diklorür 1000 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

Jelatin besiyeri: Bakterilerin jelatinaz enzimi sentezleyip sentezleyemediklerini ölçmek için % 10 jelatin içeren besiyeri hazırlandı.

Maltoz, Laktoz ve Trehaloz besiyerleri: Sıvı nütrient ortamına sırasıyla % 0.5 maltoz, % 0.5 laktoz, % 0.5 trehaloz katılmasıyla hazırlandı (URL-3).

2.1.2. Kullanılan Tamponlar

Asetat Tamponu

50 mM pH 5.0: 0.26 g sodyum asetat 50 mL saf suda çözülüp 107 µL asetik asit ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

50 mM pH 5.0: 0.34 g sodyum asetat 50 mL saf suda çözülüp 44.8 µL asetik asit ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu

50 mM pH 6.0: 0.041 g Na_2HPO_4 ve 0.735 g NaH_2PO_4 100 mL saf suda çözülüp pH'sı ayarlandı.

50 mM pH 6.5: 0.116 g Na_2HPO_4 ve 0.653 g NaH_2PO_4 100 mL saf suda çözülüp pH'sı ayarlandı.

50 mM pH 7.00: 0.271 g Na_2HPO_4 ve 0.371 g NaH_2PO_4 100 mL saf suda çözülüp pH'sı ayarlandı.

Tris-HCl Tamponu

50 mM pH 7.5: 0.095 g Tris bazı 50 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

50 mM pH 8.0: 0.202 g Tris bazı 50 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

50 mM pH 8.5: 0.371 g Tris bazı 50 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

50 mM pH 9.0: 0.504 g Tris bazı 50 mL saf suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu

50 mM pH 9.5: 0.089 g NaOH ve 0.209 g Glisin 100 mL saf suda suda çözülüp pH'sı ayarlandı.

50 mM pH 10.0: 0.143 g NaOH ve 0.107 g Glisin 100 mL saf suda suda çözülüp pH'sı ayarlandı.

50 mM pH 10.5: 0.177 g NaOH ve 0.042 g Glisin 100 mL saf suda suda çözülüp pH'sı ayarlandı.

50 mM pH 11.0: 0.192 g NaOH ve 0.014 g Glisin 100 mL saf suda suda çözülüp pH'sı ayarlandı.

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler Merck ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edilmiştir. Organik çözücüler %99'luk olarak kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Çeşitli bölgelerden (Rize, Trabzon, Giresun, Çorum, Kırıkkale) 21 toprak örneği alındı.

2.2.2. Toprak Örneklerinin Seyreltilmesi

Alınan toprak örneklerinden 10 g tartılarak 90 mL önceden steril edilmiş distile suya aktarıldı. Böylece 10^{-1} 'lik seyreltme hazırlanmış oldu. Bu seyreltmeden 10 mL alınıp tekrar 90 mL steril distile su içine aktarıldı. Bu şekilde 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 'lık seyreltmeler hazırlandı.

2.2.3. Lipolitik Bakterilerin Kalitatif Yöntemle Seçilmesi

Hazırlanan seyreltmelerden 500 μ L alınarak Rhodamine B ve zeytinyağı içeren Nutrient Agar besiyerine steril bagetle yayma ekim yapıldı. İki gün 37 °C'de inkübasyondan sonra UV ışığı altında parlak turuncu ışık oluşturan koloniler seçilerek doğrulanması amacıyla tekrar Rhodamine B agar besiyerine ekilip 2 gün inkübe edildi. UV ışığı altında parlak turuncu ışık veren koloniler pozitif olarak değerlendirildi (Kouker ve Jeager, 1987).

2.2.4. Enzim Özütünün Hazırlanması

LB sıvı besiyerinde hazırlanan 5 mL prekültür, 100 mL L1 besiyerine inoküle edildi. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonucu besiyeri falkon tüplere eşit miktarda

dağıtılarak 4 °C’de 9000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım alındı. Elde edilen süpernatant enzim özütü olarak kullanıldı.

2.2.5. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Lipaz enziminin aktivitesi, substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) kullanılarak 410 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Thongekkaew, 2007). *p*-NPP gerekli miktarda tartılarak 3 mM olacak şekilde 2-propanolde çözüldü. 20 mM pH 10.0 Glisin–NaOH tamponu, % 0.4 Triton X-100 ve % 0.1 Arabic Gum ile aktivite tamponu hazırlandı. Reaksiyon karışımı 171 µL aktivite tamponu, 19 µL substrat (*p*-NPP) ve 10 µL enzim özütünden oluşmaktadır. Körde ise enzim özütü yerine 10 µL L1 besiyeri kullanıldı. Ölçüm için 96’lık mikrolaka (Greiner 655301) kullanıldı. Her kuyucuğa 200 µL olan reaksiyon karışımı aktarılıp optimum sıcaklıkta 20 dakika inkübe edildikten sonra mikrolaka okuyucusunda spektrofotometrik olarak 410 nm’de ölçüldü. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

Reaksiyon koşullarında, *p*-nitrofenil palmitattan 1 dakikada 1 µmol *p*-nitrofenol (*p*-NP) oluşturan enzim miktarı 1 U (ünite) enzim olarak tanımlandı. Spesifik aktivite ise 1 mg proteinde bulunan enzim ünite sayısıdır (Thongekkaew, 2007).

2.2.6. Protein Tayini

Protein miktarı standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Bradford Protein Tayin Yöntemine göre yapıldı (Bradford, 1976). BSA’nın 1 mg/mL’lik stok çözeltisi hazırlandı. Standart çözeltiler bu stoktan 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olacak şekilde saf su ile seyreltilerek hazırlandı.

Bu yöntemde proteinlerdeki pozitif yüklere bağlanan negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanıldı. 100 mg Coomassie Brilliant Blue boyası, 50 mL % 95’lik etanolde çözüldü ve üstüne % 85’lik 100 mL fosforik asit yavaş yavaş ilave edildi. Boya tamamen çözüldükten sonra bu çözeltinin üzerine 200 mL distile su eklenerek toplam hacim 1 litreye tamamlandı. Kullanmadan önce filtre kağıdı ile süzüldü (Bradford, 1976; Stoscheck, 1990).

Protein örneğinden 20 µL alınıp üzerine 100 µL boya solüsyonundan ilave edilerek karıştırıldı ve 5 dakika sonra 595 nm’de spektrofotometrede absorbans değeri alındı. Elde edilen absorbans değerlerinden BSA kullanılarak hazırlanan standart eğriye

göre protein miktarları belirlendi. Protein konsantrasyonu belirlenen enzim özütünün spesifik aktivitesi hesaplandı.

2.2.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Doğal jel elektroforezi proteinlerin, denatüre edici maddeler kullanılmadan biyolojik ve enzimatik özelliklerini kaybetmeksizin ayrıldığı bir tekniktir. SDS'siz ve soğuk ortamda gerçekleştirilen doğal jel elektroforezi için % 12'lik ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli kullanıldı.

Tablo 1. Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Ayırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 5)
Ayırma Jeli Tamponu (1M Tris-HCl pH:6.8)	1.3 mL	---
Yükleme Jeli Tamponu (1.5M Tris-HCl pH: 8.8)	---	0.25 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	2.0 mL	0.33 mL
% 10 APS	0.02 mL	0.02 mL
TEMED	0.002 mL	0.002 mL
Saf Su	1.6 mL	1.4 mL

Elektroforez cam plakaları saf su ve etil alkol ile iyice temizlendikten sonra 1 mL'lik otomatik pipet aracılığı ile jel karışımı cam plakalar arasına yukarıdan 2 cm boşluk bırakacak şekilde döküldü. Jelin üst kısmının düz olması için jelin üzerine saf su ilave edildi ve jelin polimerize olması beklendi. Jel polimerize olduktan sonra üst yüzeydeki saf su döküldü ve hazırlanan yükleme jeli, ayırma jelinin üzerine eklendi. Kuyucukları oluşturmak için yükleme jeline tarak yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan jel, polimerize olduktan sonra tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Tank, doğal elektroforez yürütme tamponuyla dolduruldu ve buz dolu bir kap içerisine yerleştirildi. 20 µL protein örneklerinden ve 5 µL doğal elektroforez yükleme boyası ile karıştırılan örnekler otomatik pipet ile kuyucuklara yüklendi. Boya, yükleme jelinden çıkana kadar 16 mA'lık ve ayırma jeli boyunca 25 mA'lık akım uygulandı Elektrik akımı kesildikten sonra, jel çıkartıldı ve subsrat boyaması yapıldı.

2.2.7.1. Substrat Boyaması

Doğal elektroforez sonucu sistemden çıkartılan jele substrat boyaması yapıldı. Jelin boyanmasında kullanılan boyanın hazırlanışı şu şekildedir: 20 mg Fast Red tuzu, 20 ml 100 mM pH 7.5 Tris-HCl tamponunda çözüldü. 8 mg alfa naftil asetat 2 ml aseton ile çözülerek 100 mM pH 7.5 Tris-HCl tamponu ile 20 mL'ye tamamlandı. Bu iki çözelti birleştirilerek aynı anda jel üzerine döküldü ve 30 dakika boyanması sağlandı.

2.2.8. SDS Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, denatüre edici maddeler (örneğin; sodyumdodesilsülfat, β -merkaptöetanol) kullanılarak proteinlerin poliakrilamid jelde ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), ayırma jeli % 12'lik ve yükleme jeli % 5'lik olacak şekilde yapıldı.

Tablo 2. SDS jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Bileşenler	Ayrırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 5)
Ayrırma Jeli Tamponu (1M Tris-HCl pH: 6.8)	1.3 mL	---
Yükleme Jeli Tamponu (1.5M Tris-HCl pH:8.8)	---	0.25 mL
% 30 Akrilamid/Bisakrilamid	2.0 mL	0.33 mL
% 10 SDS	0.05 mL	0.02 mL
% 10 APS	0.02 mL	0.02 mL
TEMED	0.002 mL	0.002 mL
Saf Su	1.6 mL	1.4 mL

Cam tabakalar önce alkol ve sonra saf su ile temizlenir ve oda sıcaklığında kurutuldu. Cam plakalar arasına dökülen ayırma jeli polimerize olduktan sonra yükleme jeli döküldü. Hazırlanan jel polimerize olduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve tank, SDS yürütme tamponuyla dolduruldu. 20 μ L protein örneklerinden ve 5 μ L 4x'lik bir yükleme tamponu ile karıştırılarak 95 °C'de 5 dakika kaynatıldı. Hazırlanan protein örnekleri yürütme tankının içinde bulunan jelin içine yüklendi. Jelde yürüyen mavi renkli karışım, yükleme jelinden çıkana kadar yaklaşık 30 dakika 25 mA'de yürütüldü. Elektrik akımı kesildikten sonra jel sistemden çıkartıldı Jelin boyanmasında Commasie Brilliant Blue kullanılmıştır. Bu boyama metodunda esas, boyanın asidik pH'da proteinlere bağlanmasıdır. Jel Commasie Blue (% 40 metanol, % 10 asetik asit,

% 0.1g Commasie R-250 boyası) boyası ile 1 saat boyunca çalkalanır. Jel, protein bantlarının görünür hale getirilmesi için, boya uzaklaştırma çözeltisiyle (% 20 metanol, % 10 asetik asit) yaklaşık 2–3 saat muamele edildi. Boyamadan sonra jel, görüntüleme cihazında kaydedildi.

2.2.9. Organik Çözücü İçeren Besiyerinde Lipaz Üretimi

Organik çözücülerin bakterilere etkisinin test edilmesi için L2 besiyeri otoklav edildi. Otoklavdan sonra steril tüplere 2 mL olarak dağıtılan besiyerine % 10 oranında hegzan ilave edildi. Hazırlanan besiyerlerine her bir bakteriden 20 µL inoküle edilip 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Sonra L2 besiyerinde üreyen bakterilerden 20 µL alınıp yeni L2 besiyerine inoküle edilerek 3 pasajlama yapılmış oldu.

2.2.10. Saf Kültür Hazırlanması

UV ışığı altında turuncu koloni gösteren bakteriler LB agara tek koloni düşürmek için öze ile çizgi ekim yapılarak 37 °C'de bir gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tek koloniler seçildi ve bu bakterilerin % 20'lik gliserol stokları yapıldı.

2.2.11. Biyokimyasal Tanılama

2.2.11.1. Gram Boyama

Lamın bir kenarına saf su damlatılıp katı besiyeri ortamında büyütülmüş 24 saatlik kültürden bir miktar bakteri koyuldu. Havada kuruması beklendikten sonra alevden geçirilerek tespit edildi. Preparat kristal viyole çözeltisinde 2 dakika bekletilip su ile yıkandı. Preparatlar 1 dakika lugol çözeltisinde bekletildikten sonra yıkandı ve kurutuldu. Aseton alkolle 10-20 saniye renk giderildi. Son işlem olarak safranin ile 2 dakika bekletilerek boya giderilmesi sağlandı. Preparatlar kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelendi. Bakterilerin mavi veya mor renkte görünmesi gram pozitif, pembe renkte görünmesi ise gram negatif olarak değerlendirildi.

2.2.11.2. İndol Oluşum Testi

Hazırlanan besiyeri 3 mL olacak şekilde tüpe aktarıldı. 2 gün 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüplerin üzerine kovaks ayracından yaklaşık 20 damla ilave edilip iyice karıştırıldı. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde

kırmızı bir halkanın oluşması pozitif olarak, sarı-turuncu renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirildi (Demirbağ ve Demir, 2007).

