

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Streptomyces lienomycini 350-2'NİN LİPAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve
BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURAK ŞEN

MAYIS 2014

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Streptomyces lienomycini* 350-2'NİN LİPAZ ENZİMİNİN**
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve
BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURAK ŞEN

MAYIS 2014

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

BURAK ŞEN tarafından hazırlanan *Streptomyces lienomycini* 350-2'NİN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANIMI başlıklı tezinin, 15/05/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Aysel UĞUR (Jüri Başkanı) (2. Danışman)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi, Ankara

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Nurdan SARAÇ (1. Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Özgür CEYLAN (Üye)

Arıcılık Programı,
Ula Ali Koçman Meslek Yüksekokulu, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Rukiye BORAN (Üye)

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi
Hizmetler ve Teknikleri Bölümü
Aksaray Üniversitesi, Aksaray

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK (Üye)

Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
Pamukkale Üniversitesi, Denizli

İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Nurdan SARAÇ (Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 15/05/2014

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Burak ŞEN

15/05/2014

ÖZET

***Streptomyces lienomycini* 350-2'NİN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BİYODİZEL ÜRETİMİNDE KULLANIMI**

Burak ŞEN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nurdan SARAÇ

İkinci (Ortak) Danışman: Prof.Dr. Aysel UĞUR

Mayıs 2014, 101 sayfa

Bu çalışmada; daha önce yapılan çalışmalarda yüksek lipaz aktivitesi gösterdiği belirlenen *Streptomyces lienomycini* 350-2 suşu tarafından üretilen ekstraselüler lipaz tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu suşun lipaz aktivitesi 11.782 U/ml olarak tespit edilmiştir.

S. lienomycini 350-2'den elde edilen lipaz (LipS350-2), amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kısmi saflaştırma sonucu LipS350-2'nin spesifik aktivitesi 1466.8 (U/mg), saflaştırma verimi % 1.17 ve saflaştırma katsayısı 1.56 olarak hesaplanmıştır. Saf lipazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 52 kDa olarak tespit edilmiştir.

LipS350-2'nin optimum sıcaklık ve pH'sı sırasıyla 40 °C ve pH 9.0 olarak belirlenmiştir. Lipaz pH 7.0-11.0 ve 4-40 °C aralığındaki sıcaklıklarda iyi bir stabilite göstermiştir. Çeşitli alkol konsantrasyonlarının ve inkübasyon sürelerinin lipaz aktivitesine ve stabilitesine olan etkileri de belirlenmiştir. Enzim atık yağlara ve *p*- nitrofenil palmitat'a (*p*-NPP) karşı yüksek spesifikite göstermiştir. LipS350-2'nin depolanma stabilitesi incelenmiş ve enzimin 4 C'de 30. güne kadar depolanabildiği belirlenmiştir.

LipS350-2'nin geniş pH ve sıcaklık aralıklarında yüksek stabilite göstermesi, alkollerin varlığında aktivitesini koruması bu enzimin biyodizel üretiminde kullanılabilir bir biyokatalizör olabileceğini göstermiştir. Lipazın biyodizel reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve biyodizel üretimi kalitatif olarak TLC (ince tabaka kromatografisi) ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces lienomycini*, Lipaz, Kısmi saflaştırma, Karakterizasyon, Biyodizel

ABSTRACT

***Streptomyces lienomycini* 350-2 OF THE LIPASE ENZYME PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND USE OF BIODIESEL PRODUCTION**

Burak ŞEN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Nurdan SARAÇ

Co-supervisor: Prof. Dr. Aysel UĞUR

May 2014, 101 pages

In this study, the extracellular lipase produced by *Streptomyces lienomycini* 350-2, which showed high lipase activity in previous studies was identified and characterized. The lipase activity of this isolate was determined as 11.782 U/ml.

The lipase produced by *S.lienomycini* 350-2 (LipS350-2) was partially purified by ammonium sulphate precipitation, dialysis and gel filtration chromatography. After the partial purification, the specific activity of LipS350-2, purification yield and purification factor were calculated as 1466.8 (U/mg), 1.17% and 1.56, respectively. The molecular weight of the purified lipase was determined to be approximately 52 kDa by SDS-PAGE.

The optimal temperature and pH for LipS350-2 determined as 40°C and pH 9.0, respectively. The lipase exhibited good stability between pH 7.0 and 11.0 and was stable between temperatures 4 and 40°C. The effects of concentrations and incubation period of various alcohols were also determined. The enzyme has high specificity toward waste oil and para- nitrophenyl palmitate (*p*-NPP). LipS350-2's storage stability was examined, and the enzyme can be stored at +4°C for 30 days.

Since LipS350-2 displays high stability in a wide pH and temperature ranges, and maintains its activity in the presence of various alcohols, it can be effectively used as a biocatalyst in production of biodiesel. The biodiesel reaction of lipase was created and the biodiesel production was determined qualitatively with TLC.

Keywords: *Streptomyces lienomycini*, Lipase, Partial purification, Characterization, Biodiesel

ÖNSÖZ

Öncelikle banabu tez çalışmasını yapma olanağı veren, gerekli alt yapıyı sağlayan, fikir ve önerileri ile beni aydınlatan ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, ilk yüksek lisans öğrencisi olma onuruna eriştiğim saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Nurdan SARAÇ'a çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu kolaylıklar, bilimsel bir çalışmanın ve düşünmenin temellerini öğrettiği için teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin ana hatlarının belirlenmesinde değerli katkılarını esirgemeyen, tez çalışmasını yapma olanağı veren, çalışmalarım boyunca her türlü konuda yardım ve desteklerini gördüğüm, bilgisi, disiplini ve hoşgörüsüyle bana her zaman destek olan, akademik çalışmalarındaki başarısı ve anlayışıyla her zaman örnek alacağım ikinci danışmanım Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim üyesi saygıdeğer hocam Prof. Dr. Aysel UĞUR' a da şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilgilerinden yararlandığım, laboratuvar çalışmalarında bana her konuda katkıda bulunan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Özgür Ceylan ve Yrd. Doç Dr. Rukiye Boran'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmam sırasında bana her konuda yardımcı olan değerli arkadaşlarım Burcu BAŞGEDİK, Filiz ÖZCAN ve mikrobiyoloji laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde her türlü maddi manevi desteğini benden esirgemeyen ve her zaman destekçim olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.2. Enerji.....	2
1.3. Biyodizel.....	4
1.4. Transesterifikasyon	7
1.5. Lipazlar	11
1.5.1. Genel Özellikleri	11
1.5.2. Endüstriyel Lipazlar	12
1.5.3. Lipazların kullanım alanları	14
1.5.4. Lipaz Analiz Yöntemleri	17
1.5.4.1. Kalitatif analiz.....	17
1.5.4.2. Kantitatif analiz.....	18
1.5.5. Lipaz kaynakları	20
1.6. <i>Streptomyces</i>	23
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
2.1. Kantitatif lipaz aktivitesinin ölçülmesi	26
2.1.1. <i>p</i> -nitrofenol standart eğrisinin hazırlanması	27
2.2. <i>Streptomyces lienomycini</i> 350-2 suşu Tarafından Üretilen Lipazın (LipS350-2) Kısmi Olarak Saflaştırılması.....	27
2.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	28
2.2.2. Diyaliz	28
2.2.3. Ultrafiltrasyon	29
2.2.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi	29

2.3. Protein Miktarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi	29
2.3.1. BSA standart eğrisinin hazırlanması	30
2.4. Protein ve enzim ile ilgili hesaplamalar.....	30
2.5. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi	31
2.6. Saflaştırılan Enzimin Karakterizasyonu	32
2.6.1. Optimum pH'nın belirlenmesi	32
2.6.1.1. Spektrofotometrik metot ile optimum pH'nın belirlenmesi.....	33
2.6.1.2. Titrimetrik metot ile optimum pH'nın belirlenmesi.....	33
2.6.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	34
2.6.3. pH stabilitesinin belirlenmesi	34
2.6.4. Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi.....	35
2.6.5. Çeşitli alkollerin lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi.....	35
2.6.6. Alkollerin çeşitli konsantrasyonlarının lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi	35
2.6.7. Alkollerin çeşitli ön inkübasyon sürelerinde lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi	36
2.6.8. Lipazın substrat spesifitesinin belirlenmesi.....	36
2.6.9. Lipazın depolanma stabilitesinin belirlenmesi	36
2.7. Lipazın Biyodizel Üretim Kapasitesinin ve Endüstriyel Uygulanabilirliğinin Belirlenmesi.....	37
2.7.1. Reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analizi.....	37
3. BULGULAR VE İRDELEME.....	38
3.1. LipS350-2'nin Kısmi Olarak Saflaştırılması.....	38
3.2. Moleküler ağırlığının belirlenmesi	41
3.3. LipS350-2'nin Karakterizasyonu	43
3.3.1. Optimum pH.....	43
3.3.2. Optimum sıcaklık	47
3.3.3. pH stabilitesi.....	48
3.3.4. Sıcaklık stabilitesi.....	49
3.3.5. Çeşitli alkollerin LipS350-2'nin aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi ..	50
3.3.6. Alkollerin çeşitli konsantrasyonlarının lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi	51
3.3.7. Alkollerin çeşitli ön inkübasyon sürelerinde lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi	52

3.3.8. LipS350-2'nin substrat spesifitesinin belirlenmesi.....	53
3.3.9. LipS350-2'nin depolanma stabilitesinin belirlenmesi	54
3.4. LipS350-2'nin biyodizel üretim kapasitesinin ve endüstriyel uygulanabilirliğinin belirlenmesi, reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analizi.....	55
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	61
EKLER.....	94
Ek A. Çalışmada kullanılan besiyerleri	94
Ek B. Çalışmada kullanılan boya ve solüsyonlar	95
Ek C. Çalışmada kullanılan tamponlar	96
Ek D. SDS- PAGE'de kullanılan jel, tampon ve solüsyonlar	98
ÖZGEÇMİŞ.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. LipS350-2'nin saflaştırma basamaklarındaki toplam protein, toplam aktivite, spesifik aktivite, verim ve saflaştırma katsayısı	40
Çizelge 3.2. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde spektrofotometrik olarak belirlenen aktivitesi	44
Çizelge 3.3. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde titrasyon ile belirlenen aktivitesi	44
Çizelge 3.4. LipS350-2'nin çeşitli sıcaklık değerlerindeki aktivitesi	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Jel filtrasyon kromatografisinde elde edilen fraksiyonların UV ₂₈₀ nm'deki absorpsiyon değerleri	38
Şekil 3.2. BSA standart eğrisi	39
Şekil 3.3. SDS-PAGE'de elde edilen protein bantları	42
Şekil 3.4. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde spektrofotometrik olarak belirlenen kalan aktivite değerleri	45
Şekil 3.5. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde titrasyon ile belirlenen kalan aktivite değerleri	45
Şekil 3.6. LipS350-2'nin çeşitli sıcaklık değerlerinde belirlenen kalan aktivite değerleri	47
Şekil 3.7. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde 1 ve 2 saat sonundaki kalan aktivite değerleri	49
Şekil 3.8. LipS350-2'nin çeşitli sıcaklık değerlerinde 1 ve 2 saat sonundaki kalan aktivite değerleri	50
Şekil 3.9. LipS350-2'nin çeşitli alkollerin varlığında kalan aktivite değerleri.....	51
Şekil 3.10. LipS350-2'nin alkollerin çeşitli konsantrasyonlarının varlığında kalan aktivite değerleri.....	52
Şekil 3.11. LipS350-2'nin alkollerin çeşitli ön inkübasyon sürelerinde kalan aktivite değerleri.....	53
Şekil 3.12. LipS350-2'nin substrat spesifitesi	54
Şekil 3.13. LipS350-2'nin +4 °C'deki depolama stabilitesi.....	54
Şekil 3.14. Reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analizi	56
Şekil 3.15. Reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analizi	57

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Semboller

%	Yüzde
>	Büyük
≥	Büyük eşit
≤	Küçük eşit
+	Artı
±	Artı eksi
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
n	Normal
p	Para
°C	Santigrad derece

Kısaltmalar

BSA	Bovin Serum Albumini
cm	Santimetre
dk	Dakika
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
g	Gram
h	Saat
kDa	Kilodalton
μm	Mikrometre

μL	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
mM	Milimolar
M	Molar
mm	Milimetre
nm	Nanometre
OD	Optik dansitometre
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
<i>p</i> -NPP	Para- nitrofenil palmitat
<i>p</i> -NPB	Para- nitrofenil bütirat
<i>p</i> -NPO	Para- nitrofenil oleat
rpm	Dakikadaki dönme hızı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi
sn	Saniye
sp.	Species (Tür)
U	Ünite
UV	Ultra viyole
v	Hacim
vd	Ve diğerleri

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Petrol rezervlerinin azalması, klasik yakıtların oluşturduğu çevresel sorunlar, sera gazı emisyonlarındaki artış ve artan enerji ihtiyacı nedeniyle alternatif enerji kaynağı arayışları günümüzde önem kazanmaktadır. Alternatif enerji kaynaklarındaki ana hedef düşük maliyetli, sera gazı emisyonunda artışa neden olmayacak, ekolojik ve çevre dostu alternatiflerin değerlendirilebilmesidir. Bu alternatif kaynaklardan biyodizel son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Çünkü yenilenebilir bir enerji kaynağı olan biyodizel hem enerji ihtiyacını önemli oranda karşılayabilecek hem de fosil yakıtların neden olduğu ekolojik sorunları büyük oranda azaltacak potansiyele sahiptir.