2.2.11.3. Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer Testi (MR-VP)

MR-VP, glukoz katkılı nütrient sıvı besiyeri olup, metil kırmızısı (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testlerinde kullanılır. Eğer bir bakteri glukozdan yüksek miktarda organik asit üretiyorsa, metil kırmızısı ortama ilave edildiğinde renk kırmızı kalır. Bu pH'nın 4.4'ün altında olduğunu gösterir. Eğer bakteri fermentasyon sonucunda nötral maddeler üretiyorsa, metil kırmızısı sarıya dönüşür. Bu pH'nın 6.0'nın üzerinde olduğunu gösterir. Aseton üretimi ise α -naftol (VP-I kimyasalı) ve potasyum hidroksit (VP-II kimyasalı) ilavesi sonucunda belirlenir. Eğer ortamda aseton mevcut ise ortama kimyasallar ilave edildiğinde tüpün üst kısmında kırmızı halka oluşumu gözlenir. Aseton üretilmemişse besiyerinde rengi açık kahverengi halka oluşumu gözlenir.

Hazırlanan besiyeri 3 mL olacak şekilde iki tüpe dağıtıldı. Besiyeri içeren tüplere yuvarlak uçlu öze ile ekim yapıldı ve 30 °C'de, 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 1. tüplere metil kırmızısı ayırıcından 5'er damla ilave edildi ve kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif olarak kabul edildi. 2. tüplere VP-I kimyasalından yaklaşık 12 damla ve VP-II kimyasalından 4'er damla ilave edildi. Tüplerin oksijene maruz kalması için kapakları açık şekilde bir müddet çalkalandı. Tüpler 15-30 dakika bekletildi. Pembe-kırmızı arası renk oluşumu VP testi için pozitif, açık kahverengi halka oluşumu ise negatif olarak kabul edildi (Demirbağ ve Demir, 2007).

2.2.11.4. Sitrat Kullanımı Testi

Hazırlanan besiyeri tüpe 4'er mL olacak şekilde aktarılıp katılaşması beklendi. İğne uçlu öze ile ekim yapılarak 30 °C de 2 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda yeşil olan besiyerinin renginin maviye dönüşmesi sitratın bakteri tarafından karbon kaynağı olarak kullanıldığını gösterir ve sonuç pozitif olarak değerlendirildi (Demirbağ ve Demir, 2007).

2.2.11.5. Maltoz, Laktoz, Trehaloz Kullanımı Testi

Hazırlanan besiyerleri 2.5 ml olacak şekilde tüplere aktarıldı Taze kültürden ekim yapılarak 37 °C de 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda fenol kırmızısı ayracından birkaç damla damlatıldı. Nötr pH'larda fenol kırmızısı kırmızı renktedir ama pH<6.8 olursa sarıya döner. Kırmızı renk oluşumu negatif, sarı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir (URL-2).

2.2.11.6. Kligler Iron Agar (KIA) Testi

Hazırlanan besiyeri tüpe 4'er mL olacak şekilde aktarıldı ve yatık bir şekilde bırakılarak besiyerinin donması beklendi. Taze kültürden ekim yapılarak 30 °C de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda asit üretilmesiyle besiyerinin yüzey veya dip kısmı sarı renge dönüşür. (Demirbağ ve Demir, 2007).

2.2.11.7. Katalaz Testi

Katalaz enzimi hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalanmasından sorumlu enzimdir. LB katı besiyeri ortamında büyütülmüş 24 saatlik kültürlerin üzerine % 3'lük hidrojen peroksit ilave edildi ve hidrojen peroksit ilavesinden sonra kolonilerin bulunduğu yerlerde kabarcıklar veya gaz çıkışının görülmesi durumunda katalaz pozitif olarak değerlendirildi (MacFaddin, 2000).

2.2.11.8. Oksidaz Testi

Hazırlanan çözeltiden lam üzerine bir miktar damlatıldı ve üzerine katı besiyeri ortamında büyütülmüş 24 saatlik kültürden miktar bakteri koyuldu. Bakterilerin maviye boyanması durumunda oksidaz pozitif olarak değerlendirildi (MacFaddin, 2000).

2.2.11.9. Jelatin Hidrolizi Testi

Hazırlanan besiyerine taze kültürden ekim yapıp 37 °C de 2 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kontrolle birlikte ekim yapılan kültür buz dolabına kaldırıldı. Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde ve katılaşmadığı görülür. Bu pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Negatif durumlarda tüpteki, sıvı jelatinli besiyeri katılaşır (Demirbağ ve Demir, 2007).

2.2.12. Moleküler Tanılama

2.2.12.1. DNA izolasyonu

Aktif haldeki sıvı kültürden DNA izolasyonu GeneJET Genomic DNA Purification Kiti (Thermo Scientific, Litvanya) kullanılarak üretici firmanın önerisine göre yapıldı.

- 3 mL gece kültürü 6000 g'de 5 dakika santrifüj edilip üst sıvı atılır.
- Pellet 100 µL Buffer R1 ile pipet yardımıyla çözülür.
- Gram negatif bakteriler için 10 µL lizozim (50 mg/mL) eklenir, gram pozitif bakteriler için 20 µL lizozim (50 mg/mL) eklenip karıştırılarak 37 °C'de 20 dakika inkübe edilir.
- 10000 g'de 3 dakika santrifüj edilip üst sıvı atılır.
- Pellet 180 µL Buffer R2 ile çözüldükten sonra 20 µL Proteinaz K eklenerek iyice karıştırılır ve 60 °C'de 20 dakika inkübe edilir.
- Yaklaşık 1 dakika soğutulur, 20 µL RNase A (DNase free 20 mg/mL) eklenip 37 °C'de 5 dakika inkübe edilir.
- 2 hacim (yaklaşık 440 µL) Buffer BG eklenir, homojen çözelti olana kadar tüp alt üst edilir ve 60 °C'de 10 dakika inkübe edilir.
- Yaklaşık 1 dakika soğutulur ve 200 µL etanol eklenir ve hemen karıştırılır.
- Örnek kolona transfer edilir (2 mL'lik tüp içinde) ve 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilir, kolondan geçen dipteki çözelti atılır.
- Kolon, 750 µL Wash Buffer ile yıkanıp 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilir, kolondan geçen dipteki çözelti atılır.
- Kolon, 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılır.
- Kolon, steril bir ependorfe yerleştirilir. 50-100 µL Elüsyon Buffer (10 mM Tris-HCl pH: 8.5) doğrudan kolona eklenir ve 2 dakika beklenir.
- 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Elde edilen DNA süspansiyonu, kullanılana kadar -20 °C'de saklanır.

2.2.12.2. Genomik DNA'ların Agaroz Jelde Yürütülmesi

50X TAE hazırlamak için, 242 g Tris 600 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra asetik asit eklendi. Daha sonra 100 mL 0.5 M EDTA ilave edildi ve pH 8'e ayarlandı. Hacim distile su kullanılarak 1 litreye tamamlandı ve otoklav edildi.

Kullanım konsantrasyonu olan 1X yapmak için 1 hacim 50X TAE alınarak üzerine 49 hacim saf su ilave edildi (Arıcı, 2006).

Agaroz jel elektroforezi, 0.5 µL etidyum bromür (0.5 µg/mL), % 0.7 agaroz içeren jelde gerçekleştirildi. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde 1X TAE tamponu kullanıldı. 7 µL DNA solüsyonu, 3 µL 10X yürütme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenerek. 100 V'luk elektrik alanda 25 dakika yürütüldü.

Yürütme sonucunda izolatlardan elde edilen genomik DNA'lar UV ışığı altında görüntülendi. Daha sonra DNA'lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.2.12.3. 16S rRNA Geninin PZR ile Çoğaltılması

16S rRNA genleri, her bir izolattan elde edilen genomik DNA'dan 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Primerler Macrogen Inc. (Güney Kore) firmasından temin edildi. PZR reaksiyonu; steril distile su 35.6 µL, 10X PZR tamponu 5 µL, dNTP 2 µL, primer 27F 1.5 µL, primer 1492R 1.5 µL, Taq DNA polimeraz (1 U/ml) 0.4 µL, kalıp DNA 1 µL, MgCl₂ 3 µL karışımı ile gerçekleştirildi.

Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise; ilk denatürasyon basamağı 95°C'de 4 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü olmak üzere 94°C'de 1 dakika (denatürasyon için), 56 °C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C'de 2 dakika (polimerizasyon için) olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünlerinin 5 µL'si % 1.1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0.5 µg/mL) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntülendi. PZR ürünleri sekans edilmek üzere Macrogen Inc. firmasına gönderildi.

Sekanslama işleminde ise 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') ve 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primerleri kullanıldı (Macrogen Inc.). Sekanslar gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST programı kullanılarak var olan diğer bakterilerin 16S rRNA genleriyle karşılaştırıldı ve yüzde benzerlikler tespit edildi.

2.2.13. Lipaz Enziminin Karakterizasyonu

2.2.13.1. Enzim Aktivitesine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivitesine inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla B5 izolatı 37 °C’de L1 besiyerinde farklı inkübasyon sürelerinde geliştirildi. Bunun için 12, 24, 36, 48 ve 60 saat inkübasyon süreleri kullanıldı. 12 saat aralıklarla besiyerinden 1 mL alınıp 13000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı ve bu kısım enzim özütü olarak kullanıldı.

2.2.13.2. Enzim Aktivitesine Farklı Yağların Etkisi

Farklı yağların lipaz aktivitesine etkisini tespit etmek amacıyla % 2.5 oranında zeytin yağı, ayçiçeği yağı, mısır yağı, fındık yağı ve soya yağı kullanılarak lipaz aktivitesi ölçüldü.

2.2.13.3. Enzim Aktivitesine pH’ın Etkisi ve pH Kararlılığı

Lipaz enziminin optimum pH’sının belirlenmesi için, pH 5.0-11.0 değerlerinde enzim aktiviteleri incelenmiştir. 50 mM hazırlanan tamponlar 20 mM olacak şekilde seyreltildi. pH 5.0-5.5 için sodyum asetat, pH 6.0-7.0 için sodyum fosfat, pH 7.5-9.0 için Tris-HCl, pH 9.5-11.0 için ise Glisin-NaOH tamponu ve substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat kullanılarak 410 nm’deki absorbans spektrofotometrik olarak ölçüldü.

pH stabilitesinin belirlenmesi için ise, enzim örnekleri (20 mM) pH 5.0-10.0 değerlerindeki farklı tamponlarla (1:1) oranda 24 saat +4 °C sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle enzim aktivitesi belirlenmiştir. İnkübasyon sonrasında ölçülen aktivite, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen aktiviteye oranlanarak yüzde kalan aktivite belirlendi.

2.2.13.4. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi ve Sıcaklık Kararlılığı

Lipazın en yüksek aktivite gösterdiği reaksiyon sıcaklığını belirlemek amacıyla; 25-60 °C sıcaklıklarda 5 °C artışlarla, substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat ve lipazın en iyi aktivite gösterdiği pH 10.0 Glisin-NaOH tamponu kullanılarak 410 nm’deki absorbans spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Lipazın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık, bundan sonra yapılan tüm aktivite testlerinde kullanılmıştır. Ayrıca sıcaklığın enzim stabilitesi üzerine olan etkisinin

araştırılması için enzim 30-80 °C aralığındaki sıcaklıklarda 1 saat ön inkübasyona bırakıldı. 20 dakikalık zaman aralıkları ile örnek alınıp daha önceden belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta enzim aktivitesi ölçüldü. İnkübasyon sonrasında ölçülen aktivite, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen aktiviteye oranlanarak yüzde kalan aktivite belirlendi.

2.2.13.5. Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (0.1-10 mM) substrat çözeltisi (*p*-NPP) kullanılarak enzim aktivitesi optimum pH ve sıcaklıkta ölçüldü. Enzimin Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden faydalanılarak hesaplandı.

2.2.13.6. Enzim Aktivitesine Farklı Substratların Etkisi

Farklı substratların lipaz aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla *p*-nitrofenil asetat (*p*-NPA), *p*-nitrofenil bütirat (*p*-NPB), *p*-nitrofenil laurat (*p*-NPL) ve *p*-nitrofenil palmitatın (*p*-NPP) 3 mM'lık çözeltileri hazırlandı. Enzim aktivitesi optimum şartlarda spektrofometrik olarak ölçüldü.

2.2.13.7. Enzim Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkilerini saptamak amacıyla NaCl, KCl, CoCl₂, MnCl₂, CdCl₂, MgCl₂, CaCl₂, HgCl₂, CrCl₃, AlCl₃ ve FeCl₃ bileşiklerinin 1 mM ve 5 mM'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Metal ilave edilmeyen enzim örneği için elde edilen değer % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler % olarak belirlenmiştir

2.2.13.8. Enzim Aktivitesine Çeşitli Kimyasalların Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine deterjanların etkilerini saptamak amacıyla Tween-80, Tween-20, SDS, NaDC (Sodyum deoksikolat), THL (Tetrahidrolipsatin) ve EDTA'nın 1 mM ve 5 mM'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ile kimyasalların çözeltileri (1:1) oranında karıştırılarak 30 dakika 37 °C'de inkübe edilip reaksiyon karışımına katılmıştır. Kimyasal ilave edilmeyen enzim örneği için elde edilen değer % 100 kabul edilerek kalan aktiviteler % olarak belirlenmiştir.

2.2.13.9. Enzim Aktivitesine Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkilerini saptamak için etanol, aseton, DMSO, asetonitril, metanol ve 2-propanolün % 20, % 30, % 40, % 50 (h/h)'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ve çözücüler (1:1) oranında karıştırılarak 30 dakika, 37 °C sıcaklıkta ön inkübasyona tabi tutulup reaksiyon karışımına katılmıştır. Süre sonunda lipaz aktivitesi standart yöntemle göre ölçülerek aktivite kaybı hesaplanmıştır.

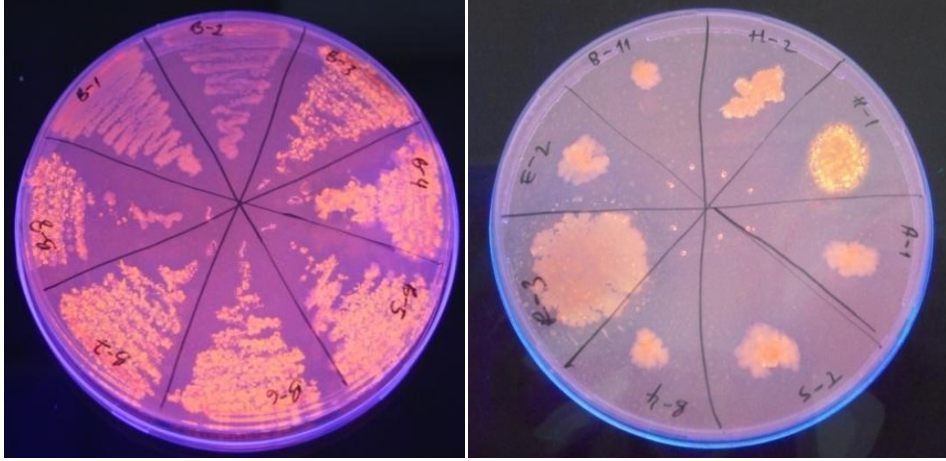
2.2.13.10. Zeytinyağı Hidrolizi

TLC için 3 mL 50 mM Tris-HCl pH 8 tamponu, 3 mL enzim özütü ve 549 µL zeytinyağı karışımı 50 °C'deki inkübatörde 500 rpm'de çalkalamalı olarak 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kontrol tüpüyle birlikte üzerlerine 20'şer mL dietil eter eklenerek karıştırıldı ve üstte kalan eter fazı ayrı bir tüpte toplandı. TLC için silica gel-60 F254 plakları kullanılmıştır. Standart olarak -mono,-di ve trigliserid karışımı kullanıldı (Supelco, 1787). Standartların eterde % 2'lik çözeltileri hazırlandı. Standartlar ve hazırlanan örnekler kapillar tüp yardımıyla silica jelle spotlandı. TLC'de hareketli faz olarak kloroform:aseton:asetik asit (96:4:1) karışımı kullanıldı. Örnekler yürüdüktan sonra biraz kuruması beklendi. Daha sonra TLC plağı % 10'luk etanolde hazırlanmış sülfirik asit çözeltisi ile spreylenecek boyandı ve plaka alev üzerinden geçirilerek bantların görünmesi sağlandı (Park vd., 2007).

3. BULGULAR

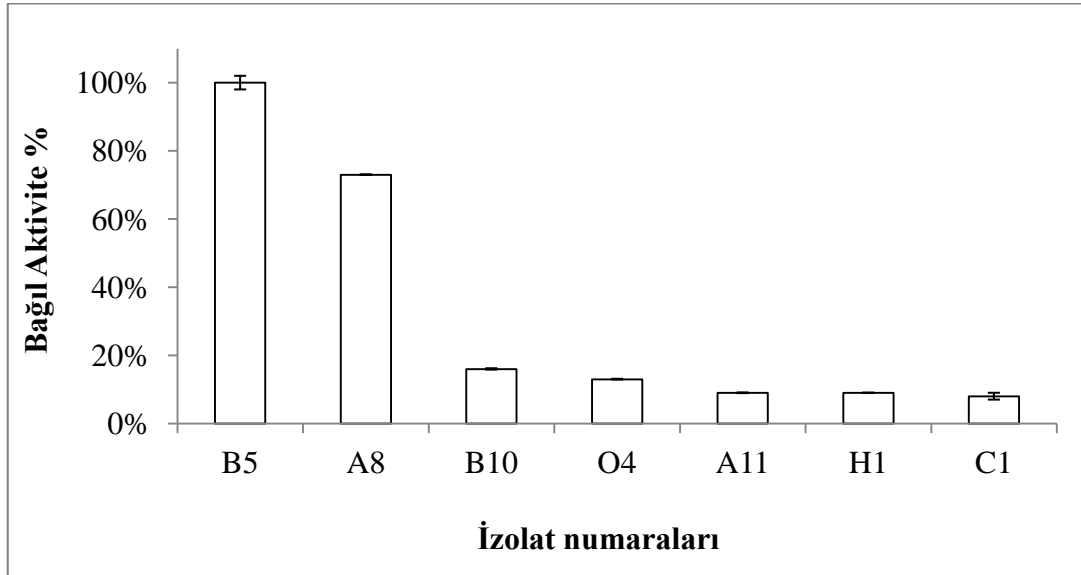
3.1. Lipolitik Bakterilerin Kalitatif ve Kantitatif Yöntemle Seçilmesi

Topraktan izole edilen 30 suş Rhodamin B agar besiyerine ekilerek 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra UV ışığı altında turuncu ışımaya yapan izolatlar belirlendi.



Şekil 2. Farklı izolatların Rhodamin B agarda lipaz aktiviteleri

Rhodamin Agar besiyerinde turuncu ışımaya veren bakterilerin kantitatif lipaz aktivite ölçümü için, *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) substratı kullanılarak 410 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Thongekkaew, 2007). En yüksek enzim aktivitesini B5 ve A8 izolatları göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı izolatların kantitatif yöntemle lipaz aktiviteleri

3.2. Organik Çözücü İçeren Besiyerinde Lipaz Üretimi

Hegzan katkılı L2 besiyerine ekilen bakteriler 30 °C 120 rpm’de 48 saat inkübe edildi. Böylece organik çözücü içeren ortamda üreyebilen bakteriler test edildi. 3 pasajlama sonucunda üreyen bakteriler Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 3. Organik çözücü içeren besiyerinde üreyebilen izolatlar

İzolat numaraları	İlk üretim	1. transfer	2. transfer	3. transfer
A2	+	+	+	+
A3	+	+	+	+
A10	+	+	+	+
A11	+	+	+	+
A12	-	-	-	-
B5	+	+	+	+
B7	+	+	+	+
B11	+	+	+	+
C1	+	+	+	+
E1	+	+	+	+
E2	+	+	+	+
G1	+	+	+	+
H2	+	+	+	+
L3	+	-	-	-
M1	-	-	-	-
N1	+	-	-	-
O4	-	-	-	-
P3	+	+	+	+
R1	+	+	+	+
S2	+	+	+	+
T5	+	-	-	-

Kalitatif ve kantitatif ölçümler sonucu en iyi sonuç veren aynı zamanda organik çözücü varlığında dahi lipaz üretebilen izolatın B5 olduğu tespit edildi. Bu amaçla B5 izolatının biyokimyasal tanımlanması yapılmıştır (Tablo 3).

3.3. Biyokimyasal Tanılama

Topraktan izole edilen lipaz aktivitesi gösteren ve organik çözücülere dirençli olan B5 izolatının tanılanması amacıyla yapılan biyokimyasal test sonuçları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. B5 izolatının tanılanmasında kullanılan biyokimyasal testler

Gram boyama	negatif basil
Metil Red	-
Voges Proskauer	-
İndol	-
Jelatin	-
Laktoz	-
Katalaz	+
Maltoz	+
Trehaloz	+
Sitrat	+
Oksidaz	+
KIA	dip ve yüzey bazik, CO ₂ +H ₂ ve H ₂ S negatif

3.4. Moleküler Tanılama

GenBank'ta (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) yapılan karşılaştırma işlemleri sonucunda tanımlanan bakteriler Tablo 5'te gösterilmiştir.

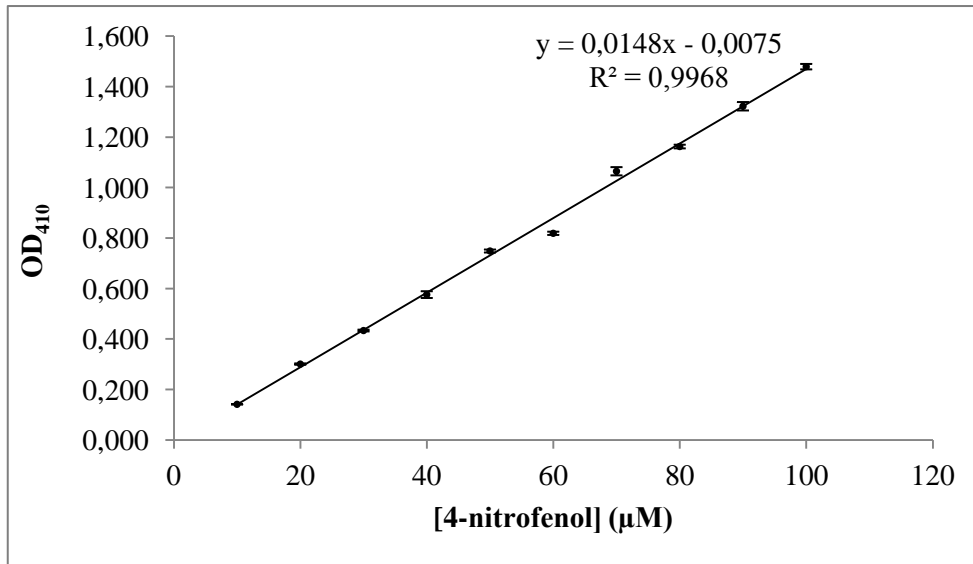
B5 izolatının 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgesi PZR yöntemiyle çoğaltılmış ve BLAST analizi yapılmıştır. B5 suşuna ait konsensus dizi veritabanında kayıtlı ve tür tanısı yapılmış olan bakteriler arasında (% 99) *Burkholderia cenocepacia* ile benzerlik göstermiştir.

Tablo 5. Moleküler tanılanması yapılan izolatlar

İzolat No	Bakteri adı	Benzerlik	İzolat No	Bakteri adı	Benzerlik
A2	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	% 96	G1	<i>Acinetobacter soli</i>	% 95
A3	<i>Bacillus</i> sp.	% 95	H2	<i>Bacillus</i> sp.	% 97
A10	<i>Bacillus</i> sp.	% 99	L3	<i>Bacillus</i> sp.	% 96
A11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	% 95	M1	<i>Acinetobacter junii</i>	% 98
A12	<i>Acinetobacter soli</i>	% 94	N1	<i>Bacillus</i> sp.	% 95
B5	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	%99	O4	<i>Acinetobacter junii</i>	% 96
B7	<i>Burkholderia</i> sp. R-24201	% 94	P3	<i>Bacillus</i> sp.	% 96
B11	<i>Burkholderia</i> sp.	% 98	R1	<i>Bacillus</i> sp.	% 97
C1	<i>Burkholderia</i> sp. R-24201	% 96	S2	<i>Bacillus</i> sp.	% 97
E1	<i>Acinetobacter soli</i>	% 96	T5	<i>Bacillus</i> sp.	% 97
E2	<i>Bacillus</i> sp.	% 95			

3.5. *p*-NPP Standardı

Lipaz enziminin *p*-nitrofenil palmitatı hidrolizleyerek oluşturduğu 4-nitrofenol miktarını tespit etmek için standart olarak farklı konsantrasyonlarda 4-nitrofenol kullanılmıştır. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilerek doğrunun eğimi hesaplanmıştır. Aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanılan bu lineer doğrunun denklemi $y = 0,0148x - 0,0075$ regresyon katsayısı $R^2 = 0,9968$ 'dir (Şekil 4).

**Şekil 4.** Standart olarak kullanılan 4-nitrofenol grafiği

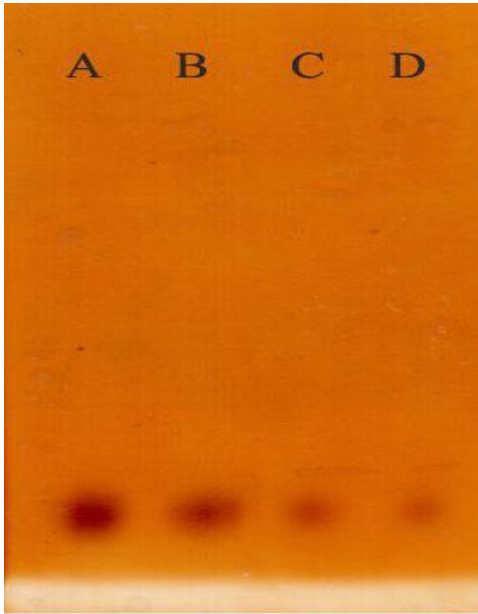
3.6. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Enzim aktivitesi, substrat olarak *p*-NPP kullanılarak 410 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Thongekkaew, 2007). *p*-NPP gerekli miktarda tartılarak 3 mM olacak şekilde 2-propanolde çözüldü. 100 mM pH 10.0 Glisin–NaOH tamponu, % 0.4 Triton X-100 ve % 0.1 Arabic Gum ile aktivite tamponu hazırlandı. Reaksiyon karışımı 171 µL aktivite tamponu, 19 µL substrat (*p*-NPP) ve 10 µL enzim özütünden oluşmaktadır. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra optimum sıcaklıkta 20 dakika inkübe edildikten spektrofotometrik olarak 410 nm'de ölçüldü.

1 lipaz ünitesi, dakikada 1 µmol *p*-nitrofenil oluşturan enzim miktarı demektir. Spesifik aktivite ise, 1 mg proteinde bulunan lipaz ünite sayısıdır. B5 izolatu için maksimum lipaz aktivitesi 7.59 U/mL, spesifik aktivitesi ise 263.16 U/mg olarak ölçülmüştür.