Ülke ekonomisi için son derece önemli bir yere sahip olan ve enerji ihtiyacında yurt dışı bağımlılığı azaltacak olan biyodizel üretiminin artırılması ve kimyasal transesterifikasyon ile biyodizel üretiminden kaynaklı çevresel sorunların önlenmesi büyük oranda enzimatik transesterifikasyonla mümkün olacaktır. Bu enzimatik transesterifikasyonda atık yağların kullanımı ile hem atık yağların neden olduğu çevresel sorunlar büyük oranda giderilecek hem de ülke ekonomisine önemli miktarda kazanç sağlanacaktır.

Biyodizel üretiminde yenilebilir, yenilmeyen ve atık yağların hammadde olarak kullanımı söz konusudur. Türkiye'de kanola, ayçiçek, soya, aspir gibi yağlı tohum bitkilerinin enerji amaçlı tarımı mümkündür (Sarııldız, 2005). Ayrıca Türkiye'de her yıl 300 bin ton atık yağ oluşmaktadır ve büyük bir atık yağ potansiyeline sahip olan ülkemizde bu yağlar da biyodizel üretiminde değerlendirilebilir (Aybastır, 2010).

Bunun yanı sıra kullanılmamış yağlardan daha ucuz olan kullanılmış yağlar biyodizel maliyetini de önemli oranda azaltmaktadır (Fjerbaek vd., 2009).

Atık yağlar biyodizel üretiminde kullanıldığında yılda 480 milyon TL kazanç sağlanması mümkündür (Alptekin ve Çanakçı, 2006). Çevresel açıdan sorun oluşturan bu atık yağların biyodizel üretiminde etkili ve verimli bir şekilde kullanımı hem ekonomik hem de ekolojik açıdan önemli avantajlar sağlayacaktır.

Biyodizel üretiminde kullanılacak lipazın, reaksiyon şartlarında stabil olması ve düşük maliyet ile elde edilebilmesi gerekmektedir. Transesterifikasyonda yaygın olarak kullanılan metanol ve etanol varlığında stabilitesini koruyabilen, termofilik reaksiyon koşullarında aktivite ve stabilite gösteren, geniş substrat spesifitesine sahip, depolanmaya elverişli, üretim maliyeti düşük bir lipazın kullanımı biyodizel endüstrisi için son derece önemli bir avantaj sağlayacaktır.

Bu nedenle bu tez çalışmasında yüksek lipaz aktivitesi gösteren *Streptomyces lienomycini* 350-2 suşu tarafından üretilen lipazın kısmi olarak saflaştırılması ve biyodizel üretimi açısından gerekli parametrelerinin karakterizasyonu hedeflenmiştir. LipS350-2 geniş pH ve sıcaklık değerlerinde aktivite ve stabilite gösteren, alkollerin varlığında aktivitesini önemli oranda koruyan, özellikle atık yağlar üzerinde spesifik aktivite gösteren ve depolanmaya elverişli bir enzim olarak atık yağların enzimatik transesterifikasyonla biyodizele dönüştürülmesi açısından kullanılabilir bir enzimdir. Bu enzimin atık yağlardan biyodizel üretiminde kullanılması ile hem önemli bir çevresel kirletici olan atık yağlar etkili ve verimli bir şekilde kullanılacak hem de elde edilecek biyodizelin sanayide kullanımı ile ülke ekonomisine katkı sağlanacaktır.

1.2. Enerji

Enerji insan varlığı için en temel gereksinimlerden olup sosyal ve ekonomik kalkınma için önemli bir girdidir ve günlük yaşamın her anında ve yapılan her etkinlikte insanın en önemli gereksinimidir. Tarım, sanayi ve evsel faaliyetlerin genelleşmesi sonucunda enerji talebi özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli ölçüde artmış ve bu durum sera gazı emisyonu seviyesinde ve yakıt fiyatlarında hızlı bir artışa neden olarak yenilenebilir enerji kaynaklarından daha etkin yararlanma

çabalarının arkasındaki temel itici gücü oluşturmuştur (Refaat, 2008; Banos vd., 2011).

Enerji sağlamada fosil yakıtlar ve yenilenebilir kaynaklar olmak üzere başlıca iki kaynak vardır (Geller, 2002). Son iki yüzyıllık süreçte fosil kökenli yakıtlar, üretim teknolojilerinde meydana gelen gelişmelerle ve ucuz olmaları nedeniyle yaygın bir kullanım alanı bulmuş, bunun sonucunda da yenilenebilir teknolojiler karşısında üstün bir konuma gelmişlerdir. Dünya çapında tüketilen enerjinin % 86'sı ve ulaşım sektöründe gerekli enerjinin % 100'ü yenilenemeyen fosil yakıtlardan sağlanmaktadır. Dünya fosil yakıt rezervlerinin % 78'ini katı yakıt, % 12'sini petrol ve % 10'unu doğal gaz oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri ve diğer sanayileşmiş ülkelerde enerjinin neredeyse tamamı kömür, doğal gaz gibi fosil yakıtlardan elde edilmektedir (Geller, 2002).

Ham petrol fiyatlarındaki hızlı artış, petrol ürünlerinin yüksek maliyeti, azalan fosil yakıtlar, enerji arzında (enerji ihtiyacının karşılanmasında) artan belirsizlik ve fosil yakıtların kullanımına bağlı olarak çevresel kaygılar nedeniyle alternatif, temiz ve yenilenebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesi gerekmektedir (Crookes vd., 1997; Han vd., 2009; Chhetri vd., 2008; Atadashi vd., 2011).

Petrol ve kömür egemenliğine dayanan enerji çağı, 1973 yılında ortaya çıkan petrol krizi sonucunda bir güvensizlik ortamı oluşturmuştur. Bu güvensizlik ortamı neticesinde tüm dünyada yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarına karşı yoğun bir ilgi ortaya çıkmıştır (Büyükmihci, 2003).

Sürdürülebilir ekonomik büyüme için ekonomik sınırlar kapsamında uygun teknolojilerle yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanıma sunulması gerekmektedir (Yamık ve İçingür, 2008; Atadashi vd., 2011). Benzinle yer değiştirebilecek en önemli alternatif enerji kaynaklarından bazıları; su enerjisi, güneş enerjisi, rüzgar enerjisi, biyokütle enerjisi, hidrojen enerjisi ve hidrolik enerji, jeotermal enerji, dalga enerjisinden oluşan su gücü enerjileri ile füzyon enerjisi ve biyo-yakıtlar olarak sınıflandırılabilir. (Crookes vd., 1997; Doğan, 2001, Phan ve Phan, 2008; Atadashi vd., 2011). Yenilebilir enerji kaynakları, miktarlarının sınırlı olmaması, çevreye daha az zarar vermeleri ve güvenli olmaları nedeniyle fosil yakıtlardan daha avantajlıdır (Mutlu, 2002).

Sürdürülebilir gelecek ve sağlıklı bir kalkınma için dünya çapında biyodizelin önemi alternatif yakıt olarak gün geçtikçe artmaktadır (Azcan, 2007). Petrol rezervlerindeki azalmanın kritik boyuta ulaşması, çalışmaları ister istemez yeni enerji kaynaklarına çevirmiştir. Bu çerçevede içerisinde alkil esterlere yani biyodizele olan ilgi de artmış ve bu konuda birçok yeni araştırma yapılmıştır. Biyodizelin petrol kökenli yakıtların yerine kullanılabilirliği, biyolojik yollarla biyodizel üretimi çalışmalarının artmasına neden olmuştur. (Shimada vd., 1999; Samukawa vd. 2000; Matsumoto vd. 2001; Ban vd. 2001).

Alternatif enerji kaynaklarının üretimi ve kullanımının giderek yaygınlık kazanması, çevre bilincinin artması ve alternatif enerjiye yönelik verilen desteklerden dünya genelinde birçok ülke etkilenmiştir. Bu bağlamda dünyada giderek yaygınlaşan biyoyakıt enerjisinden ülkemiz de olumlu etkilenmiş ve biyoyakıtlarla ilgili çalışmalar başta biyodizel olmak üzere, 2000'li yılların başında hız kazanmıştır. Dünyada, biyodizelle ve diğer biyoyakıtlarla ilgili yapılan çalışmaların ülkemizi de etkilemesi sonucunda, üniversitelerde ve araştırma kurumlarında biyodizelle ilgili çalışmalar artmış ve artan enerji fiyatlarına bağlı olarak sıkıntı yaşanan ülkemizde biyodizel konusu hızlı bir gelişme seyrine girmiştir. Bu gelişmelere paralel olarak, 2001 yılında Sanayi ve Ticaret Bakanlığı tarafından "Biyodizel Çalışma Grubu" nun kurulması biyodizelle ilgili çalışmaların yasal sürecinin de başlamasıyla devam etmiştir (http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/cf0ed8641cfcbbf_ek.pdf). Biyodizel Türkiye'de mevcut olanaklarla uygulamaya alınabilecek en önemli alternatif yakıt seçeneklerinden biridir.

1.3. Biyodizel

Biyodizel, toksik olmayan, biyobozulur ve yenilenebilir bir enerji kaynağıdır. Yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyodizel biyolojik olarak parçalanabilmesi ve petrol dizelinden daha düşük emisyonlara sahip olması nedeniyle tercih edilmektedir (Hossain, 2009). Ayrıca, eksoz emisyonunun ve CO, CO₂, SO_x gibi sera etkisi yaratan gazların düşük oranda olması diğer avantajları arasındadır.

Biyodizelin, bitkisel veya hayvansal yağlardan elde edilen yağ asidi metil veya etil esterleri olarak tanımlanmakta, dizel motorlarında ve ısıtma sisteminde yakıt olarak kullanılmaktadır (Eggersdorfer vd., 1992; Chowdury ve Fouky, 1993; Fukuda vd., 2001; Yang vd., 2009; Yoo vd., 2011).

Biyodizel, petrol yakıtları ile benzer özelliklerde olması nedeniyle dizel motorlarda doğrudan kullanımı söz konusu olduğu gibi petrol yakıtları ile karıştırılarak da kullanılabilir (Fukuda vd., 2001; Yang vd., 2009).

Biyodizelin klasik fosil temelli dizele alternatif olmasının sebepleri; fosil yakıt kaynaklarındaki azalmaya bağlı olarak, enerjide dışa bağımlılığı azaltmak, taşıma sektöründe yenilenebilir biyoyakıtların kullanımı ile küresel ısınmanın azaltılmasına yardımcı olmak ve partiküllerin, kükürt, karbon monoksit ve hidrokarbonların emisyonunu azaltmaktır (Mittelbach vd., 1983; Sheehan vd., 1998; Meher vd., 2006; Demirbas, 2007). Biyodizel kükürt veya aromatik kimyasalları içermediği için klasik dizel motorlarında biyodizel kullanımı, yanmamış hidrokarbonlarda, karbon monoksitte ve partikül maddelerde önemli azalmalar sağlamaktadır. Bir Amerikan enerji departmanı tarafından yürütülen çalışmada, petrol dizeline kıyasla biyodizel üretiminin ve kullanımının CO₂ emisyonunda % 78.5'lük bir azalma sağladığı görülmüştür.

(http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/Benefits%20of%20Biodiesel.Pdf).

Biyodizelin avantajlarından biri de yağlayıcı özelliğidir. Özellikle düşük sülfürlü dizel yakıtlarında azalan yağlayıcılığı biyodizel kullanarak arttırmak mümkündür (Boehman, 2005). Biyodizelin yağlayıcılığını etkileyen ana bileşikler yağ asidi metil esterleri ve monogliseritlerdir (Hu vd., 2005). Biyodizelin yapısında sülfür bulunmamaktadır. Yakıtların içinde bulunan sülfür yanma sonucu havadaki nem ile birleşerek asit yağmurlarına sebep olmaktadır. Biyodizelin içinde sülfür bulunmaması çevreci bir yakıt olduğunu göstermektedir. Ayrıca kozmetik ve ilaç sanayi gibi birçok alanda kullanılan gliserin, biyodizel üretilirken yan ürün olarak elde edilir (Boehman, 2005).

Biyodizel doğada % 99.6 oranında biyolojik olarak parçalanabilmektedir. Biyodizeli oluşturan C16-C18 metil esterleri kolayca ve hızla parçalanarak bozunmaktadır.

Suya bırakıldığında 28 günde biyodizelin % 95'i bozulurken, dizel yakıtının sadece % 40'ı bozulabilmektedir (Karaosmanoğlu, 2002).

Bitkisel yağların dizel motorlarda yakıt olarak kullanımı, Rudolph Diesel'in 1900'lü yıllarda ürettiği ilk dizel motorlarda kullanımına dayanmaktadır (Prakash, 1998). Bitkisel yağların viskoziteleri, dizel yakıtlara göre 11-17 kat daha fazla olup, biyodizel üretimindeki temel hedef bu viskozite değerlerini aşağılara çekebilmektir (Demirbaş, 2005).

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de kara taşımacılığının önemli bölümünde ve deniz taşımacılığında dizel motorlu taşıtlar kullanılmaktadır. Ayrıca endüstride jeneratör yakıtı olarak da önemli miktarda dizel yakıt kullanılmaktadır. Petrol tüketimimizin ancak %15'i yerli üretimle sağlanabilmektedir. Petrol ürünleri tüketimi içinde ise, en büyük pay % 34 değeri ile dizel yakıtı aittir. Biyodizel kullanımının artması ile petrol tüketiminde ve egzoz gazı kirliliğinde önemli miktarda azalma gerçekleşecektir (Aybastier, 2010). Biyodizel formundaki yenilenebilir enerji çevre dostu etikleri nedeniyle dikkat çekmektedir.

Biyodizel üretiminde başlıca kaygı ekonomik açıdan uygulanabilirliğidir. Hammadde (üretimi ve işlenmesi), katalizör, biyodizel üretimi (enerji, sarf malzeme, iş gücü), nakliye (hammadde ve son ürün), yerel ve ulusal vergiler biyodizel üretiminde maliyeti oluşturur. Günümüze kadar birçok biyodizel üretim tesisi başlıca hammadde olarak rafine bitkisel yağı kullanmış olup bu durum bütün proses maliyetinin neredeyse %80'ini oluşturmaktadır. Bu nedenle biyodizel fiyatını etkileyen en önemli değişkenin hammaddeler olduğu yadsınamaz. Bu sınırlamanın üstesinden gelebilmek için üreticiler atık yağ gibi düşük maliyetli hammadde üzerinde odaklanmışlardır (Lam vd., 2010a).

Bitkisel ve hayvansal yağlar biyodizel üretiminde kullanılan yegane trigliserit kaynaklarıdır (Zawadzki vd., 2007). Bu yağların monoalkil esterleri olan biyodizel yenilebilir, yenilmeyen ve atık yağlardan sentezlenebilmektedir (Annapurna vd., 2009). Günümüzdeki endüstriyel biyodizel üretimi palmye yağı, kolza yağı, soya yağı, hint yağı ve *Jatropha curcas* gibi bitkisel yağlarla, gres ve hayvansal yağlar gibi çeşitli atık ürünlere dayanmaktadır.

Biyodizel üretiminde temel sorun maliyet olup bu maliyetin %84'ü hammaddeden kaynaklanmaktadır. Atık yağ biyodizel üretiminde ucuz hammadde olmasının yanı sıra çevre mevzuatlarına göre bertaraf edilme maliyetini ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle atık yağlar biyodizel üretiminde bitkisel yağa alternatif olmaktadır (Zheng vd., 2006;Bautista vd., 2009).

Biyodizel üretiminde atık yağlar; yenebilen, yenemeyen ve hayvansal yağ gibi pahalı diğer hammaddelere oranla daha iyi seçim olup sonucunda daha düşük maliyetli biyodizel elde edilir. Kızartma yağları yiyecek veya yarı-mamul hazırlanması sırasında fazla miktarlarda üretilmekte olup hazır yemek zincirleri, büyük restoranlar, yemek hizmeti veren şirketler gibi endüstriyel ölçeklerde her yıl önemli miktarda oluşmaktadır. Son zamanlarda bu yağların çok küçük bir oranı sabun üretiminde kullanılmaktadır. Ancak kızartma yağından elde edilen sabun kalitesiz olduğu için kızartma yağının büyük bir kısmı çöpe gitmektedir. Böylece ekolojik ve ekonomik sorunlar oluşturmaktadır. Bu nedenle atık yağdan biyodizel eldesi etkili ve ekonomik bir yöntemdir (Charpe ve Rathod, 2011).

1.4. Transesterifikasyon

Ülke ekonomisi için son derece önemli bir yere sahip olan biyodizel üretimi için yağların transesterifikasyonunda kimyasal ve enzimatik katalizörler kullanılmaktadır. Kimyasal katalizör olarak genellikle alkali ve asit katalizörler tercih edilmektedir.

Günümüzde endüstriyel olarak en sık kullanılan yöntem alkali transesterifikasyondur (Kaieda vd., 1999; Srivastata ve Prasad, 2000; Zhang vd., 2003; Meher vd., 2006). Biyodizel üretiminde kullanılan bu klasik metot homojen katalizör olarak NaOH ve KOH kullanımını içermektedir (Ma ve Hanna, 1999). Ancak biyodizel üretiminde alkali katalizörlerin kullanımında bazı kısıtlamalar söz konusudur (Jin ve Bierma, 2010). Serbest yağ asidi içeriği ve nem, transesterifikasyon reaksiyonunu etkileyen en önemli parametrelerdendir. Serbest yağ asidi atık yağlarda genellikle % 2-7, hayvansal yağlarda ise % 5-30 oranında değişmektedir (Knothe vd., 2005).

Genellikle alkali katalizör varlığında gerçekleşen transesterifikasyon tepkimelerinde serbest yağ asidi içeriğinin % 1'den az olması, reaksiyona giren reaktantların ise susuz olması istenmektedir.

Yağın asit içeriği ne kadar fazla olursa dönüşümü de o kadar az olmaktadır. Serbest yağ asidi (SYA) bazik katalizör ile reaksiyona girerek sabun oluşturmaktadır. Reaksiyonda kullanılan bazik katalizörün bir kısmı nötralize olduğu için reaksiyonun ilerlemesi yavaşlamaktadır (Abdullah vd., 2007; Yılmaz, 2008).

Serbest yağ asidi içeriği fazla olan hammaddelerin alkali transesterifikasyonda kullanımını mümkün değildir (Canakci ve Van Gerpen, 2001) ve kullanılacak hammadde mutlaka sudan arındırılmış olmalıdır (Jin ve Bierma, 2010). Bu iki kısıtlama atık yağların, içeriğindeki serbest yağ asitlerinin ve suyun giderimi için ön muameleye tabi tutulmadan kullanılamayacağını göstermektedir (Jin ve Bierma, 2010). Yüksek oranda su ve serbest yağ asidi içeriği olan ham materyallerde, serbest yağ asitlerinin esterifikasyonu için bir asidik katalizör ile ön muamele yapılması gerekmektedir (Freedman vd., 1984; Kaieda vd., 1999; Zhang vd., 2003). Sabun oluşumu istenmeyen yan reaksiyon olup katalizörün kısmen harcanarak biyodizel veriminin azalmasına, emülsiyon oluşumu nedeniyle ayırma ve saflaştırma basamaklarının zorlaşmasına neden olmaktadır. Sülfürik, hidroklorik veya sülfonik asit gibi asit katalizörlerin kullanımı yemeklik atık yağın metanolizi ile sabun oluşumunu önlemektedir. Bu ön muamele, reaksiyon esnasında sabun oluşumunu azaltmada, geniş ölçekteki uygulamalarda gliserol ile biyodizelin birbirinden ayrılmasında ve bununla birlikte katalizör ve alkali atıksuyun gideriminde gereklidir (Mittelbach, 1990; Meher vd., 2006). Ancak kullanılan asit katalizörler de çevresel açıdan önemli sorunlar oluşturmaktadır.

Bir geleneksel biyodizel tesisindeki atıksu miktarı, her ton biyodizel için yaklaşık olarak 0.2 tondur (Suehara vd., 2005). Ortaya çıkan bu atıksuyun arıtımı ve suyun yeniden kullanımına olan nihai ihtiyaç, hem enerji tüketimi hem de çevresel açıdan güç problemlerdir. Bu nedenle atık yağların kimyasal katalizörlerle biyodizele dönüştürülmesi komplike ve pahalı bir yöntemdir (Fjerbaek vd., 2009).

Hem alkali hem de asit katalizörlü metotlarda, geri kazanılması gereken çok miktarda metanolün kullanılması, üründen giderilmesi gereken tuz ve ortandan ayrılması zor olan düşük kalitedeki bir yan ürün olan gliserin oluşumu gibi durumlar nedeniyle kimyasal transesterifikasyon yerine son dönemlerde enzimatik transesterifikasyon tercih edilmektedir (Van Gerpen vd., 2004).

Alkali katalizörlerin aksine, enzimler sabun oluşturmamakta, ileri yıkama basamaklarına ihtiyaç duyulmadan hem serbest yağ asitlerini hem de triaçilgliserolleri esterleştirebilmektedirler (Fjerbaek vd., 2009). Bu nedenle enzimatik metotlarla biyodizel üretimi çok geniş bir potansiyel olarak nitelendirilmekte ve günümüzde muazzam bir ilgi görmektedir (Wang vd., 2005).

Enzimler; ham ve geri dönüşümlü materyalin kalitesindeki çeşitliliklere daha uyumlu olmaları, daha az enerji kullanımı gerektirmeleri, atıksu miktarının önemli ölçüde azalmasını sağlayan daha az sayıda basamak ile biyodizel oluşturabilmeleri, ürün ayrıştırılmasını arttırarak daha yüksek kalitede gliserol verimi sağlayabilmeleri nedeniyle, alkali veya asit katalizörlere kıyasla potansiyel olarak daha kullanışlıdır (Kaieda vd., 1999; Fukuda vd., 2001; Meher vd., 2006; Kumari vd., 2007). Enzimle gerçekleştirilen transesterifikasyonun diğer avantajları ise enzimin yeniden kullanılabilirliği ve diğer tekniklerden farklı olarak, operasyon sıcaklığının daha düşük (40 °C) olmasıdır (Meng vd., 2011).

Enzim kullanımının olumsuzlukları ise; düşük reaksiyon oranı (Zhang vd., 2003), daha uzun reaksiyon süresi (Du vd., 2008; Cavalcanti-Oliveira vd., 2011), yüksek maliyet (Ma ve Hanna, 1999; Shimada vd., 1999; Fukuda vd., 2001; Jaeger ve Eggert, 2002; Meher vd., 2006; Du vd., 2008; Cavalcanti-Oliveira vd., 2011), lipazın kataliz aktivitesinin alkol ile inhibe olması (Meng vd., 2011) ve aktivite kaybıdır (Fjerbaek vd., 2009). Özellikle enzimlerin yüksek fiyatları sıklıkla transesterifikasyon reaksiyonlarında en büyük engel olarak ortaya çıkmaktadır (Modi vd., 2007). Örneğin; Novozyme 435 lipazının 1 kg'ının yaklaşık 1000 \$ olması, lipaz katalizli dönüşümün ticarileşmesinin önünü kesmektedir. Bu nedenle geniş aktiviteye sahip stabil lipazların maliyet etkili endüstriyel üretimi birincil olarak önem arz etmektedir (Toscano vd., 2011).

Lipolitik enzimler açığliserollerini hidrolize edebilen karboksilesterazlar olarak tanımlanmaktadır (Jaeger vd., 1994; Jaeger vd., 1999; Beisson vd., 2000). Bu enzimler, uzun zincirli açığliserollerini (≥ 10) hidrolize eden lipazları ve kısa zincirli açığliserollerini (≤ 10) hidrolize eden esterazları içermektedir. Lipazlar kısa zincirli açığliserollerini de hidrolize edebilmektedirler (Verger, 1997).