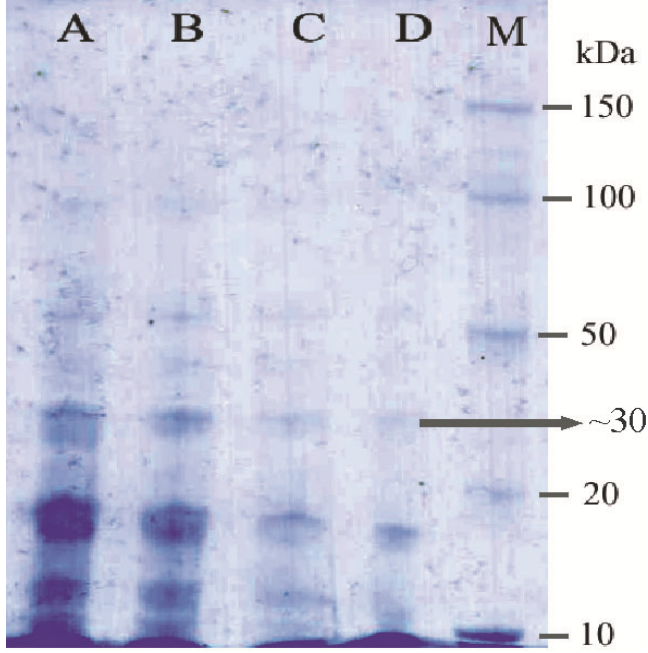
3.7. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve SDS Jel Elektrofrez

B. cenocepacia B5 suşundan elde edilen lipazın aktivitesini görmek amacıyla enzim ve farklı konsantrasyondaki seyreltmeleri (1/2, 1/5, 1/10) jele yüklendi. Elektrofrez işlemi bittikten sonra jele substrat boyaması yapıldı ve bantlar görünür hale geldi (Şekil 5).



Şekil 5. Ham enzim özütü ve seyreltmelerin Doğal PAGE bantları (A: Ham enzim özütü, B: 1/2 seyreltme, C: 1/5 seyreltme, D: 1/10 seyreltme).

B5 lipazının moleküler ağırlığını saptamak amacıyla SDS-PAGE yapıldı. Enzim ve farklı konsantrasyondaki seyreltmeleri (1/2, 1/5, 1/10) jele yüklendi. SDS-PAGE sonrası elde edilen bantlardan lipazın molekül ağırlığı yaklaşık 30 kDa olarak belirlendi (Şekil 6).

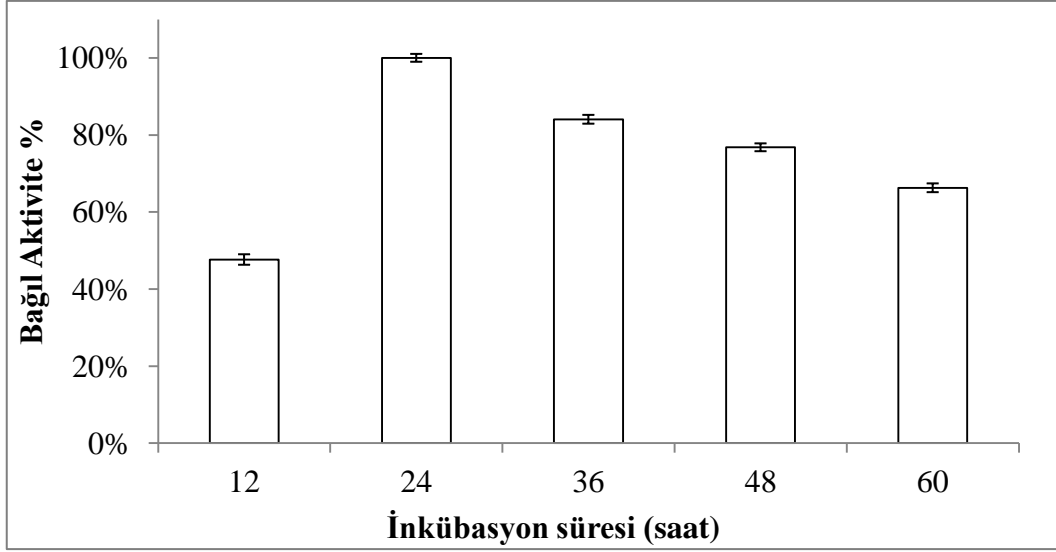


Şekil 6. Ham enzim özütü ve seyreltmelerin SDS-PAGE profilleri (A: Ham enzim özütü, B: 1/2 seyreltme, C: 1/5 seyreltme, D: 1/10 seyreltme, M: markır)

3.8. Lipazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.8.1. Enzim Aktivitesine İnkübasyon Süresinin Etkisi

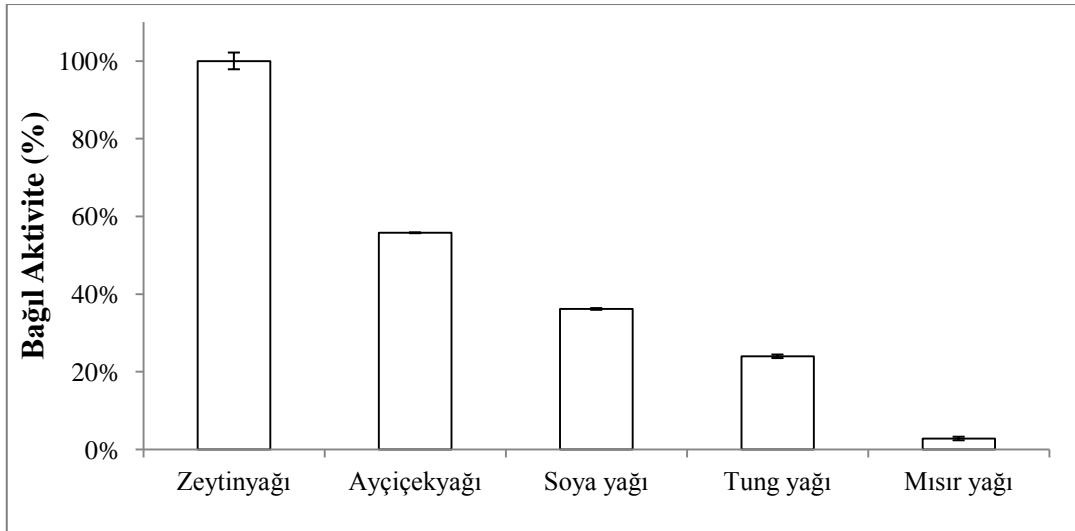
Lipaz üretiminin zamana bağlı değişimini izlemek için 12 saatte bir lipaz aktivitesi ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda en yüksek lipaz aktivitesi 24. saat sonunda elde edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. B5 lipazına inkübasyon süresinin etkisi

3.8.2. Enzim Aktivitesine Farklı Yağların Etkisi

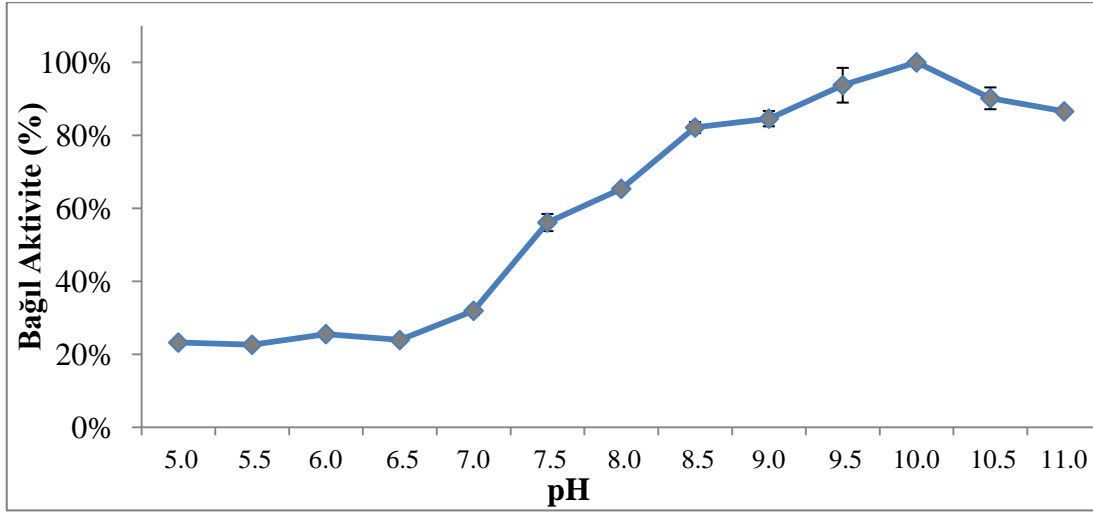
Zeytin yağı, ayçiçeği yağı, mısır yağı, fındık yağı ve soya yağı % 2.5 oranında kullanılarak hazırlanan besiyerlerinden elde edilen enzim özütlerinin aktiviteleri incelendi. Şekil 8’de görüldüğü gibi, en yüksek aktivite zeytinyağı substratı varlığında gözlenirken en düşük ise mısır yağında ölçüldü. Bu nedenle bundan sonra yapılan çalışmalarda zeytinyağı indüktör olarak kullanıldı.



Şekil 8. B5 lipaz üretimine farklı yağların etkisi

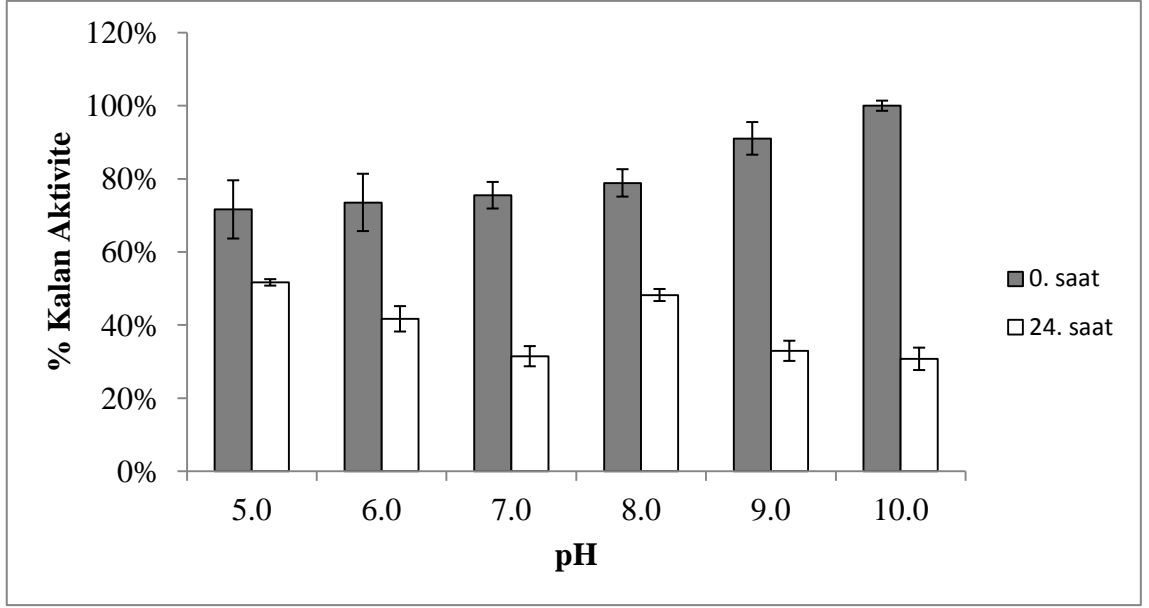
3.8.3. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi ve pH Kararlılığı

Lipaz aktivitesi, 20 mM asetat tamponunda pH 5.0-5.5; 20 mM fosfat tamponunda pH 6.0-7.0 ve 20 mM Tris-HCl tamponunda pH 7.5-9.0 değerleri arasında, 20 mM Glisin-NaOH tamponunda pH 9.5-11.0 değerleri arasında substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü ve en yüksek aktivite pH 10.0'da saptanmıştır. pH 10.0'daki lipaz aktivitesi % 100 kabul edilip diğer pH değerlerindeki aktiviteler buna oranlanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. B5 lipazına pH'nın etkisi

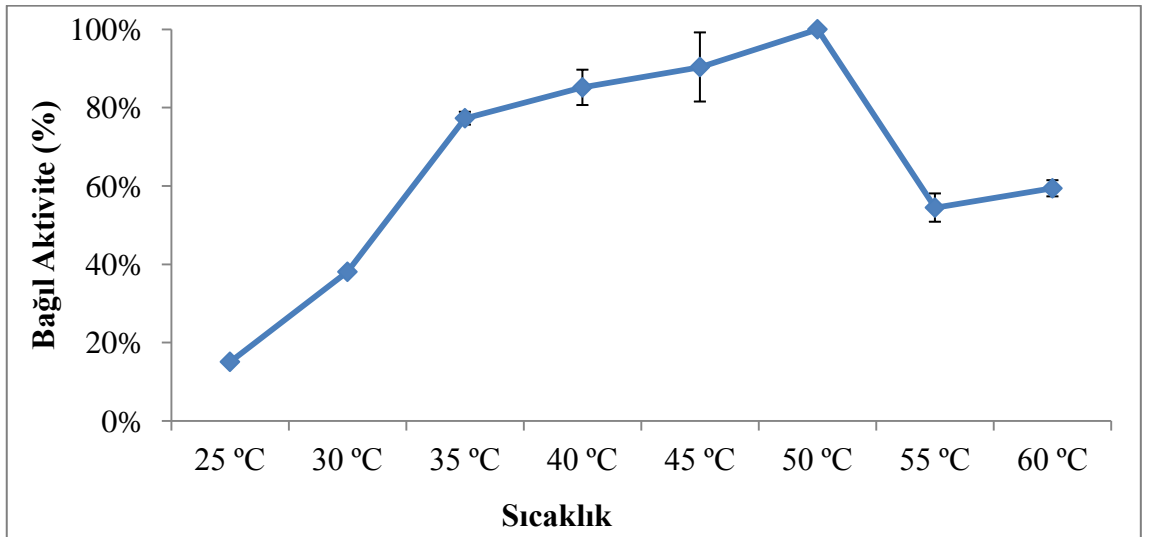
pH stabilitesi için; 20 mM pH 5.0-11.0 aralığındaki tamponlar ile enzim örnekleri (1:1) oranda alınarak +4 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi ölçüldü. İnkübasyona tabi tutulmayan kontrol numunelerinin aktivitesine göre yüzde kalan aktivite hesaplandı. Şekil 9'de görüldüğü gibi 24 saat sonunda enzimin pH 6 ve pH 9'da nispeten kararlı olduğu görüldü. pH 5'te kararlı olmasına rağmen aktivitenin iyi olmadığı belirlendi. Optimum pH olan pH 10'da ise kalan aktivite % 31 olarak ölçüldü. Enzimin farklı pH'larda çok kararlı olmadığı görüldü.