Triaçığliserollerden biyodizel üretiminde kullanılan lipazlar tri, di ve monogliseritleri yağ asidi alkil esterlerine dönüştürebilmelidir. Aynı zamanda serbest yağ asitlerinin esterifikasyonunu da katalize edebilmelidir. Ayrıca yüksek yağ asidi alkil esteri verimine, düşük ürün inhibisyonuna, düşük reaksiyon süresine, enzimin yeniden kullanılabilirliğine, sıcaklık ve alkol dayanıklılığına sahip olmalı ve enzim kolay olarak üretilmelidir (Fjerbaek vd., 2009).

Lipaz katalizli transesterifikasyonda yan ürünlerden gliserin karmaşık bir ayırım süreci olmadan kolayca ayrılırken, atık yağların içerdiği serbest yağ asitleri alkil esterlere tamamen dönüştürülebilmektedir (Meher vd., 2006).

Organik solvent toleranslı lipazlar biyoteknolojik uygulamalarda, özellikle biyopolimerik materyallerin ve biyodizelin üretiminde, saf kimyasalların sentezinde gerekmektedir (Sulong vd., 2006). Transesterifikasyon reaksiyonlarının genellikle organik solvent varlığında gerçekleşmesi istenmektedir. Çünkü organik solventler homojen reaksiyon karışımının sağlanabilmesinde, reaksiyon karışımının viskozitesinin azaltılarak difüzyon oranının artırılmasında ve enzimin stabilizasyonunda yardımcı olabilmektedirler (Fjerbaek vd., 2009). Ancak son zamanlarda, organik solventlerin toksik ve yanıcı olmalarından dolayı solventsiz sistemlerdeki enzimatik alkoliz tercih edilmektedir (Pinyaphong vd., 2011). Çünkü solventli sistemlerde reaktör hacimleri daha büyük düzenlenmelidir ve solventin ortamdaki uzaklaştırılması ekstra yatırım ve ücret gerektirmektedir (Fjerbaek vd., 2009). Organik solvent varlığında gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonlarının bu olumsuzlukları nedeniyle son dönemlerde enzimatik transesterifikasyon uygulamalarında solventsiz sistemler tercih edilmektedir. Katalitik proses organik solvent içermediğinde, daha düşük maliyet, daha yüksek substrat konsantrasyonu ve daha büyük üretim hacmi kazanılabilmektedir (Meng vd., 2011).

1.5. Lipazlar

1.5.1. Genel Özellikleri

Lipazlar (trیاçil gliserol hidrolazlar EC 3.1.1.3.) trigliseritlerin gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. 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; Reetz,2002). Lipazlar, ilk olarak 1834'te Eberle ve 1856'da Bernard tarafından pankreastan tanımlanmıştır.

Amilaz ve proteazla birlikte lipaz, bilinen ilk üç ana sindirim enzimini oluşturmaktadır (Hou, 2002). Serin hidrolazları sınıfı içinde yer alırlar ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Ghanem ve Aboul-Enein, 2004; Gupta vd., 2004, Singh ve Banerjee, 2007; Singh vd., 2008; Saxena vd., 2008).

Lipazlar orta ve uzun zincirli trigliseritlerin yağ asitleri ve gliserole hidrolizini katalizlemekte ve bunlar esterazlardan, sulu solüsyonlardaki suda çözünmeyen lipidik substratlar tarafından oluşturulan ara yüzeydeki keskin aktivasyonları ile ayırt edilmektedirler (Jaeger ve Eggert, 2002). Lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar, enzim içeren sulu faz ile, reaksiyonun birinci basamağında enzimin penetre olduğu ara yüzeyde yer alan yağlı fazın oluşturduğu ara yüzeyde meydana gelmektedirler (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998; Jaeger ve Eggert, 2002; Gupta vd., 2004).

Lipazlar, hem sulu hem de susuz solvent sistemlerinde aktivite göstermektedirler (Wang vd., 2001; Gupta vd., 2004; Nie vd., 2006) ve bu özelliklerinden dolayı endüstride ve tıpta önemli bir yere sahiptirler (Bjokling vd., 1991). Bu durum, her şeyden önce, onların geniş bir substrat spektrumunu kullanabilme, aşırı sıcaklıklara, pH ve organik çözücülere ve enantiyoselektiviteye karşı kararlılık gösterebilme yetenekleri sayesinde olmaktadır (Sharma vd., 2001). Suyun çok az olması veya hiç bulunmaması halinde esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları tercih edilmektedir

(Jennings ve Akoh, 2000; Sellappan ve Akoh, 2001; Adlercreutz vd., 2002; Gupta vd., 2004). Suyun fazla olduğu durumlarda ise sadece hidroliz reaksiyonu gerçekleşmektedir (Klibanov, 1997).

Lipazlar organik solvent varlığında doğal ve yapay bileşiklerin kullanımıyla hidroliz, sentez ve açıl değişimi yapabilme ve bunun gibi farklı reaksiyonları katalizleyebilme özellikleri ile çok yönlü biyokatalizörlerdir (Bornscheuer, 2002; Gupta vd., 2004). Bu enzimlerkimyasal seçicilik (kemoselektivite), bölgesel seçicilik (regiyoselektivite), izomer seçicilik (stereoselektivite, enantiyoselektivite) (Villeneuve vd., 2000; Sharma vd., 2001; Jaeger ve Eggert, 2002; Snellman vd., 2002) özelliklerine sahiptirler. Organik solventlerin varlığında (Hasan vd., 2005), geniş pH ve sıcaklıklarda aktif ve stabildirler (Gupta vd., 2004). Lipazlar ılımlı koşullar altında aktivite göstermekte, düşük enerji ve az ekipman gerektirmekte ve daha az kirliliğe yol açmaktadırlar (Gunstone, 1999; Pandey vd., 1999; Jaeger ve Eggert, 2002).

Lipazların sahip oldukları bu özellikler, lipazları organik kimyada kullanılan en yaygın biyokatalizör grubu yapmaktadır (Sugihara vd., 1992). Geniş yelpazedeki önemlerinden dolayı lipaz üzerindeki çalışmalar yoğun olarak artmaktadır (Alberghina vd., 1991; Bornscheuer, 2000).

1.5.2. Endüstriyel Lipazlar

Endüstriyel enzim piyasasında büyük bir paya sahip olan hidrolitik enzimler içersinde yer alan lipazlar, anahtar enzimler olarak ortaya çıkmakta ve endüstriyel uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadır (Jeager vd., 1994, 1999; Pandey vd., 1999). Lipazlar, karbohidrolazlar ve proteazlar kadar büyük bir piyasa payına sahip olmamasına rağmen bu grup enzimlere talep artmaktadır. Bu hızlı büyümenin devam edeceği ve talebin 2015'te %71'lik artış göstereceği umulmaktadır (Heler, 2006). Son on yılda lipazlar, özellikle organik sentez alanında, proteazlar ve amilazlara oranla büyük bir önem kazanmıştır.

Ticari lipazların başlıca gereksinimi; bu enzimlerin reaksiyon dönüşüm oranını, substrat çözünürlüğünü arttıran ve mikroorganizmalarla kontamine olmasını engelleyen termal stabiliteleri ve yüksek sıcaklıklardaki performanslarıdır (Haki ve Rakshit, 2003).

Genel olarak yüksek sıcaklıklar alkoliz veya transesterifikasyon oranını yükseltmektedir. Son zamanlarda, endüstride termostabil enzimlere karşı büyük bir gereksinim vardır ve çeşitli kaynaklardan çok sayıda termostabil lipaz saflaştırılmış ve yaygın olarak karakterize edilmiştir (Namboodiri ve Chattopadhaya, 2000; Li ve Zhang, 2005; Kanwar vd., 2006; Ebrahimpour vd., 2011; Abdel-Fattah vd., 2012; Masomian vd., 2013; Kumar vd., 2013). Ancak endüstriyel alanda kullanılabilirliği yüksek termostabil lipaz arayışları devam etmektedir.

Dünya enzim piyasasında birçok firma lipaz üretimi yapmaktadır. 20'den fazla mikrobiyal lipaz ticari olarak büyük miktarlarda üretilmektedir (Shu vd., 2010). Ticari uygulamalarda kullanılan en önemli lipazlar *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* ve *Pseudomonas* cinslerinden elde edilmektedir. (Beisson vd., 2000). Ticari olarak üretilen maya kaynaklı lipazlar ise *Candida rugosa* ve *Candida antarctica*'dan elde edilmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998).

1994 yılında Novo Nordisk firması tarafından üretilen ilk rekombinant lipaz Lipolase *Aspergillus oryzae*'den elde edilmiştir (Marul, 2007). Genencor firması tarafından üretilen *Pseudomonas alcaligenes* ve *P. mendocinal* lipazları deterjan katkısı olarak kullanılmaktadır, Boehringer Mannheim, Novo Nordisk firmaları tarafından üretilen *Candida antarctica* ve *Thermomyces lanuginosus* lipazları deterjan katkısı ve organik sentezde kullanılmaktadır. Amano, Fluka, Boehringer Mannheim firmaları tarafından üretilen *Burkholderia cepacia* lipazı organik sentezde kullanılmaktadır (Basım, 2009). Novozyme firması tarafından üretilen lipazlardan Novozyme 435, Novozyme 735 ve Novozyme CALB-L *C. antarctica*'dan elde edilmekte ve biyokatalizör olarak kullanılmaktadır (<http://www.novozymes.com/en/MainStructure/Productfinder/ProductFinder.htm>).

1.5.3. Lipazların kullanım alanları

Lipazlar gıda endüstrisinde diğer enzimler ile birlikte ekmek, peynir ve diğer gıdaların raf ömrünü, reolojik özelliklerini veya aroma üretimini iyileştirmek için *in situ* olarak kullanılmaktadırlar.

Bu enzimler tat üretimi ve besinsel değeri arttırmak için interesterifikasyon veya transesterifikasyonla elde edilen açılgliserollerin kompozisyon ve yapısının modifikasyonu için de kullanılmaktadırlar (Reetz, 2002).

Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Peynir yapımında kullanılan renninin kütlesinde, proteolitik enzimlerin yanında lipazlar da bulunmaktadır. Lipazlar modifiye edilmiş tereyağı ürünleri, margarinler, fırıncılık ürünleri ve bitkisel ürünlerde aroma geliştirici olarak kullanılmaktadırlar (Kıran vd., 2006). Bunlarla birlikte bu enzimler modifiye tatlı yiyeceklerde tat ve aroma bileşenleri olarak kısa zincirli yağ asidi esterlerinin ve alkollerin sentezlenmesinde kullanılmaktadırlar (Macedo vd., 2003). Süt endüstrisinde süt yağının hidrolizinde, peynirlerde tat zenginleştirmede, peynir olgunlaşmasını hızlandırmada, peynirli ürünlerin üretiminde, tereyağı ve kremanın lipolizisinde de bu enzimlerden yararlanılmaktadır (Sharma vd., 2001; Bora ve Kalita, 2007).

Lipazlar gıda üretiminden sonra en yaygın olarak kimya endüstrisinde, kimyasal olarak üretimi zor olan ürünlerde ya da klasik kimyasal prosesle işlenmesi zor, pahalı olan ürünlerin üretilmesinde sık olarak kullanılmaktadırlar.

Bu enzimlerden Farmasötik ve agrokimyasal endüstride antibiyotiklerin, pestisitlerin vb. sentezinde veya modifikasyonunda faydalanılmaktadır (Gunstone, 1999; Pandey vd., 1999; Reetz, 2002).

Lipazların substrata göre farklı etki göstermelerinden dolayı lipazlar organik kimya endüstrisinde katalizör olarak kullanılmakta ve büyük avantaj sağlamaktadırlar (Ghosh vd., 1996).

Lipazlar proteazlar ile birlikte çamaşır deterjanlarının bileşiminde yağ lekelerinin uzaklaştırılması amacıyla da kullanılmaktadırlar (Jaeger vd., 1994; Pandey vd., 1999; Saxena vd., 1999; Rohit vd., 2001; Sharma vd., 2001; Rathi vd., 2001; Kanwar vd.,

2002; Sharma vd., 2002; Houde vd., 2004; Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007). Deterjan endüstrisinde lipazların diğer kullanım uygulamaları; bulaşıklarda beyazlatma (Nakamura ve Nasu, 1990), sıvı deri temizleyicileri (Kobayashi, 1989), kuru temizleme solventleri (Abo, 1990), tuvaletlerin ve çıkış borularının yüzeyindeki organik atıkların parçalanması (Moriguchi vd., 1990) dır.

Aynı zamanda lipazlar sabunlar, şampuanlar gibi günlük ürünler için sürfaktanların sentezinde de kullanılmaktadırlar (Schmid ve Verger, 1998; Pandey vd., 1999).

Kağıt yapımında üretilen kağıt hamurundan ziftin uzaklaştırılmasında, kağıdın geri dönüşümünde lipit lekelerinin uzaklaştırılmasında ve yapışkan maddelerin oluşumunu engellemek için de tercih edilmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998; Pandey vd., 1999; Gutiérrez vd., 2001; Sharma vd., 2001).

Deri endüstrisinde, derinin bünyesindeki yağın temizlenmesiyle tabakalama ve boyama işlemlerine hazır hale getirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. (Kıran vd., 2006).

Kişisel bakım ürünlerinin üretiminde (Jaeger vd., 1994; Rohit vd., 2001; Sharma vd., 2001; Houde vd., 2004), oleokimyasal endüstride katı ve sıvı yağların modifikasyonunda (Jesus vd., 1995; Faber, 1997; Reetz ve Jaeger, 1998; Sharma vd., 2001; Yadav ve Trivedi, 2003; Gupta vd., 2004) yaygın olarak kullanılmaktadır.

Gıda ve yağ işlemleri sırasında açığa çıkan atığın giderilmesinde, lipitlerle kirlenmiş suların ve çamurların arıtılmasında, yağla kontamine olmuş toprakların yağdan arıtılmasında, atık su uygulamalarında yüzeydeki oksijen geçişine imkan vermek için, atık suyun yüzeyinde bulunan yağ tabakasının sürekli olarak uzaklaştırılmasında lipazlar aktif olarak kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999; Hou, 2002).

Lipazlar, organik sentezlerde kimyasal olarak üretilmeyen ya da prosesle işlenmesi zor veya pahalı olan spesifik ürünlerin elde edilmesinde (Gitlesen vd., 1997; Reetz ve Jaeger, 1998; Sharma vd., 2001; Gupta vd., 2004) yaygın bir kullanıma sahiptirler.

Lipazların doğal enantiyoselektivite ve regiyoselektivitesinden, kiral ilaçların çözümlenmesi, yağ modifikasyonu, bitkisel yağ yerine kullanılan maddelerin,

biyolojik yakıtların, kişisel bakım ürünlerinin ve aroma artırıcıların sentezi için yararlanılmaktadır. Bu nedenle lipazlar, günümüzde, organik kimyacıların, eczacıların, biyofizikçilerin, biyokimya ve proses mühendislerinin, biyoteknologların, mikrobiyolog ve biyokimyacıların enzim seçimidir (Saxena vd., 2008).

Literatürde ayçiçeğinden, soya yağından, karışık bitkisel yağlardan, gres ve donyağından ve çeşitli lokal yağlardan lipaz katalizli biyodizel üretimi çalışmaları mevcuttur. (Mittelbach, 1990; Kaieda vd., 1999; Watanabe vd., 2000; Nelson vd., 1996; Abigor vd., 2000; Kamini ve Lefuji, 2001).

Biyodizel üretiminde kullanılabilir ideal bir lipaz bazı karakteristik özelliklere sahip olmalıdır. Tüm mono-, di-, tri açıl gliseritler ile serbest yağ asitlerini yüksek verimle kullanabilmeli, ürün inhibisyonu bulunmamalı, düşük miktarlarda yüksek aktivite göstermeli, susuz ortamlarda aktif olmalı, düşük reaksiyon süresine sahip olmalı, düşük sıcaklıkta aktivite ve alkollerde stabilite göstermelidir (Bajaj vd., 2010, Yoo vd., 2011).

Enzimatik biyodizel üretimi, hücre içi veya hücre dışı lipaz kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Hücre içi lipaz kullanılan reaksiyonlarda lipaz enzimi sentezi yapabilen mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Hücre dışı lipaz kullanılan reaksiyonlarda doğrudan mikroorganizmalardan elde edilen lipaz enziminden faydaniılmaktadır (Marchetti vd., 2007).

Yapılan çalışmalarda biyodizel üretimi için kullanılacak lipazın saflaştırılması ve karakterizasyonu hedefdir.

Bu konuda birçok çalışmanın olmasına rağmen yeni ve biyodizel üretimi için yüksek özelliklere sahip enzim arayışları devam etmektedir.

Enzim arayışlarında mikroorganizmaların özellikle bakterilerin önemli bir potansiyeli bulunmaktadır.

Antibiyotiklerin yanı sıra ürettikleri birçok sekonder metabolit ekonomik ve endüstriyel açıdan antibiyotikler kadar değerli olup biyoteknolojik alanda ve ilaç sanayiinde kullanılmaktadır (Peczynska-Czoch ve Mordarski, 1988).

1.5.4. Lipaz Analiz Yöntemleri

Enzim aktivitesinin tayini aslında enzimatik reaksiyonun hızının tayinidir. Genellikle reaksiyon hızı için kullanılabilen yöntemler aktivite tayini için de kullanılabilir (Telefoncu, 1986; 1993).

Aktivite tayininde ya kaybolan substrat miktarı veya meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülmektedir.

Lipazlar, trigliseritleri hidrolize ederler ve serbest yağ asitleri ve gliserolün meydana gelmesine sebep olurlar. O nedenle, bu enzimler için analiz metotları genel olarak serbest yağ asitlerinin oluşumunun analiz edilmesi kriterleri etrafında gelişmiştir (Jensen vd., 1983).

Serbest yağ asitlerinin oluşumunu araştırmak amacıyla kalitatif olarak jel difüzyon analizleri ve kantitatif olarak titrimetrik (Makhzoum vd., 1996; Beisson vd., 2000; Deeth ve Touch, 2000; Litthauer vd., 2002; Ruiz vd., 2004; Kiran vd., 2007), spektrofotometrik (Kurooka vd., 1977; Rollof vd., 1984; Stuer vd., 1986; Lee ve Rhee, 1993; Lin vd., 1996; Beisson vd., 2000; Litthauer vd., 2002; Kiran vd., 2007), floresans, kromatografik prosedürler (TLC/GC/HPLC) (Kashyap vd., 1980; Ruiz ve Roudriguez-Fernandez, 1982; Veerraghavan, 1990; Maurich vd., 1991) ve immünolojik metotlar kullanılmaktadır (Jaeger vd., 1994; Beisson vd., 2000; Gupta vd., 2003; Ruiz vd., 2004).

1.5.4.1. Kalitatif analiz

Lipaz üreten suşlar Tribütirin agarda klasik olarak incelenmektedir. Dört karbonlu (Lee vd., 2001) sentetik bir trigliserit olan (Gao vd., 2000) tribütirin'in hidrolizi ile oluşan zon ya esteraz ya da lipazı aktivitesini göstermektedir (Lee ve Rhee, 1993; Makhzoum vd., 1996; Kulkarni ve Gadre, 1999; Braun vd., 2001; Cardenas vd., 2001; Kanwar vd., 2002; Litthauer vd., 2002; Meghwanshi vd., 2006; Ertuğrul vd., 2007; Kiran vd., 2007; Côté ve Shareck, 2008). Alternatif olarak katı besiyerlerine indikatör eklenerek renkli zon oluşumu gözlenmektedir (Gupta vd., 2003). Nile blue sülfat (Lawrence vd., 1967; Converse vd., 1981; Christen ve Marshall, 1984; Samad

vd., 1989), victoria blue (Lawrence vd., 1967; Converse vd., 1981; Christen ve Marshall, 1984; Gao vd., 2000; Dogan ve Boor, 2003; Alatossava ve Alatossava, 2006), metil red, fenol red (Lawrence vd., 1967; Converse vd., 1981; Christen ve Marshall, 1984; Samad vd., 1989) indikatör olarak kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir (Gupta vd., 2003).

Bütün bunlara ek olarak floresan Rhodamine B boyasını kullanılarak 350 nm dalga boyunda UV ışığı altında turuncu floresan olarak lipolizis zonlarını gözlemlemek te mümkündür (Kouker ve Jaeger, 1987). Rhodamine, serbest yağ asitleriyle floresan bir kompleks oluşturur. Böylece lipaz üreten koloniler görünür UV ışığı altında floresan haleler oluşturur (Kouker ve Jaeger, 1987; Lee ve Rhee, 1993; Winteler vd., 1996; Kumura vd., 1998; Haba vd., 2000; Hube vd., 2000; Kim vd., 2001; Martinez ve Soberón- Chávez, 2001; Litthauer vd., 2002; Gupta vd., 2003; Kojima ve Shimizu, 2003). Ayrıca zeytinyağı (Hube vd., 2000; Martinez ve Soberón- Chávez, 2001) ve Tween 80 içeren besiyerinde şeffaf zonun gözlenmesi (Sierra, 1957; Emanuilova vd., 1993; Smibert ve Krieg, 1994;) ile de lipaz aktivitesinin belirlenmesi mümkündür.

1.5.4.2. Kantitatif analiz

Titrimetrik analiz; hidrolaz sınıfı enzimlerin katalizlediği reaksiyonların büyük çoğunluğunda H^+ açığa çıkmaktadır. Olusan H^+ konsantrasyonu reaksiyon hızı ile orantılıdır (Telefoncu, 1986). Özellikle substratları suda iyi çözünmeyen hidrolazların (lipazlar gibi) aktivite tayinleri için titrasyon çok uygun bir yöntemdir (Telefoncu, 1986; Ghosh vd., 1996). Burada substrat olarak uluslararası kabul gören triolein veya buna ucuz bir alternatif olan zeytinyağı kullanılır (Jensen vd., 1983). Bundan başka tribütirin, triasetin (triasetilgliserol) ve tripropiyonin (tripropiyonilgliserol) de enzimatik aktivite tayininde substrat olarak kullanılabilir (Lanz ve Williams, 1973; Staubmann vd., 1999). Bununla birlikte lipazlar, kısa zincirli triaçilgliserollerle karşılaştırıldığında, triolein gibi uzun zincirli triaçilgliseroller daha yüksek oranda hidrolize etmektedir (Gupta vd., 2003).

Lipolitik reaksiyonda, asidin serbest bırakılması titrimetrik olarak analiz edilebilir. Nicel yöntemde reaksiyon yönünde pH ölçülür (Jaeger vd., 1994). Titrimetrik metotlar zamana bağlı olarak serbest yağ asitlerinin serbest bırakılmasıyla sodyum veya potasyum hidroksitin nötralizasyon oranını ölçmektedirler (Naka ve Nakamura, 1992).

Spektrofotometrik analiz; Lipaz aktivitesinin araştırılmasında genel olarak yağ asidi zinciri çeşitli uzunluğa sahip *p*-nitrofenil esterleri substrat olarak kullanılmakta

(Huggins ve Lapidés, 1947) ve meydana gelen *p*-nitrofenol 410 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Winkler vd., 1979; Pencreac'h ve Baratti, 1996; Gilham ve Lehner, 2005). Asetat ve bütirat gibi kısa zincirli esterler suda çözünmekte ve bu nedenle bu hidroliz lipaz aktivitesinden ziyade esteraz aktivitesinin ölçülmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte laurat, palmitat veya oleat gibi uzun zincirli lipaz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılmaktadır (Gilham ve Lehner, 2005). Bu analiz için sınırlayıcı olan, *p*-nitrofenol'ün absorbanansı asidik pH'da önemli ölçüde etkilendiği için, asidik pH'larda bu esterlerle ölçüm yapılamamasıdır (Kademi vd., 2000). Asidik ortamda lipolizisin ölçülmesi güçtür, çünkü düşük pH değerlerinde yağ asitleri tam olarak iyonize olamamakta ve bu durum yanlış ölçümlerle sonuçlanmaktadır (Gilham ve Lehner, 2005).

Enzimatik aktivite sadece nötral veya alkali pH değerlerinde bu prosedürle tespit edilebilmektedir (Kademi vd., 2000; Gilham ve Lehner, 2005). Ancak yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde de (Gutarra vd., 2009) *p*- nitrofenil esterleri stabil olmadığı için (Lin vd., 1996; Sharma vd., 2002; Salameh ve Wiegel, 2007) bu ekstrem koşullarda da *p*-nitrofenil esterlerinin kullanıldığı spektrofotometrik ölçüm ile sağlıklı sonuçlar alınmamaktadır (Lin vd., 1996; Lotrakul ve Dharmstithi, 1997; Sharma vd., 2002; Salameh ve Wiegel, 2007).

Diğer kolorimetrik lipaz ölçümü naftil esterlerinin hidrolizine dayanmaktadır (Gilham ve Lehner, 2005). Renksiz β -naftil karpilat (oktanat) esterinin hidrolizi ile meydana gelen renkli β -naftol'un 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle yapılmaktadır (Degrassi vd., 1999; Gandolfi vd., 2000). α -naftil asetat, naftil propiyonat ve naftil bütirat gibi α -naftil esterleri bu analizde substrat olarak kullanılmaktadır (Gupta vd., 2003).