Şekil 10. B5 lipazının pH kararlılığı

3.8.4. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi ve Sıcaklık Kararlılığı

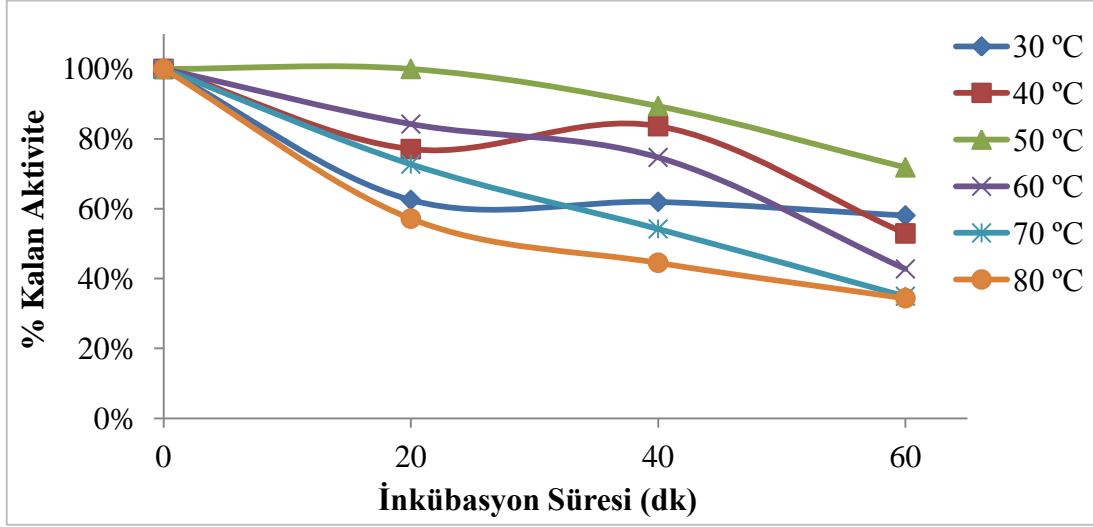
Topraktan izole edilen B5 izolatının 25-60 °C sıcaklıklarda lipaz aktivitesi ölçüldü ve optimum sıcaklığı 50 °C olarak tespit edildi. 50 °C’de ki lipaz aktivitesi % 100 kabul edilip diğer sıcaklık değerlerindeki aktiviteler buna oranlanmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. B5 lipazına sıcaklığın etkisi

Lipaz enziminin sıcaklık stabilitesi için 30-80 °C aralığındaki sıcaklıklarda enzim bir saat ön inkübasyona bırakıldı. 20 dakikalık zaman aralıkları ile örnek alınıp daha önceden belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta enzim aktivitesi ölçülerek kalan

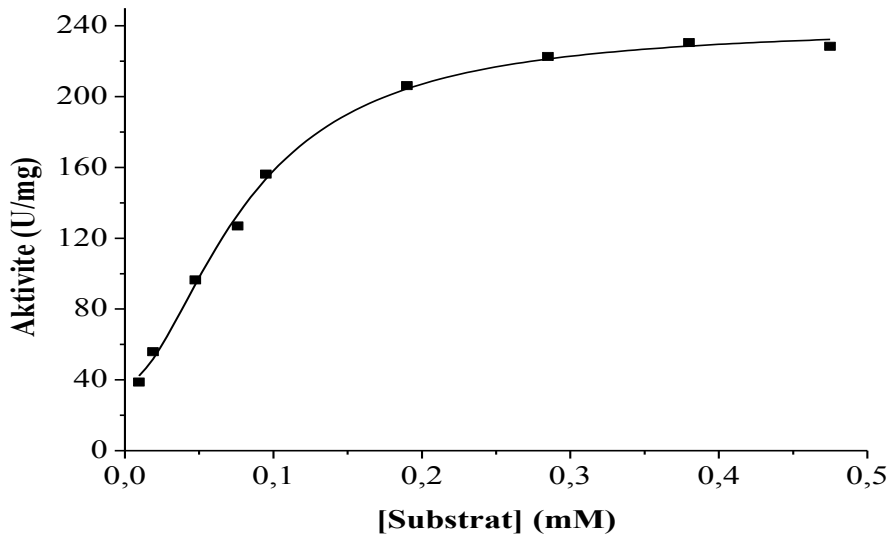
aktivite belirlendi. Şekil 12'deki grafik sonuçlarına göre enzim aktivitesini 30-40 °C'de 1 saat inkübasyon sonun da ortalama % 55 korumuştur. 50 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini % 72 korurken 70 ve 80 °C'de 1 saat sonunda enzim aktivitesinin% 34'ünü koruduğu görüldü.



Şekil 12. B5 lipazının sıcaklık kararlılığı

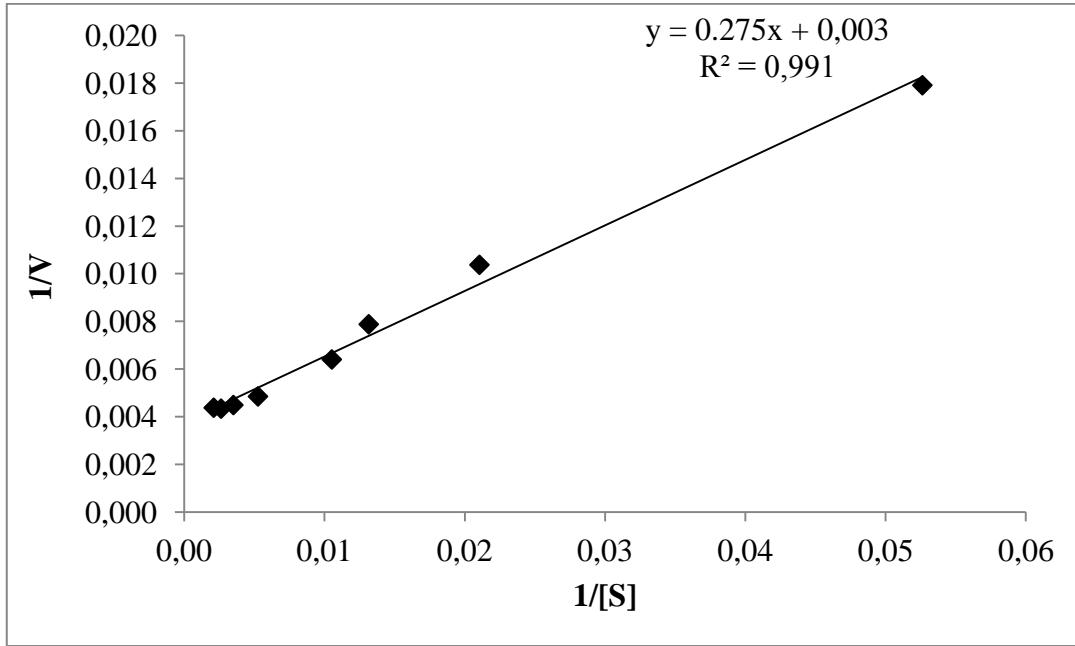
3.8.5. Enzim Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için, substrat doygunluğunu gösteren Michaelis-Menten eğrisi çizildi. Aktivite, substrat derişimi arttıkça artmıştır ve bu ilişki Michaelis-Menten kinetiğine uyum göstermektedir (Şekil 13).



Şekil 13. p-NPP varlığında lipazın substrat doygunluk eğrisi

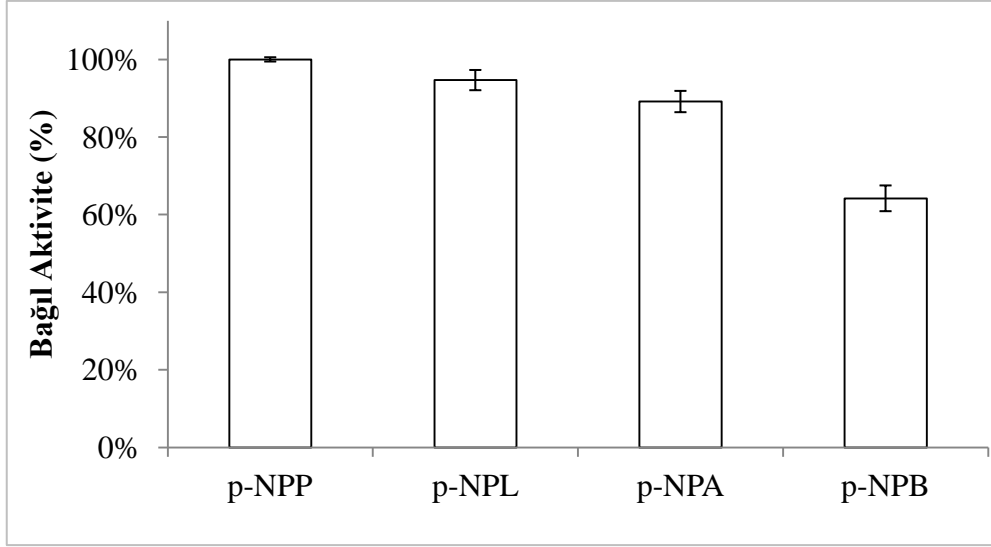
Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hızı (V_{maks}) tespit etmek amacıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafiğe göre K_m değeri 0.072 mM ve V_{maks} değeri ise 263.16 U/mg olarak tespit edildi. K_m sabiti, enzimin substrata olan ilgisini belirtir. Düşük K_m değerleri, enzimin substrata olan ilgisinin yüksek olduğunu gösterir (Şekil 14).



Şekil 14. Lineweaver-Burk grafiği

3.8.6. Enzim Aktivitesine Farklı Substratların Etkisi

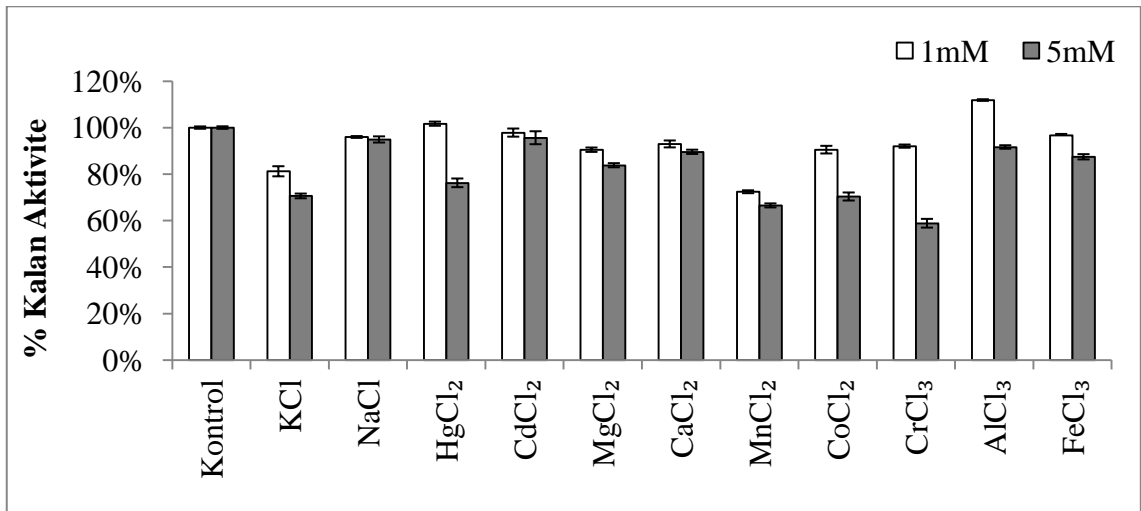
Farklı substratların lipaz aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla *p*-NPA, *p*-NPB, *p*-NPL ve *p*-NPP'nin 3 mM'lik çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler reaksiyon karışımına gereken ölçüde katıldı ve enzim aktivitesi belirlenen optimum şartlarda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yapılan aktivite deneylerinde enzim için en uygun substratın *p*-NPP olduğu tespit edildi (Şekil 15).