Renk üretiminin ölçülmesinden başka spektrofotometrik analizler yağ asitlerinin, kalsiyum veya bakırla çöktürülmesiyle de yapılabilir. Substrat olarak Tween kullanılır. Absorbans artışı 500 nm'de ölçülür (Von Tigerstrom ve Stelmaschuk, 1989). Bu türbidimetrik metot, basit bir yöntem olup Tween 20 ile yapılan titrimetrik analizden 36 kat (Bier, 1955; Stotz, 1955; Guilbault, 1976), *p*-nitrofenil palmitatla yapılan spektrofotometrik analizden (Winkler vd., 1979) en az dört kat daha hassastır (Gilham ve Lehner, 2005).

Florimetrik analiz; Floresan bileşikler de lipaz analizi için kullanılmaktadırlar. Metot, lipaz aktivitesinden dolayı serbest bırakılan floresan yağ asitlerinin ölçümünü gerektirir. Triaçilgliserollerin alkil grubunun, pirenil gibi floresan grupla yer değiştirmesiyle analiz gerçekleşir. Floresan özellikle serbest pirenil grupları oluşturmaktadır. Triaçilgliseroller hidrolize olduktan sonra piren grupları 400 nm'de yer değiştirir (Thuren vd., 1987; Negre-Salvayre vd., 1991). Floresan olmayan 4-metilumbelliferil oleat, lipaz etkisinden sonra floresan 4-metilumbelliferon'u serbest bırakır (Jacks ve Kircher, 1967). Hızlı bir yöntem olmasına rağmen substratların pahalı olması kullanımını sınırlandırmaktadır (Gupta vd., 2003).

Kromatografik prosedür; lipit substratında, enzim katalizinin hidrolizini takiben serbest bırakılan yağ asitlerinin direkt olarak tespit edilmesi için kesin bir metottur. Spesifik kolonlar vasıtasıyla ürün veya arta kalan substratın miktar tayini ve analizi yapılır. Rutin analizler için zaman alıcı olmasına rağmen substrat spesifikliğinin tayininde kullanımı tavsiye edilmektedir (Gupta vd., 2003).

İmmünolojik metotlar ve ELISA; yüksek hassasiyet ve lipazların tespiti ve miktar analizleri için spesifik sistemlerdir. Bu immünolojik metotlar aktif veya aktif olmayan lipazların tespit edilmesinde kullanılırlar (Grenner vd., 1982; Dati ve Grenner, 1984).

1.5.5. Lipaz kaynakları

Lipaz enzimi bitkisel kaynaklardan, hayvansal dokulardan ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Telefoncu, 1986; Cortez vd., 1999; Gao vd., 2000; Kojima ve

Shimizu, 2003; Sangeetha vd., 2011; Zheng vd., 2011). Bu enzim memelilerde ve mikroorganizmalarda iyi bir şekilde karakterize edilmiştir (Wooley ve Petersen, 1994). Buna karşın bitkisel lipazlarla ilgili çok az şey bilinmektedir (Beisson vd., 2000). Hayvansal lipazlar, doku ve vücut sıvılarının çoğunda; bitkisel lipazlar, bitkilerde katman doku, kabuk ve köklerde bulunurlar. Lipazlar, pek çok mikroorganizma türlerinin bünyelerinde doğal olarak bulunur. Hayvansal, bakteriyel ve fungal enzimlerin yaygın kullanımlarına karşın bitkisel enzimler ticari olarak kullanılmamaktadır (Savitha vd., 2007).

Bitkisel lipazlar triaçilgliserollerini hayvansal ve mikrobiyal lipazlara kıyasla daha düşük oranlarda (genellikle $< 0.5 \mu\text{mol/mg/dk}$) hidrolizlemektedirler (Bhardwaj vd., 2001). Lipazların hayvansal ve bitkisel dokulardan elde edilmeleri güçtür. Çünkü bu tür dokularda, hücrenin ya da hücre duvarının parçalanması zordur ve bunun için ekstra hücre parçalayıcılar gerekmektedir. Bu işlemler sırasında enzimin yapısı zarar görebilmektedir (Taipa vd., 1992).

Mikrobiyal lipaz üreten mikroorganizmalar, endüstriyel atıklar, sebze yağı üreten fabrikalar, mandıralar, yağ ile kontamine olmuş topraklar başta olmakla birlikte değişik topraklarda (Gao vd., 2000; Haba vd., 2000; Jinwal vd., 2003; Soliman vd., 2007; Mohan vd., 2008; Dandavate vd., 2009; Saraç, 2011; Zheng vd., 2011), endüstriyel atıklarda (Sztajer vd., 1988; Kim vd., 2004;), yağ içeren tohumlar (Sztajer vd., 1988; Kose vd., 2002), çürümüş gıdalar, kompost yığınları (Wang vd., 1995; Sztajer vd., 1988; Tsai vd., 2007; Zheng vd., 2011), kömür madenleri (Gowland vd., 1987; Wang vd., 1995), gübre yığınları (Zheng vd., 2011) gibi ortamlardan izole edilebilmektedir.

Lipazların doğada yaygın olarak bulunmalarına karşın (Schmid ve Veger, 1998; Klivanov, 2001, Guncheva ve Zhiryakova, 2011) sadece mikrobiyal lipazlar ticari olarak önemlidirler (Saxena vd., 2003b). Ticari olarak kullanılan mikrobiyal lipazlar bakterilerden ve mantarlardan elde edilmektedirler (Babu ve Rao, 2007; Sangeetha vd., 2011). Mikroorganizmalar, ekstraselüler lipaz üretebilmektedirler. Mikrobiyal lipazların elde edilmesi bu nedenle kolay (Rathi vd., 2001) ve ekonomik (Sharma vd., 2001) olmaktadır. Katalitik aktivitelerinin daha yüksek olması, yüksek verimle elde edilebilmeleri, istenmeyen yan ürünler oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz

olmaları mikrobiyal lipazların daha çok tercih edilmesinin başlıca nedenleridir (Wiseman, 1987; Guncheva ve Zhiryakova, 2011).

Ayrıca mikrobiyal lipazların küçük hacimlerde çok fazla miktarlarda üretilebilmeleri, ılımlı şartlar altında iş görmeleri, düşük enerji ve az ekipman gereksinimi sayesinde maliyetin düşük olması, daha az kirliliğe neden olması (Jaeger ve Eggert, 2002), ayrıca lipazların çeşitli hidrolitik ve sentetik birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleri (Sharma vd., 2001), mevsimsel dalgalanmasının olmaması ve ucuz ortamlarda kolay gelişebilmeleri (Wiseman, 1995; Guncheva ve Zhiryakova, 2011) endüstriyel anlamda mikrobiyal lipazları avantajlı hale getirmektedir (Gill ve Parish, 1997).

Bu avantajlı özelliklerinden dolayı mikrobiyal lipazlarla ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve üstün özelliklere sahip yeni lipaz arayışları devam etmektedir (Lopez vd., 2000; Jaeger ve Eggert, 2002; Kanwar ve Goswami, 2002; Litthauer vd., 2002; Sharma vd., 2002; Rahman vd., 2005; Karadzic vd., 2006; Ertuğrul vd., 2007; Heravivd., 2008; Mahanta vd., 2008; Mohan vd., 2008; Dandavate vd., 2009; Dutta ve Ray, 2009; Ahmed vd., 2010; Cadirci ve Yasa, 2010; Nguyen vd., 2010; Zheng vd., 2011, Guncheva ve Zhiryakova, 2011; Yoshida vd., 2011; Ce'sar, 2012; Zhao vd., 2013).

Fungal lipazlarla ilgili çalışmalar 1950'lerin başında başlamış, Lawrence ve daha sonra Brockerhoff ve Jensen tarafından bu enzimler kapsamlı olarak incelenmiştir. Bundan sonra birçok araştırmacı termal stabilite, substrat özgülüğü ve organik solventlerdeki aktivitelerinden dolayı lipaz kaynağı olarak fungusları göstermişlerdir (Ghosh vd., 1996). Ticari lipazların belli başlı üreticileri; *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. carneus*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus niveus* ve *Rhizopus oryzae*'dir (Ghosh vd., 1996).

Lipazlar, bakteriler tarafından da üretilmektedir. 1901'de *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* ve *Bacillus fluorescens*'de lipazların varlığı tespit edilmiştir. Lipaz üreten bakterilerden bazıları *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens* olarak bildirilmiştir (Jaeger vd., 1994). Ayrıca, *Streptomyces* sp. (Sztajer vd., 1988; Sommer vd., 1997), *Acinetobacter* sp.

(Chen vd., 1999), *Aeromonas* sp. (Anguita vd., 1993; Lotrakul ve Dharmsthiti, 1997), *Staphylococcus* sp. (Jürgens vd., 1981; Van Oort vd., 1989), *Lactobacillus* sp. (El-Sawah vd., 1995; Meyers vd., 1996), *Micrococcus* sp. (Hou, 1994), *Burkholderia* sp. (Yeo vd., 1998; El Khattabi vd., 2000) ve *Chromobacterium* sp. (Taipa vd., 1994) cinsleri de lipaz üretimi için kullanılmaktadır.

1.6. Streptomyces

Streptomistler aside dirençsiz, Gram pozitif *Actinomycetes* grubu organizmaları içermektedir (Lee vd., 2005).

Streptomyces cinsi, filamentöz toprak bakterilerini barındırmakta olup; hayat döngüleri boyunca çeşitli morfolojik değişimlere uğrarlar. Streptomisetler hücre farklılaşmaları, sekonder metabolit oluşumu, sporulasyon ve programlanmamış hücre ölüm mekanizmasını içeren belirli bir hayat döngüsüne sahiptirler. Sıcaklık, pH, CO₂, O₂ ve nem gibi çevresel faktörler topraktaki *Streptomyces*'lerin hayat döngüsünü etkilemektedir (Vionis vd., 1998). Bu cinsteki bakteriler; batık (ince, dallanmış, çoğunlukla renksiz ve bölmesiz, organizmanın geliştiği ortama gömülü; birincil, substrat ya da vejetatif miselyum olarak da bilinen yapı) ve havasal (yün biçiminde, hafif dallanmış hiflerden meydana gelmiş, çoğunlukla oluşturulan pigmentlerden dolayı renkli, çok sayıda kıvrımlı spor zincirlerini barındıran, batık misellerden daha kalın) olmak üzere iki tip miselyum oluştururlar. Normalde spor formunda olmalarına rağmen, yeterli nem ve besini bulduklarında sporları çimlenerek batık miselyumu oluşturur. Bu morfolojik değişimlerle beraber pigmentler, antibiyotikler ve diğer sekonder metabolitlerin de üretimi başlar (Williams vd., 1989; Wendisch ve Kutzner, 1991).

Streptomisetlerin oluşturdukları koloniler dairemsi, likensi veya derimsi şekillerde olabilmektedir. Koloniler başlangıçta düz, fakat daha sonra bu düz koloniler pamuksu, yünsü veya kadifemsi görünümlere dönüşmektedir (Korn-Wendisch ve Kutzner, 1992).

Streptomisetler çeşitli renklerde pigment üretebilmektedirler. Oluşturdukları pigmentler vejetatif ve havasal miselyumların rengini vermektedir.

Bu pigmentlerin yanında ürettikleri çözünebilir pigmentler ortamın rengini değiştirmektedirler (Goodfellow ve Simpson, 1987).

Çoğu streptomiset türü 25-35 °C arası sıcaklıklarda ve pH 6.5-8 aralığında optimum gelişme göstermektedirler. Buna karşılık 45-55 °C'de gelişebilen termofilik ve +4 °C'de gelişebilen psikrofilik türlere de rastlanılmaktadır (Williams vd., 1989; Kim vd., 1998). Çoğu toprak streptomiseti nötral veya zayıf alkali koşullarda optimum gelişme gösterirken, asidik ya da alkali pH'da gelişen türlerde mevcuttur (Kim vd., 1998; Basilio vd., 2003). Zorunlu asidofilikler ise sınırlı pH değerlerinde ve özellikle pH 4.5'da optimum gelişme göstermektedirler (Kim vd., 2004).

Streptomisetler, enerji ve gelişim için tek karbon kaynağı olarak çeşitli organik bileşikleri kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Organik bileşikleri hücre içi enzimlerini kullanarak ayrıştırır ve kullanırlar (Kim vd., 1998; Falconer, 1988).

Streptomisetler doğada geniş bir yayılışa sahiptirler. Karasal ortamda yaygın olarak bulunanların yanında tatlı su ve deniz gibi sucul ekosistemlerde de yayılış gösterebilmektedirler (Goodfellow ve Simpson, 1987).