Şekil 15. B5 lipazının farklı substratlara karşı spesifitesi

3.8.7. Enzim Aktivitesine Metal İyonlarının Etkisi

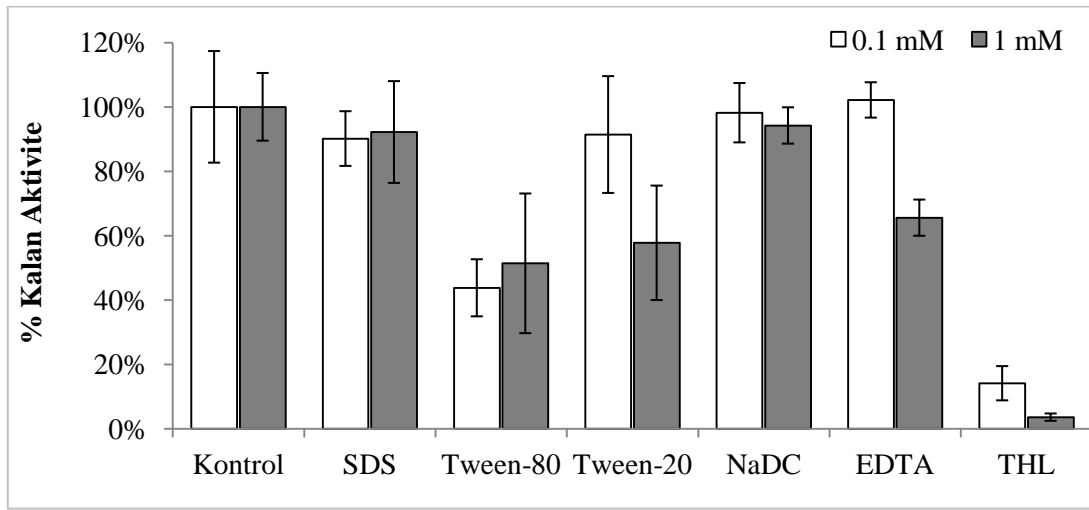
Aktiviteye metal iyonlarının etkisinin test edilmesi için bazı metal iyonlarının 1 mM ve 5 mM'lık konsantrasyonları hazırlandı. Kontrol % 100 kabul edilip diğer sonuçlar buna oranlanmıştır. Genel olarak 1 mM'lık metal çözeltileri 5 mM'lık çözeltilere göre aktiviteyi arttırmıştır. Cr³⁺ iyonunun 5 mM'lık çözeltisi aktiviteyi % 41 oranında azalttığı ve Al³⁺ iyonunun 1 mM'lık çözeltisi ise aktiviteyi % 12 oranında arttırdığı görülmüştür (Şekil 16).



Şekil 16. B5 lipazına bazı metal iyonlarının etkisi

3.8.8. Enzim Aktivitesine Çeşitli Kimyasalların Etkisi

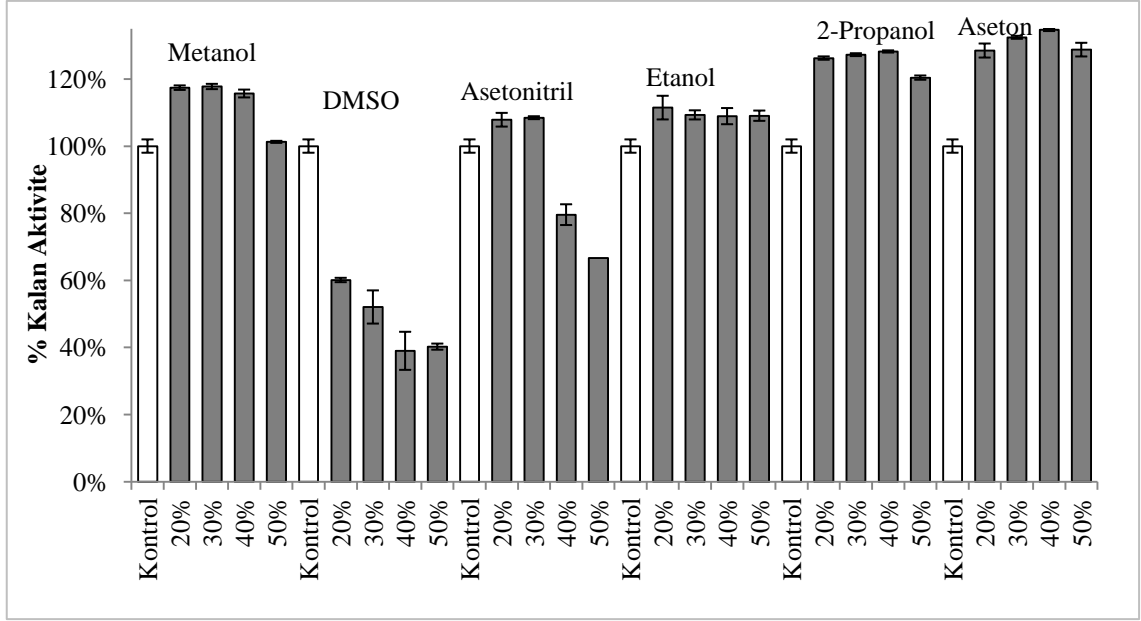
Aktiviteye kimyasalların etkisini test etmek için çözeltiler 1 mM ve 5 mM olacak şekilde hazırlandı. Kimyasal içermeyen kontrol % 100 kabul edilip diğer sonuçlar buna oranlanmıştır. Kullanılan kimyasalların konsantrasyonu arttıkça aktivite inhibe olmuştur. Bir lipaz inhibitörü olan THL beklendiği gibi aktiviteyi neredeyse tamamen inhibe etmiştir. Tween 80 için kalan aktiviteyi ortalama % 48, Tween 20 ve EDTA'nın 1 mM'lık çözeltilerinin kalan aktiviteleri sırasıyla % 58 ve % 66 olarak ölçülmüştür. Diğer çözeltilerde önemli bir değişme olmamıştır.



Şekil 17. B5 lipazına bazı kimyasalların etkisi

3.8.9. Lipaz Aktivitesine Organik Çözücülerin Etkisi

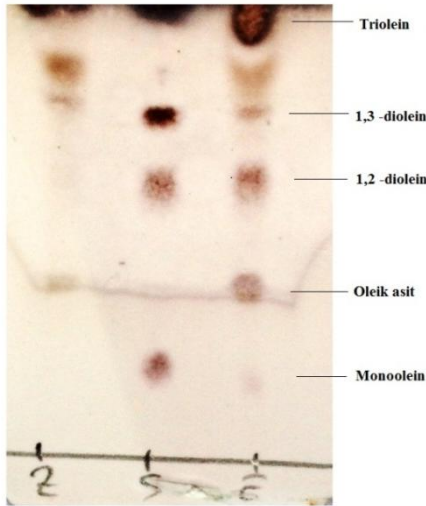
Lipaz enziminin organik çözücülerdeki kararlılığını belirlemek için % 20, % 30, % 40 ve % 50 (h/h)'lik çözeltiler hazırlandı. Enzim ve çözücüler (1:1) karıştırılarak 30 dakika 37 °C sıcaklığında ön inkübasyona tabi tutulup reaksiyon karışımına katılmıştır. Süre sonunda kontrol numunesine göre kalan aktiviteler incelendiğinde, etanol, 2-propanol ve aseton çözeltilerinde enzim aktivitesinin arttığı görülürken, DMSO'nun tüm çözeltileri, asetonitrilin ise % 40 ve % 50'lik çözeltileri aktiviteyi inhibe etmiştir. Metanolün % 20, % 30 ve % 40'lık çözeltileri aktiviteyi % 18 oranında arttırırken % 50'lik metanol çözeltisi kontrol ile eşdeğer aktivite göstermiştir (Şekil 17).



Şekil 18. B5 lipazının organik çözücülerdeki kararlılığı

3.9. Zeytinyağı Hidrolizi

B. cenocepacia B5 suşundan izole edilen lipaz enzimine ait reaksiyon son ürünlerinin araştırılması yapıldı ve zeytinyağını trigliseritlere parçaladığı görülmüştür (Şekil 19). Standart olarak mono-,di- ve trigliserid karışımı kullanıldı (1787, Supelco). Standartların eterde % 2'lik çözeltileri hazırlandı.



Şekil 19. B5 lipazının zeytinyağı hidrolizi (Z: Zeytinyağı, S: Standart, E: B5 enzimi)

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Çalışmamızda çeşitli bölgelerden toprak örnekleri alındı ve Rhodamine B agar besiyerine ekildi. 37 °C’de 1 gün inkübasyon sonunda lipaz üreten izolatlar belirlendi (Şekil 2). Pozitif sonuç veren izolatların kantitatif enzim aktiviteleri *p*-NPP varlığında spektrofotometrik olarak 410 nm’de ölçüldü (Şekil 3). Lipaz aktivitesi gösteren izolatlar hegzan içeren besiyerinde büyütülerek hegzana dirençli izolatlar belirlendi (Tablo 3).

Tüm veriler incelendiğinde, B5 izolatı için maksimum lipaz aktivitesi 17.462 U/mL, spesifik aktivitesi ise 513.5 U/mg olarak ölçülmüştür. Organik çözücülere de dirençli olduğu için bu izolatın tanılaması 16S rRNA gen bölgesine göre yapılmıştır. Gen Bankası’ndaki baz dizisi çakışmasına göre B5 izolatının *Burkholderia cenocepacia* olduğu tespit edilmiş ve bu amaçla B5 lipazının karakterizasyonu yapılmıştır (Tablo 5).

Benzer bir çalışmada değişik kaynaklardan elde edilen 104 termofilik bakteri izolatının ekstraselüler termostabil lipaz üretim kapasiteleri kantitatif olarak taranmıştır. Bunlardan sadece 26’si Rhodamin B Agar’lı modifiye *Thermoactinomyces* besiyerinde pozitif sonuç vermiştir ve potansiyel lipaz üreticisi olarak izolat EFTL17 (*Thermobifida fusca*) bundan sonraki çalışmalar için seçilmiştir (Koçyiğit, 2009).

Diğer bir çalışmada *Bacillus thermoleovorans* ID-1 suşu kullanılmış ve bu suşun ekstraselüler lipaz üretiminin tespiti için % 0.5 zeytinyağı içeren EM-1 adı verilen zenginleştirme besiyerine Rhodamine B boyası ilave edilmiştir. Çalışma sonucundan *Bacillus thermoleovorans* ID-1 suşunun ekstraselüler lipaz ürettiği ve turuncu zonlar meydana getirdiği tespit edilmiştir (Lee vd., 2009).

Aydın’da yapılan bir çalışmada çeşitli sıcak su kaynaklarından izole edilen 201 adet termofilik bakteri izolatının 22 tanesinin lipaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Seçilen 22 izolat LB broth ortamında geliştirilerek kantitatif lipaz aktiviteleri belirlenmiş ve HBB 134 izolatı 19.925 U/mL ile en iyi aktivite gösteren izolat olarak seçilmiştir. HBB 134 izolatının 16S rRNA dizi analizi sonucu en yüksek benzerlik oranı (% 99) *Anoxybacillus flavithermus* ile saptanmıştır (Ateşlier Bakır, 2009).

Bir çalışmada 21 farklı çevreden toprak ve su örnekleri alınmış, izole edilen toplam 38 tane organik çözücü tolerant mikroorganizma arasından en toksik organik çözücü olan % 30 toluende üreyebilen *Pseudomonas fluorescens* P21 izolatı aynı zamanda en iyi lipaz üreticisi organizma (35 U/L) olarak belirlenmiştir. Ayrıca P21 lipazı hegzan varlığında 2 saat sonunda aktivitesinin % 91.4’ünü koruduğu bildirilmiştir (Çadircı, 2009).

B. cenocepacia B5 lipazına inkübasyon süresinin etkisi incelendiğinde 37 °C 120 rpm'de 24 saat inkübasyon sonunda lipaz aktivitesi maksimuma ulaşmıştır (Şekil 6). Diğer çalışmalarda *B. sp.* ZYB002 suşu 30 °C 250 rpm'de 24 saat (Shu vd., 2012), *B. anthina* NT15 suşu 30 °C 200 rpm'de 72 saat (Jin vd., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* LX1 suşu ise 30 °C 200 rpm'de 36 saat inkübasyon sonunda en yüksek lipaz aktivitesi göstermiştir (Ji vd., 2010).

B.cenocepacia B5 suşuna ait lipazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE analizi ile yaklaşık 30 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 6). *B. anthina* NT15 lipazının moleküler ağırlığı 44.5 (Jin vd., 2012), *B. multivorans* V2 için 44 kDa (Dandavate vd., 2009), *B. cepacia* G63 suşu için 33 kDa (Yang vd., 2007), *Burkholderia cepacia* ATCC 25609 türü için 28 kDa olarak belirlenmiştir (Dalal vd., 2008).

Zeytinyağı, ayçiçeği yağı, mısır yağı, fındık yağı ve soya yağı % 2.5 oranında kullanılarak hazırlanan besiyerlerinden elde edilen enzim özütlerinin aktiviteleri incelendiğinde B5 lipazının en yüksek aktiviteyi zeytinyağı varlığında göstermiştir (Şekil 8). *B. sp.* ZYB002 için soya yağı (Shu vd., 2011), *B. multivorans* V2 suşu, hint yağı, fındık yağı, mısır yağı ve zeytinyağı ile yapılan aktivite çalışmalarında en yüksek lipaz aktivitesi zeytinyağı varlığında tespit edilmiştir (Dandavate vd., 2009).

Lipazların genellikle alkali pH'larda aktivite gösterdikleri bilinmektedir (Fojan vd., 2000). B5 suşuna ait lipazın en iyi aktivite gösterdiği pH'nın belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada, suş en iyi aktiviteyi pH 10.0'da (Şekil 9), optimum sıcaklığı da 50 °C'de göstermiştir (Şekil 11). Diğer çalışmalarda *Pseudomonas sp.* için optimum pH 11.0 sıcaklık 90 °C (Rathi vd., 2000), *B.sp.* RGP10 için optimum pH 7.0, sıcaklık 50 °C (Rathi vd., 2001) ve *B. anthina* NT15 için optimum pH 9.5 sıcaklık ise 30 °C (Jin vd., 2012), *Acinetobacter sp.* RAG-1'in lipazı (LipA) optimum aktivitesini yaklaşık olarak pH 9.0'da ve 55 °C'de göstermiştir (Snellman vd., 2002).