Streptomisetler eşsiz bir metabolik çeşitliliğe sahiptirler ve yeni bileşenleri üretim potansiyeli yüksektir. Bu maddeler arasında başta antibiyotikler (streptomisin, kloramfenikol, klortetrasiklin, neomisin, oksitetrasiklin, eritromisin, tetrasiklin, novobiyosin, sikloserin, vankomisin, kanamisin) olmak üzere anti-tirozinaz, antioksidan, anti-tümör ajanlar, enzim inhibitörleri, glukoz izomerazlar, transglutaminazlar gibi endüstriyel açıdan önemli enzimler ve hemolitik bileşikler sayılabilir (Anzai vd., 2008).

Günümüzde antibiyotik kullanımının artmasıyla orantılı olarak, antibiyotik üreten streptomisetler ile çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu cinse ait üyelerin antibiyotik üretmeleri; organizmaların sporulasyon evresindeyken, ortamdaki besinin azalması durumunda, diğer mikroorganizmaların gelişimini engelleyip besin sınırlamasını ortadan kaldırmak istemelerinden kaynaklanmaktadır

(Madigan ve Martingo, 2009). Ürettikleri sekonder metabolitler, doğal ortamlarında hayatta kalmalarını sağlayan fonksiyonlarda önemli role sahiptir (Şahin, 2005).

Bakteriyel lipaz arayışlarında, sahip oldukları geniş çeşitlilikte enzim üretimi ve zengin sekonder metabolitleri ile Streptomisetler önemli bir potansiyeldir. Bu grubun sekonder metabolit üretimleri detaylı olarak araştırılmış olmasına rağmen *Streptomyces*'lerle ilgili yapılmış lipaz çalışmaları ise son derece sınırlıdır ve yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürdeki *Streptomyces* lipazları ile yapılmış çalışmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Mander vd'nin (2012) yaptığı çalışmada; organik solvent tolerantlı *Streptomyces* sp. CS133 lipazının organik ortamda bitkisel yağların enzimatik transesterifikasyonu araştırılmıştır. *Streptomyces* sp. CS133'ün lipazı saflaştırılmış, moleküler ağırlığı belirlenmiş ve karakterize edilmiştir.

Aly vd'nin (2012) yaptığı çalışmada yağ ile kontamine edilmiş topraktan izole edilmiş ve genetik olarak geliştirilmiş *Streptomyces* LP10 lipazı saflaştırılmış ve moleküler ağırlığı belirlenmiştir. Large vd'nin (1999) yaptığı çalışmada *Streptomyces lividans*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces coelicolor* ve *Streptomyces rimosus* lipazları araştırılmıştır. Sommer vd'nin (1997) yaptığı çalışmada *Streptomyces cinnamomeus*'un ekstraselüler lipazının genetik ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Başka bir çalışmada *Streptomyces rimosus* ekstraselüler lipazının yapısal kütle spektrometresi ile disülfid köprüsü desen atama metoduyla karakterizasyonu yapılmıştır. Lipazın ayrıca moleküler ağırlığı da belirlenmiştir (Vujaklija vd., 2003).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kantitatif lipaz aktivitesinin ölçülmesi

Kantitatif lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, ISP2 agar (Bkz. Ek-1) besiyerinde 30 °C'de 7 gün geliştirilen kültürden, 250 ml'lik erlenlerdeki 100 ml ISP2 broth (Bkz. Ek-1) besiyerine inokülasyon yapılmış ve 30 °C'de 130 rpm'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda izolat Whatman 42 filtre kağıdından süzölmüş ve elde edilen süpernatant lipaz aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır.

İzolatların kantitatif lipaz aktiviteleri, Kordel vd. (1991) tarafından modifiye edilen Winkler vd. (1979)'nin metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kordel tarafından modifiye edilen metoda göre hazırlanan substrat solüsyonu bulanık olduğu için spektrofotometrik ölçümde düzgün sonuçlar alınamamıştır. *p*-NPP'nin enzimatik hidrolizinden dolayı açığa çıkan yağ asitlerinin dağılmasına neden olan Triton X-100'ün miktarı arttırılarak bulanıklık sorunu ortadan kaldırılmıştır. (Gupta vd., 2002; Saraç, 2011).

Kantitatif lipaz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan bu metot, *p*-NPP'nin enzimatik hidrolizi sonucunda meydana gelen *p*-nitrofenol'ün OD₄₁₀ nm'de kolorimetrik olarak tespit edilmesine dayanmaktadır. Spektrofotometrik yöntemle lipaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan substrat solüsyonunun hazırlanmasında A ve B solüsyonları olarak iki ayrı solüsyon (Bkz Ek-2) hazırlanmıştır. Bu iki solüsyon karıştırılarak substrat solüsyonu elde edilmiştir. Bu substrat solüsyonu maksimum 2 saat stabil kalabilmektedir (Mahadik vd., 2002; Savitha vd., 2007). Bu nedenle substrat solüsyonu her kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır.

Substrat solüsyonundan 9 ml alınarak 1 ml süpernatant ile karıştırılmış ve çalkalamalı inkübatörde 30 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda OD₄₁₀ nm'de absorbans değeri ölçülerek lipaz aktivitesi hesaplanmıştır. Kör olarak substrat solüsyonu kullanılmıştır. Bir lipaz ünitesi (U), dakikada 1 µmol *p*-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.1.1. *p*-nitrofenol standart eğrisinin hazırlanması

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde standart olarak *p*-nitrofenol (Sigma, N7660) kullanılmıştır. Standart eğriyi çizmek için pH 8.0 tamponu kullanılarak derişimi bilinen (10 mM) *p*-nitrofenol'den seri standart çözeltiler hazırlanmış ve OD₄₁₀ nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen regresyon grafiğinden elde edilen eğim değeri aşağıdaki formüle yerleştirilerek enzim aktivitesi U/ml olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml/dk)} = \frac{\Delta C \times V_T \times SF}{T_{(dk)} \times V_E}$$

ΔC : Absorbans/eğim

V_E : Enzim hacmi

$T_{(dk)}$: Zaman

V_T : Toplam reaksiyon hacmi

SF: Seyreltme faktörü

2.2. *Streptomyces lienomycini* 350-2 Suşu Tarafından Üretilen Lipazın (LipS350-2) Kısmi Olarak Saflaştırılması

Öncü çalışmalar sonucunda yüksek lipaz aktivitesi gösteren, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kültür Koleksiyonu'na dahil *S. lienomycini* 350-2 suşu tarafından üretilen lipaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmış ve her basamakta lipaz aktivitesi ölçülmüştür.

2.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Saflaştırmanın ilk basamağı olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Suş ISP2 broth besiyerine inoküle edilmiş, 30 °C'de 130 rpm'de 7. güne kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kültür Whatman 42 filtre kağıdından süzölmüş ve süpernatant kısmı saflaştırmada kullanılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesinde, lipazın maksimum olarak çökebildiği pH'yı tespit etmek amacıyla pH 4 ile 11 arasındaki değerlerde, % 70'lik amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürme işlemi yapılmış ve her pH değeri için spektrofotometrik yöntemle lipaz aktivitesi ölçölmüştür.

Elde edilen aktivite değerlerine göre lipazın maksimum olarak çöktüğü pH değeri tespit edilmiştir. Maksimum lipaz aktivitesinin ölçöldüğü pH değerinde enzimin maksimum olarak çökebildiği amonyum sülfat konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla % 40-90 arasındaki amonyum sülfat konsantrasyonlarında çöktürme işlemi yapılmış ve lipazın en iyi çökebildiği konsantrasyon belirlenmiştir.

Çöktürme işlemi için süpernatanta katı haldeki amonyum sülfattan çöktürme için gerekli olan miktar soğuk ortamda yavaş yavaş karıştırılarak ilave edilmiştir. Daha sonra karıştırma işlemine çalkamalı inkübatörde +4°C de 130 rpm'de 1 saat devam edilmiştir.

1 saatin sonunda protein çözeltilisi 10 000 rpm'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet uygun miktardaki 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tampon içinde çözülmüştür.

2.2.2. Diyaliz

Diyaliz işleminde kullanılacak olan diyaliz membran kullanılmadan önce 10 mM pH 7.5 EDTA içerisinde 30 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra membran 1 mM pH 7.5 EDTA içerisinde +4 °C'de saklanmıştır.

Diyaliz membran istenilen miktarda kesilmiş ve distile su ile iyice yıkanmıştır. Diyaliz membranın bir ucu diyaliz klipsi ile sıkıca tutturulmuştur.

Örnek diyaliz membranının içerisine aktarılmıştır. Diyaliz membranının diğer ucu, bir miktar boşluk ve hava bırakılarak diyaliz klipsi ile sıkıca tutturulmuştur. Hazırlanan diyaliz membranı 50 mM pH 9.0 Tris-HCl tamponu (Bkz. Ek-3) içinde, 80 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde, +4 °C'de gece boyunca (yaklaşık 16-18 saat) bırakılarak tuzun uzaklaştırılması sağlanmıştır.

2.2.3. Ultrafiltrasyon

Diyaliz sonucu elde edilen enzim solüsyonu 5 kDa'luk santrifügal filtre (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Millipore) ile 6000 RPM'de, +4 °C'de 30 dk/15 ml santrifüjlenerek konsantre edilmiştir.

2.2.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Ultrafiltrasyon sonucu elde edilen protein çözeltisi, jel filtrasyon kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır.

Jel filtrasyon kromatografisinde Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare, 17-0612-10) kolonu kullanılmıştır. Kolon protein purifikasyon sisteminde (Acta Prime Plus), 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tamponu (Bkz. Ek-3) ile bir gün boyunca yıkanmıştır. Daha sonra konsantre protein solüsyonu kolona yüklenmiş ve 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tamponu ile yürütülmüştür. 4'er ml hacimde fraksiyonlar toplanmış ve bu fraksiyonlardaki lipaz aktivitesi spektrofotometrik metot ile belirlenmiştir.

Yüksek lipaz aktivitesi görülen fraksiyonlar birleştirilmiş ve % 16'lık SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Ayrıca proteinin moleküler ağırlığı belirlenmiştir.

2.3. Protein Miktarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Çeşitli saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlardaki protein miktarı, Bradford Protein Tayin Yöntemi'ne göre belirlenmiştir (Bradford, 1976).

Temiz bir tüpün içine protein örneğinden 50 µl alınıp üzerine 750 µl saf su ilave edilmiştir. Bunun üzerine 200 µl Bradford reaktifi (Sigma, B6916) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. 5 dakikalık reaksiyondan sonra, mikro küvetler kullanılarak, 595 nm' de absorbans değeri alınmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinden, BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılarak hazırlanan standart eğriye göre total protein miktarları belirlenmiştir.

2.3.1. BSA standart eğrisinin hazırlanması

Protein miktarının belirlenmesinde standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır. BSA (Appli Chem, A1391)'dan 0.2 mg/ml konsantrasyonda stok solüsyon hazırlanmıştır. Pipet ile 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µl BSA (0.2 mg/ml) test tüplerine alınmış ve her biri distile su ile 800 µl'ye tamamlanmıştır. Bunların üzerine 200 µl Bradford reaktifi ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. 5 dk sonra, 595 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri alınmıştır. Elde edilen absorbans değerleri grafiğe aktarılarak BSA standart eğrisi elde edilmiş ve bu grafiğin eğim değeri protein miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

2.4. Protein ve enzim ile ilgili hesaplamalar

Ekstraselüler lipazın saflaştırma basamaklarının her aşamasında lipaz aktivitesi ve protein miktarları hesaplanmış ve toplam hacim, toplam protein, toplam aktivite, spesifik aktivite, ürün verimi ve saflaştırma katsayısı aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{\text{Absorbans}_{(595)} / \text{Eğim} \times \text{Seyreltme Faktörü}}{1000}$$

$$\text{Toplam Protein (mg)} = \text{Protein} \times \text{Toplam Hacim}$$

$$\text{Toplam Aktivite (U)} = \text{Lipaz Aktivitesi} \times \text{Toplam Hacim}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = \frac{\text{Toplam Aktivite}}{\text{Toplam Protein}}$$

Ürün Verimi = $\frac{\text{O Basamakta Ölçülen Toplam Aktivite}}{\text{İlk Basamakta Okunan Toplam Aktivite}} \times 100$

İlk Basamakta Okunan Toplam Aktivite

Saflaştırma Katsayısı = $\frac{\text{Ölçülen Spesifik Aktivite}}{\text{İlk Okunan Spesifik Aktivite}}$

İlk Okunan Spesifik Aktivite

2.5. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırma ilkesine dayanan SDS-PAGE enzim çalışmalarında en çok kullanılan elektroforetik yöntemdir (Copeland, 2000). Çalışmada proteinin moleküler ağırlığına göre ayırımı SDS-PAGE tekniği ile Laemmli (1970)'ye göre yapılmıştır.