B5 lipazı, farklı pH değerlerinde 4 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldığında, nötr ve hafif alkali pH değerlerinde lipaz aktivitesinde genel olarak ciddi kayıpların olmadığı gözlenmiştir (Şekil 10). *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 lipazı da pH 5.00-9.50 arasında 20 saat sonunda aktivitesinin yaklaşık % 80'ini korumuştur (Zhang vd., 2009). *Pseudomonas sp.*'den saflaştırdıkları S5 lipazının pH 6.0-9.0 aralığında stabil olduğunu saptamışlardır (Rahman., 2005. *Bacillus subtilis* lipazı farklı pH tamponları (3.0-10.0) ile karıştırılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kalan enzim aktivitesi % 56 ile pH 8.0'de en yüksek ölçülmüştür. Diğer pH ortamlarında

enzim aktivitesi % 30'un altında korunmuştur (Tanrısever, 2011). *Acinetobacter* sp. RAG-1'in lipazı (LipA), pH 5.8-9.0 arasında 20 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin tamamını korumuştur (Snellman vd., 2002).

B. cenocepacia B5 lipazının, 30-80 °C aralığında, 20 dakikada bir aktivite tayini yapılmak suretiyle, toplam 60 dakikalık inkübasyonu sonunda kalan aktiviteleri belirlendi (Şekil 12). Enzim aktivitesinin 30-40 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda ortalama % 55 korunmuştur. 50 °C'de 1 saatlik ön inkübasyon sonunda aktivitesini % 72 korurken 70-80 °C'de 1 saat ön inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin % 34'ünü koruduğu görüldü.

B. sp. C20 lipazı 40-70 °C aralığında 14 saat inkübasyona bırakıldığında kalan aktivitesi % 60 olarak belirlenmiştir (Liu vd., 2012), *B.sp. ZYB002* lipazı 70 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda kalan aktivite % 79.2 (Shu vd., 2012), *Bacillus subtilis* EH 37 lipazı aktivitesinin % 100'ünü 60 dakika boyunca 50 °C ve 60 °C'de korumuştur (Ahmed vd., 20010), *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 enzimin optimum sıcaklığı 55 °C olarak belirlenirken 50 ve 60 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitenin sırasıyla % 90 ve % 75'i korunmuştur. Bununla beraber 60 °C'nin üzerinde aktivitede belirgin bir düşüş gözlenmiştir (Zhang vd., 2009).

B. cenocepacia B5 lipazının optimum substrat konsantrasyonu *p*-NPP substratı varlığında 3 mM olarak belirlendi. Kinetik parametrelerin hesaplanabilmesi için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek lipaz enzimi için K_m değeri 0.068 mM ve V_{maks} değeri ise 263.16 U/mg olarak bulunmuştur (Şekil 13). *B. cepacia* ATCC 25609 için K_m 0.11 mM ve V_{maks} 230 U/mg (Dalal vd., 2008), *B. anthina* NT15 için *p*-NPB substratı varlığında K_m 0.10 mM, V_{maks} 380 U/mg (Jin vd., 2012), *Candida rugosa* için *p*-NNP substratı varlığında K_m 0.44 mM, V_{maks} 115 U/mg (Tutar, 2009) ve *B. sp. C20* için K_m 12.06 mM ve V_{maks} 11.29 U/mg olarak belirlenmiştir (Liu vd., 2009). Yapılan çalışmalar ışığında farklı kaynaklardan izole edilen lipaz enzimlerinin K_m değerleri kullanılan substratlara göre de farklılık göstermektedir.

B. cenocepacia B5 lipazının çeşitli karbon uzunluğundaki (C2-C18) *p*-nitrofenil esterlere karşı spesifitesi incelendiğinde en yüksek aktivitesini *p*-NPP (C16)'a karşı gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 15). Yapılan çalışmalarda *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazı için en yüksek aktivite *p*-nitrofenil kaproat (C6) varlığında (Castro-Ochoa vd., 2005), *Pseudomonas aeruginosa* LX1 lipazı için *p*-NPP (Ji vd., 2010), *Burkholderia* sp. ZYB002 lipazı için *p*-nitrofenil dekonat (Shu vd., 2012),

Pseudomonas aeruginosa PseA lipazın için *p*-NPP (Gaur vd., 2008) ve *B. anthina* NT15 lipazı için ise *p*-NPB (C4)'a karşı yüksek aktivite göstermiştir (Jin vd., 2012).

Metal iyonlarının, genellikle enzimin spesifik bölgelerdeki negatif yüklü aminoasit birimlerine bağlanarak enzimin aktif ve kararlı yapısını korumasında etkili bir rol oynadığı bilinmektedir (Şişik, 2003). B5 lipazı aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarının çoğu aktiviteyi kısmen inhibe etmiştir. Cr³⁺ iyonunun 5 mM'lık çözeltisi aktiviteyi % 59 oranında azalttığı, Al³⁺ iyonunun 1 mM'lık çözeltisi ise aktiviteyi % 12 oranında arttırdığı görülmüştür (Şekil 16). *Bacillus coagulans* BTS-3 lipazının Al³⁺, Co²⁺, Mn²⁺ ve Zn²⁺ iyonları tarafından inhibe olurken K⁺, Fe³⁺, Hg³⁺ ve Mg²⁺ iyonlarının aktiviteyi artırdığı ve Na⁺ iyonlarının ise aktivite üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Kumar vd., 2005). *B. sp* HY-10 suşu 2 mM'lık metal çözeltilerinden Cu²⁺, Fe³⁺, Na⁺ tarafından inhibe olurken, Mn²⁺, Ca²⁺, K²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ ve Mg²⁺ tarafından aktive edilmiştir (Park vd., 2007). *Serratia marcescens* ECU1010'dan elde edilen lipazın Fe²⁺, Fe³⁺ ve Zn²⁺ dışındaki pek çok metal iyonuna karşı aktivitesini büyük oranda koruduğu bildirilmiştir (Zhao vd., 2008). *B. cenocepacia* ST8 lipazı Ca²⁺ iyonu varlığında aktive olurken Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, Fe²⁺, Cu²⁺ ve Co²⁺ iyonları tarafından inhibe olmuştur (Lau vd., 2011). *Pseudomonas* spp. lipaz aktivitesi üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından Mn²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ varlığında enzim kısmen inhibe olurken Cd²⁺ da önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Boran, 2008). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında metal iyonlarının etkileri incelendiğinde birbirinden farklı sonuçların alındığı görülmektedir.

B. cenocepacia B5 suşuna ait lipaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisi araştırılmış ve Tween 80 için kalan aktivite ortalama % 48 olarak ölçülmüştür. 1 mM'lık Tween 20 ve EDTA'nın kalan aktiviteleri sırasıyla % 8 ve % 66 olarak tespit edilmiştir. THL aktiviteyi neredeyse tamamen inhibe etmiştir. Diğer çözeltilerde önemli bir değişme olmamıştır (Şekil 17). *B. anthina* NT15 ile yapılan çalışmada % 0.1'lik SDS, Tween 20, Tween 80 ve NaDC çözeltileri için kalan enzim aktivitesi sırasıyla % 98.9, % 99.5, % 87.8, ve % 99.7 olarak ölçülmüştür (Jin vd.,2012). *B. cepacia* lipazı ise % 1'lik Tween 20, Tween 80 ve SDS varlığında sırasıyla % 57, % 40 ve % 33 oranında inhibe olduğu görülmüştür (Rathi vd., 2001). *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazının % 1'lik Tween 20 ve Tween 80'in enzimi tamamen inaktive ettiği bildirilmiştir (Castro-Ochoa vd., 2005). *Bacillus thermocatenulatus* lipazı da SDS, Tween 20 ve Tween 80 tarafından inhibe edilmiştir (Rua vd., 1997). *Pseudomonas*.

fluorescens RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi aktivitesi üzerine 5 mM'lık SDS, Tween 80 ve EDTA'nın etkisi araştırılmış ve enzimin EDTA varlığında % 25 oranında inhibe olurken, Tween 80 varlığında % 2 oranında bir artış gözlenmiştir. SDS varlığında ise enzim aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir (Boran, 2008).

Organik çözücülerde stabilite, lipazların düşük su oranı içeren sistemlerde gerçekleştirilen sentez reaksiyonlarında kullanımında istenen önemli bir özelliktir (Lima vd., 2004). Organik çözücülere dayanıklı-lipazlar biyopolimerlerin sentezinde, transesterifikasyon reaksiyonlarında ve biyodizel üretiminde etkili katalizörler olarak rol oynamaktadır (Dizge vd., 2009; Singh vd., 2010). Bir çok mikrobiyal lipazın organik çözücülere duyarlılığı değişkenlik göstermektedir. Organik çözücülere direnç gösteren enzimler endüstride oldukça geniş bir uygulama alanı bulabilmektedir (Koçyiğit, 2009). B5 lipazı üzerinde çözücü aktivitesi incelendiğinde, etanol, 2-propanol ve aseton çözeltilerinde enzim aktivitesinin arttığı görülürken, DMSO'nun tüm çözeltileri, asetonitrilin ise % 40 ve % 50'lik çözeltileri aktiviteyi inhibe etmiştir. % 20, % 30 ve % 40 metanol varlığında aktivite % 18 oranında artırırken % 50 metanol ile eşdeğer aktivite göstermiştir (Şekil 18). Bu durum B5 lipazının organik çözücü stabilitesinin iyi olduğunu ve sentez reaksiyonlarında kullanılabileceğini göstermektedir.

B. anthina NT5 lipazı % 30 ve % 50'lik hazırlanan aseton ve etanol ile (1:1) oranda 30 °C'de yarım saat ön inkübasyona tabi tutulmuş. % 30 ve % 50 aseton için kalan aktiviteler sırasıyla % 41 ve % 35 iken etanol için kalan aktiviteler ise % 75 ve % 57 olarak ölçülmüştür (Jin vd., 2012). *B. sp.* ZYB002 suşu lipazı son konsatrasyon % 50 olacak şekilde etanol ve metanol varlığında 28 °C'de 24 saat ön inkübasyon sonucu kalan aktiviteler sırasıyla % 32 ve % 15 olarak belirlenmiştir (Shu vd., 2012). *B. cepacia* G63 suşu enzimi % 50 metanol ile 48 saat inkübasyon sonrasında kalan aktivite % 98 ölçülmüştür (Yang vd., 2007). *Thermobifida fusca* EFTL17 lipazı % 10 etanol içeren reaksiyon karışımında kontrol ile aynı aktivite gösterirken, metanolde aktivite % 10, izopropanolde % 9 ve asetonunda % 10'luk bir aktivite artışına neden olmuştur (Koçyiğit, 2009). *B. thermoleovorans* lipazının 30 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda % 70 metanol, aseton ve 2-propanolde aktiviteyi tamamen koruduğunu bildirmişlerdir (Castro-Ochoa 2005).

Sonuç olarak, bu çalışmada topraklardan izole edilen bakterilerin lipolitik aktiviteleri belirlenmiş, en iyi aktivite gösteren ve organik çözücülere dirençli olan izolatın *B. cenocepacia* B5 olduğu tespit edilmiştir. İzolatın ürettiği lipazın

karakterizasyonu, *p*-nitrofenil palmitat substratı varlığında yapılmıştır. Enzimin organik çözücülerde oldukça kararlı olduğu ve biyodizel üretiminde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

5. ÖNERİLER

Bu çalışmada topraktan izole edilen suşlardan, lipolitik aktiviteleri yüksek olanlarında karakterizasyon ve saflaştırma çalışmaları yapılabilir.

Mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan enzimler için, mikroorganizmanın enzimi en fazla ürettiği optimum koşullar belirlenmelidir. Dolayısıyla, mikroorganizmanın çoğaltılmasında farklı besiyerleri ve farklı pH kullanılarak tüm şartlar optimize edilebilir.

Lipaz enzimi klorobenzen, benzen, toluen gibi hidrofobik çözücülerde daha uzun sürelerde veya bu çözücülerle daha yüksek yüzdelerde inkübasyona bırakılarak aktiviteleri değerlendirilebilir ve özellikle sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği incelenebilir.

Daha önce lipolitik aktivitesi olduğu belirlenen ancak ürettikleri enzimlerin verimleri, aktiviteleri veya stabiliteleri düşük olan suşların protein mühendisliği yöntemlerinin kullanıldığı proje çalışmaları yapılabilir.

Enzimin saflaştırılıp daha iyi karakterize edilmesi ve kimyasal sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği incelenebilir.

Bu enzimi kodlayan gen bölgesi tespit edilip bir ekspresyon vektörüne klonlanıp *E.coli*'ye aktarılması sonucunda daha fazla enzim daha düşük maliyetle üretilmiş olur.

Organik çözücülere dirençli olan lipaz enzimi immobilize edilip biyodizel üretimi çalışmalarında kullanılabilir.

Burkholderia cenocepacia B5 suşunun biyoremediasyonda kullanılabilirliği araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abigor, R.D., Uadi, P.O., Foglia, T.A., Haas, K.C., Okpefa, J.E., Obibuzor, J.U., 2000.** Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem Soc Trans*, 28, 979-81.
- Ahmed, E. H., Raghavendra, T., Madamwar, D., 2010.** A thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: characterization, partial purification, and application in organic synthesis, *Appl Biochem Biotechnol*, 160, 2102-2113.
- Akünel, T. ve Tolay, M., 2003.** Biyomotorin, Avusturya ve Türkiye, Bitirme Tezi, İTÜ, İstanbul.
- Anonim. 1992.** Enzyme Nomenclature. Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB), California.
- Aono, R., Ito, M., Inoue, A. and Horikoshi, K., 1992.** Isolation of novel toluene-tolerant su of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 145-146.
- Arıcı, Ş.E., 2006.** Somaklonal Varyasyondan Yararlanarak İn Vitro Seleksiyonla Buğday (*Triticum aestivum* L.)’da Başak Yanıklığına (*Fusarium* spp.) Dayanıklı Bitki Elde Edilmesi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bakır Ateşlier, B.Z., 2009.** Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134’ün Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Boran, R., 2008.** *Pseudomonas* spp.’de Lipaz Enzimi Üzerine Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., and Krishna, S.H., 2002.** Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnol*, 20, 433-437.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro G., Ros, R.O. 2005.** Screening, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 648-654.
- Chen, L., Daniel, R. M., Coolbear, T., 2003.** Detection and impact of protease and lipase activities in milk powders. *International Dairy Journal*, 13, 255-275.

- Çadırcı, B.H., 2009.** Organik çözümlere tolerant lipaz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonu. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Çoban, B., 2009.** Zeytin Karasuyundan Mikrobiyal Lipaz Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Dalal, S., Singh, P.K., Raghava, S., Rawat, S., Gupta, M.N., 2008.** Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25609. Biotechnol. Appl. Biochem, 51, 23-31.
- Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H., Madamwar, D., 2009.** Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. Bioresource Technology, 100, 3374-3381.
- Demirbağ, Z., ve Demir, İ., 2007.** Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı. Esen Ofset Matbaacılık, 3. Baskı, ISBN:975-98513-5-0, 158s.
- Divakar, S., Manohar, B., 2007.** Use of lipases in industrial production of esters, industrial enzymes structure function and applications, Julio Polaina ve Andrew P. MacCabe, Springer, Spain, 283-300.
- Dizge, N., Aydın, C., İmer, D. Y., Bayramoğlu, M., Tanrıseven, A., Keskinler, B., 2009.** Biodiesel production from sunflower, soybean and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. Bioresource Technology, 10, 1983-1991.
- Du, W., Xu, Y., Liu, D., Zeng, J., 2004.** Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. Journal. Molecular. Catalysis. B: Enzymatic, 30, 125-129.
- Eggert, T., Poudroyen, G. V., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, W.B., Jaeger, K.E., 2002.** Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 26, 37-46.
- Elibol, M., Dursun, O., 2000.** Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*. Process Biochem, 36, 219-223.
- Faiz, Ö., 2005.** Yeni bir termofilik bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, hücre dışı lipaz/esteraz yeteneğinin incelenmesi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B. 2000.** What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. Biochimica, 82, 1033-1041.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda H., 2001.** Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Engineering, 92, 405-416.

- Gandhi, N.N., 1997.** Applications of lipases. *Jaocs*, 74, 621-634.
- Gao, X. G., Cao, S. G., Zhang, K. C., 2000.** Production, properties and application tononaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas strain*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 74-82.
- Gaur, R., Pant, H., Jain, R., Khare, SK., 2006.** Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chem.* 97, 426-430.
- Gaur, R., Gupta, A., Khare, S.K., 2008.** Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*, 43, 1040-1046.
- Gaur, R., Gupta, R., Khare, S.K., 2008.** Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production, optimization by response surface methodology and application. *Bioresource Technology*, 99, 4796-4802.
- Gonzalez Gomez, ME., Hildige, RH., Leahy, JJ., Rice, B., 2002.** Winterisation of waste cooking oil methyl ester to improve cold temperature fuel properties. *Fuel*. 81, 33-39.
- Gözükara, F., 2009.** Termofil *Bacillus* sp. bakterisinden Lichenaz (B-1,3 Ve 1,4 Glucanase) enzimi üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik kullanılabilirliği. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova.
- Graboski, M.S., and McCormick, R.L., 1998.** Combustion of Fat and Vegetable Oil Derived Fuels in a Diesel Engine”, *Prog. Energy Combust. Sci*, 24, 125-164.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003.** Microbial α -Amylase: a Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*, 38, 1599-1616
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., 2004.** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 64, 763-781.
- Gümüsel, F., Sezen, İ.Y., ve Akçin, A., 2002.** Biyoteknoloji ve Endüstriyel Uygulama Alanları Lisansüstü Eğitim Semineri Kitabı, GYTE Matbaası, Gebze.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., 2006.** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.
- Hideki, F., Akihiko, K., and Hideo, N., 2001.** Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 405-416.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., Comeau, L.C. 2000.** Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolate from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 421-430.

- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo T., Shrestha, S., 2001.** Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme*, 16, 53-58.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., 1999.** Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews Microbiology*, 53, 315-351.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M., Misset, O., 1994.** Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 29-63.
- Jaeger, K.E., Reetz, M. T., 1998.** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.
- Ji, Q., Xiao, S., He B., Liu, X., 2010.** Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66, 264-269.
- Jin, D., Wang, Z., Cao J., Yu L., 2012.** Purification and characterization of a novel cold-adapted lipase from *Burkholderia anthina* NT15. *African Journal of Microbiology Research*. 6, 6075-6080.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, M., Kondo, A., Shimada, Y., 1999.** Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a watercontaining system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 62-31.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., Fukuda, H., 2001.** Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 12-15.
- Kamini, N.R., Lefuji, H., 2001.** Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2. *Process Biochemistry*, 37, 405-410.
- Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., Lefuji, H., 2000.** Production, purification and characterization of an extra cellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp.S-2. *Process Biochemistry*, 36, 317-324.
- Karaosmanoğlu, F., 2002.** “Türkiye İçin Çevre Dostu-Yenilenebilir Bir Yakıt Adayı: Biyomotorin”, *Kojenerasyon Dergisi*, ICCI 2002 özel Sayısı, İstanbul, 10, 50-56.
- Kıran, Ö.E., Çömlekcioglu, U., 2003.** Zeytinli ılıcası (Kahramanmaraş)’ndan termofil alkalifilik amilolitik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve amilaz üretme yetenekleri üzerine azot kaynaklarının etkisi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*. 6, 41-48.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002.** Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351.

- Koçyiğit, A., 2009.** Termofilik bakterilerden lipaz üretimi ve karakterizasyonu. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kouker, G., Jaeger, K.E. 1987.** Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 211-213.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., Gupta, R. 2005.** Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41, 38-44.
- Lau, H.L., Ariff, A., Woo, K.K., Ling, T.C., Hii S.L., 2011.** Production and optimization of alkalostable lipase by alkalophilic *Burkholderia cenocepacia* ST8. *African Journal of Biotechnology*, 10, 7002-7009.
- Lee, K.W., Bae, H.A., Shin, G.S., Lee, Y.H., 2006.** Purification and catalytic properties of novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* sp. ES-1 for hydrolysis of (S)-ketoprofen ethyl ester. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 443-448.
- Lee, D. G., Ponvel, K. M., Kim, M., Hwang, S., Ahn, I. S., Lee, C. H., 2009.** Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. *J. Mol. Catal. B. Enz.*, 57, 62-66.
- Lima, V. M. G., Kriegera, N., Mitchell, D. A., Baratti, J. C., Filippis, de I., Fontana, J.D., 2004.** Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31, 53-61.
- Lin, C.Y., Lin, H.A., 2005.** Diesel engine performance and emission characteristics of biodiesel produced by the peroxidation process. *Fuel*, 84, 1-8.
- Liu, C.H., Lin, Y.H., Chen, C.Y., Chang, J.S., 2009.** Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40, 359-363.
- Liu, C.H., Huang, C.C., Wang, Y.W., Chang, J.S., 2012.** Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43, 511-516.
- MacFaddin, J.F., 2000.** Biochemical tests for identification of medical bacteria, Third Edition, USA, 506-509.
- Masse, L., Kennedy, K. J., Chou, S. P. 2001.** The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76, 629-635.
- Mittelbach M., 1990.** Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil, *JAOCS*, 61,168-170.

- Nakajima, H., Kobayashi, M., Negishi, T. and Aono, R., 1995.** SoxRS gene increased the level of organic çözgen tolerance in *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1323-1325.
- Nawani, N., Dosanjh, N. and Kaur, J., 1998.** A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, 20, 997-1000.
- Nelson, L.A, Foglia, T.A, Marner, W.N., 1996.** Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal American Oil Chemistry Society*. 73, 1191-1195.
- 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.
- Öndül, E., Özaslaner, G. E., Albayrak, N., 2007.** Lipaz katalizörlüğünde biyodizel üretimini etkileyen faktörler. I.Ulusal Yağlı Tuhumlu Bitkiler ve Biyodizel Sempozyumu. 28-31 Mayıs 2007. Samsun.
- Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata, F.X., 2000.** “Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases”, *Enzyme and Microbial Technology*,1, 187-204.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, U. T. 1999.** The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 29, 119-131.
- Park, D-S., Oh, H-W., Heo, S-Y., Jeong, W-J., Shin, D.H., Bae, K.S., Park, H-Y., 2007.** Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. *Journal of Microbiology*, 45, 409-417.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Baharum, S. N., Basri, M., Salleh, A. B., 2005.** High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochem*, 341, 267-274.
- Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K., 2008.** A overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99, 3975-3981.
- Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R. K., Gupta, R., 2000.** A hyperthermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotech Letters*. Netherlands, 22, 495-498.
- Rathi, R., Saxena, R.K., and Gupta, R., 2001.** A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation, *Process Biochemistry*, 37, 187-192.
- Rua, M.L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A., Schmid, R.D. 1997.** Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production,

- purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity, *Journal of Biotechnology*, 56, 89-102.
- Sarıyıldız, Ü., 2005.** Petrol Dar Boğazına Alternatif: Biyodizel, Kimya Topluluğu, http://www.tepkime.net/2005_10_01_tepkime_archive.html, (Ziyaret tarihi: Haziran 2006).
- Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, S.W., Bradoo, S., Gulati, R., 1999.** Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science Online*, 77, 101-115.
- Schallmey, M., Singh, A., Waerd, O.P., 2004.** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1-17.
- Sekhon, A., Dahiya, N., Tiwari, R. P., Hoondal, G. S., 2005.** Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1. *J. Basic Microbiol*, 45, 147-154.
- Sharma, A. K., Tiwari, R. P., Hoondal G. S., 2001.** Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8, *J. Basic Microbiol*, 41, 363-366.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., 2001.** Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Singh, M., Saurav, K., Srivastava, N., Kannabiran, K., 2010.** Lipase production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in solid state fermentation using ground nut oil cakes as substrate, *Current Research Journal of Biological Sciences*, 2, 241-245.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., 2002.** Enzymatic alcoholysis for biodiesel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17, 133-142.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y., 1999.** Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 76, 789-793.
- Shu, Z.Y., Wu, J.G., Cheng, L.X., Chen D., Jiang, Y.M., Li, X., Huang, J.Z., 2012.** Production and characteristics of the whole-cell lipase from organic solvent tolerant *Burkholderia* sp. ZYB002. *Appl Biochem Biotechnol*, 166, 536-548.
- Snellman, E.A., Sullivan, E.R., Colwell, R.R. 2002.** Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur. J. Biochem*, 269, 5771-5779.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., 2003.** Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 97-103.

- Sökmen, B. B., 2005.** Kayısı tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Stoscheck, C. M., 1990.** Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182, 50–69.
- Şişik, D., 2003.** Yeni bir termofilik bakterinin, *Anoxybacillus gonensis*, polihidroksibutirat parçalama yeteneğinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. K.T.Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Taneja, S. C., Sethi, V. K., Andotra, S. S., Koul, S., Qazi, G. N., 2005.** Rose oxides: A facile chemo and chemo-enzymatic approach. *Synth. Commun*, 35, 2297-2303.
- Tanrısever, D., 2011.** *Bacillus subtilis*'ten termostabil lipaz üretimi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tesser, M., Serio, D., Guida, M., Nastasi, M., Santacesaria, E., 2005.** Kinetics of oleic acid esterification with methanol in the presence. of triglycerides. *Indian Engineering Chemistry Residues*, 44, 7978-7982.
- Tekiner, 2011.** *Bacillus megaterium* M22'den Lipaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Thongekkaew, J. ve Boonchird, C., 2007.** Molecular cloning and functional expression of a novel extracellular lipase from the thermotolerant yeast *Candida thermophila*, *FEMS Yeast Res*, 7, 232-243.
- Tutar, H., 2009.** *Candida rugosa* lipaz enziminin sporopollenin üzerine adsorbsiyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- URL-1, 2013.** <http://biyokure.org/biyodizelin-avantajlari-ve-dezavantajlari/5480> (20 Ekim 2013).
- URL-2, 2013.** <http://enerjiuretimsistemleri.blogspot.com.tr/2011/10/turkiyede-biyodizel-enerji.html> (12 Mart 2014).
- URL-3, 2014.** <http://www.vumicro.com/> (25 Şubat 2014).
- Van Beilen, J. B., Li, Z., 2002.** Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 338-344.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J M., Graille, J., Haas, M. J., 2000.** Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.

- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y., 2000.** Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *JAOCS*, 77, 355-359.
- Xu, J. H., Zhou, R., Bornscheuer, U. T., 2005.** Comparison of differently modified *Pseudomonas cepacia* lipases in enantioselective preparation of a chiral alcohol for agrochemical use. *Biocatal. Biotransform.*, 23, 415-422.
- Xu, Y., Du, W., Liu, D., Zeng, J., 2003.** A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnology Letters*. 25, 1239-1241.
- Yağız, F., 2006.** Hidrotalsit ve Zeolit Üzerine Tutuklanmış Lipaz ile Yemeklik Atık Yağlardan Biyodizel Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Yang, J., Daoyi, G., Yunjun, Y., 2007.** Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45, 91-96.
- Yuji, S., Yomi, W., Akio, S., And Yoshio, T., 2002.** Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 17, 133-142.
- Zhang, A., Gao, R., Diao, N., Xie, G., Gao, G., Cao, S. 2009.** Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 78-84.
- Zhao, L.L., Xu, J.H., Zhao, J., Pan, J., Wang, Z.L. 2008.** Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochemistry*, 43, 626-633.

ÖZGEÇMİŞ

Kadriye KOÇOĞLU, 1988 yılında Rize’de doğdu. İlk ve Orta öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2007 yılında girdiği Giresun Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 2011’de mezun oldu. Aynı yıl girdiği Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans programında öğrenim görmeye devam etmektedir.