Protein örneklerinden 1.5 ml'lik ependorf tüplerine 50 µl alınmıştır. Örneklerin üzerine 30 µl örnek tamponu (Bkz. Ek-D) eklenmiş ve iyice karışması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlar 95-100 °C sıcaklıktaki kaynar suda 3 dakika bekletilmiştir.

Aparatın camları (0.75mm x 16cm x 21cm) alkolle iyice temizlenip kurulandıktan sonra aralarına plastik ayırıcı yerleştirilmiştir. İşlem sonunda plastik ayırıcı, 2 cam arasında kalmış ve arada boşluk oluşması sağlanmıştır. Aparat hazırlandıktan sonra önceden hazırlanmış olan % 16'lık ayırıcı jel (Bkz. Ek-D) iki cam arasına dökülmüştür. Burada jelin hava ile temasını kesmek için üzeri tamamen saf su ile doldurulmuştur. Jelin polimerize olması için yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Ayırıcı jel polimerize olduktan sonra üzerindeki saf su boşaltılmış ve bunun yerine % 4'lük yığma jel ilave edilmiştir. Bu işlemden sonra yığma jel içerisine plastik tarak yerleştirilerek örneklerin (Bkz. Ek-D) yükleneceği kuyucuklar hazırlanmıştır. Tüm bu işlemler esnasında jelin içinde ve arasında hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edilmiştir.

Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarılmış ve çukurlukların içi yürütme tamponu (Bkz. Ek-D) ile yıkanmıştır. Elektroforez tankının içi de yürütme tamponu ile doldurulmuştur.

Hazırlanan jeldeki kuyucuklardan birine moleküler ağırlığı bilinen markır (MBI Fermentas, SM0431), diğer kuyucuklara da elde edilen protein örnekleri yüklenmiştir.

Yüklenmiş örnekler 200 Volt, 80 miliamperde elektroforeze tabi tutulmuştur. Daha sonra izleme boyasına bakılarak jelin altında 1.5 cm mesafe kalınca elektroforez durdurulmuştur. Elektroforezden sonra jel camların arasından dikkatlice çıkarılarak boyama solüsyonunda (Bkz. Ek-D) 1-2 saat bekletilmiştir.

Boyama işleminden sonra boya çıkarıcı solüsyona alınarak birkaç sefer yıkanmış ve bu solüsyonda bir gece bekletilmiştir. Bu işlemlerle protein bantlarının boyanması ve görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Protein bantları tamamen görünür hale gelince jeldeki protein bantları görüntülenmiş ve oluşan bantlar 116.0, 66.0, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 kDa'lık markır (MBI, Fermentas, SM0431) bantları ile karşılaştırılarak proteinin moleküler ağırlığı belirlenmiştir.

2.6. Saflaştırılan Enzimin Karakterizasyonu

Saflaştırılan lipaz enzimi çeşitli özellikleri ile karakterize edilmiştir. Bu amaçla, elde edilen lipazın optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiş, enzim aktivitesi üzerinde sıcaklığın, pH'nın, çeşitli alkollerin etkisi, enzimin substrat spesifitesi ve depolanma stabilitesi belirlenmiştir.

Karakterizasyon aşamasındaki tüm lipaz aktivite ölçümleri *p*-NPP'nin substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik metot ile 410 nm'de yapılmıştır (Winkler vd., 1979; Kordel vd., 1991; Gupta vd., 2002).

2.6.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Optimum pH'nın belirlenmesinde spektrofotometrik ve titrimetrik metot kullanılmıştır.

2.6.1.1. Spektrofotometrik metot ile optimum pH'nın belirlenmesi

Lipazın en yüksek aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, pH'ları 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 10.6 olan 50 mM'lık farklı tamponlar (Bkz. Ek-3) kullanılarak substrat solüsyonları hazırlanmıştır. pH 5.0–6.0 aralığında sitrat-fosfat tamponu, pH 7.0-9.0 aralığında Tris-HCl tamponu, pH 10.0-10.6 aralığında da glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır.

Farklı pH değerlerindeki substrat solüsyonundan 9 ml alınarak 1 ml enzim ile karıştırılmış ve 30 °C'de 30 dakika, 130 rpm'de inkübe edilmiş ve lipaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir.

2.6.1.2. Titrimetrik metot ile optimum pH'nın belirlenmesi

Optimum pH'nın belirlenmesinde zeytinyağı emülsiyon yöntemi kullanılmış ve açığa çıkan yağ asitleri titrimetrik metot ile belirlenmiştir. Bu amaçla pH'ları 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 olan 50 mM'lık farklı tamponlar (Bkz. Ek-3) hazırlanmıştır. pH 5.0-6.0 aralığında sitrat-fosfat tamponu, pH 7.0-9.0 aralığında Tris-HCl tamponu, pH 10.0 için de glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. Tampona % 10 oranında zeytinyağı ve emülsifiyer olarak % 5 oranında Triton X-100 ilave edilerek homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Kör olarak enzim içermeyen substrat solüsyonu kullanılmıştır. Elde edilen substrat solüsyonundan 10 ml alınmış ve içerisine 1 ml enzim ilave edilerek 30 °C sıcaklıkta, 130 rpm'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda reaksiyon etanol + aseton karışımı ile durdurulmuş ve ortama 2-3 damla fenol ftalein (% 1'lik) ilave edilmiştir. Ortamda açığa çıkan yağ asitleri 0.05 M NaOH titre edilerek belirlenmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$U/ \text{ml enzim} = \frac{(\text{NaOH})(\text{NaOH'ın Molaritesi})(1000)(T)(df)}{(V_E)}$$

NaOH: Örnek için harcanan NaOH (ml)- Kör için harcanan NaOH (ml)

1000: Mililitreyi mikrolitreye dönüştürmek için

T: 2 (30 dk'lık reaksiyon süresini 1 saate dönüştürmek için) (Ünite tanımlaması)

df: Dilüsyon faktörü

V_E: Kullanılan enzim hacmi (ml)

Lipazın en iyi aktivite gösterdiği pH değeri, bu aşamadan sonra yapılan tüm aktivite testlerinde optimum pH olarak kullanılmıştır.

2.6.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Lipazın en yüksek aktivite gösterdiği reaksiyon sıcaklığını belirlemek amacıyla; 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda lipaz aktiviteleri ölçülmüştür. Aktivite ölçümünde lipazın en iyi aktivite gösterdiği pH tamponu ile hazırlanan substrat solüsyonu kullanılmıştır.

Lipazın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri bundan sonraki tüm aktivite testlerinde optimum sıcaklık olarak kullanılmıştır.

2.6.3. pH stabilitesinin belirlenmesi

pH stabilitesinin belirlenmesi için lipaz, pH'ları 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0 olan 50 mM'lık farklı tamponlar (Bkz. Ek-3) ile 1: 1 oranında karıştırılarak 30 °C sıcaklıkta, 130 rpm'de 1 ve 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. pH 5.0-6.0 aralığında sitrat-fosfat tamponu, pH 7.0-9.0 aralığında Tris-HCl tamponu, pH 10.0-11.0 aralığında da glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında tampon içermeyen örnekler kullanılmıştır. 1 ve 2 saatlik ön inkübasyonun sonunda spektrofotometrik metot ile lipaz aktivitesi ölçülmüş ve lipazın hangi pH'da ne oranda stabil kalabildiği belirlenmiştir. Kontrolden elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğer değerler kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.6.4. Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Sıcaklığın lipaz stabilitesine olan etkisinin belirlenmesinde lipaz 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda 1 ve 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında ön inkübasyon yapılmayan enzim solüsyonu kullanılmıştır. 1 ve 2 saatlik ön inkübasyonun sonunda spektrofotometrik metot ile lipaz aktivitesi ölçülmüş ve lipazın hangi sıcaklıkta ne kadar oranda stabil kalabildiği belirlenmiştir. Kontrolden elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.6.5. Çeşitli alkollerin lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi

Çeşitli alkollerin (metanol, etanol ve izopropanol) lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesinde enzim alkoller ile 1:1 oranında karıştırılarak 30 °C sıcaklıkta, 130 rpm'de 1 ve 24 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında herhangi bir alkol ile ön inkübasyona tabi tutulmayan enzim kullanılmıştır. Ön inkübasyon sonunda lipaz aktivitesi *p*-NPP' nin substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Kontrolden elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.6.6. Alkollerin çeşitli konsantrasyonlarının lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi

Alkollerin çeşitli konsantrasyonlarının lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesinde enzim % 2.5, 5, 10, 15, 25, 50' lik konsantrasyonlarda alkol ile karıştırılmış ve 30 °C sıcaklıkta 130 rpm' de 1 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol olarak alkol ile ön inkübasyona tabi tutulmayan enzim solüsyonu kullanılmıştır. Ön inkübasyon sonunda lipaz aktivitesi *p*-NPP'nin substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Kontrolden elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.6.7. Alkollerin çeşitli ön inkübasyon sürelerinde lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi

Lipaz, % 50'lik konsantrasyonda alkoller ile karıştırılmış ve 30 °C sıcaklıkta 130 rpm' de 1, 12, 24, 36, 48, 60 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol olarak alkol ile ön inkübasyona tabi tutulmayan enzim solüsyonu kullanılmıştır. Ön inkübasyon sonunda lipaz aktivitesi *p*-NPP'nin substrat olarak kullanıldığı spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Kontrolde elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.6.8. Lipazın substrat spesifitesinin belirlenmesi

Lipazın substrat spesifitesinin belirlenmesinde çeşitli yağ asidi zincir uzunluklarına sahip doğal (zeytinyağı, ayçiçeği yağı ve atık yağ) ve sentetik substratlar

(*p*-NPP, *p*- nitrofenil bütirat (*p*-NPB) ve *p*- nitrofenil oleat (*p*-NPO)) kullanılmıştır. Lipazın çeşitli *p*-nitrofenil esterlerine karşı spesifitesinin belirlenmesinde spektrofotometrik, doğal substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesinde ise titrimetrik metot kullanılmıştır. En yüksek lipaz aktivitesi görülen doğal ve sentetik substratların aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer aktiviteler bu değerle kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.6.9. Lipazın depolanma stabilitesinin belirlenmesi

Lipazın depolanma stabilitesinin belirlenmesinde lipaz +4 °C'de 30.güne kadar saklanmıştır. 5'er gün aralıklarla lipaz aktivitesi belirlenmiştir. Başlangıçtaki lipaz aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer günlerdeki aktiviteler başlangıçtakiaktivite ile kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

2.7. Lipazın Biyodizel Üretim Kapasitesinin ve Endüstriyel Uygulanabilirliğinin Belirlenmesi

Lipazın transesterifikasyon kapasitesi kalitatif olarak belirlenerek biyodizel üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Biyodizel üretim reaksiyonu Yang vd. (2009)'un metodunun modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Ayaz, 2011; Yoo vd., 2011). Reaksiyon sonucu elde edilen üründeki mono, di ve trigliserit, serbest yağ asidi ve yağ asidi alkil ester içeriği kalitatif olarak TLC ile belirlenmiştir.

Biyodizel reaksiyonu, metanol ve etanol varlığında ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. 7.89 ml ticari zeytinyağı ile 0.99 ml alkol ve katalizör olarak da 2.6 ml lipazın kapaklı cam tüpte karıştırılmasıyla başlatılmış ve 40 °C sıcaklıkta 200 rpm' de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Pozitif kontrol olarak biyodizel üretiminde endüstriyel olarak kullanılan Novozym 435 (*Candida antarctica* lipaz B) kullanılmıştır.

Biyodizel reaksiyonu ayrıca ayçiçek yağı ve atık yağ kullanılarak da tekrarlanmıştır.

2.7.1. Reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analizi

Biyodizel üretiminin sonunda reaksiyon karışımından 200 µl örnek alınarak, 1 ml hekzan ile 2 dk ekstrakte edilmiş ve 10000 rpm' de 15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi takiben üst fazdan 10 µl alınarak ince tabakaya yüklenmiştir. Standart olarak metil oleat (% 99) kullanılmıştır.

İnce tabaka kromatografisinde hareketli faz olarak hekzan/etil asetat/asetik asit (90:10:1) kullanılmıştır. Örnekler ince tabakada yürütüldükten sonra tabaka açık havada kurutulmuş ve iyot buharında belirgin hale getirilerek gözlenmiştir.

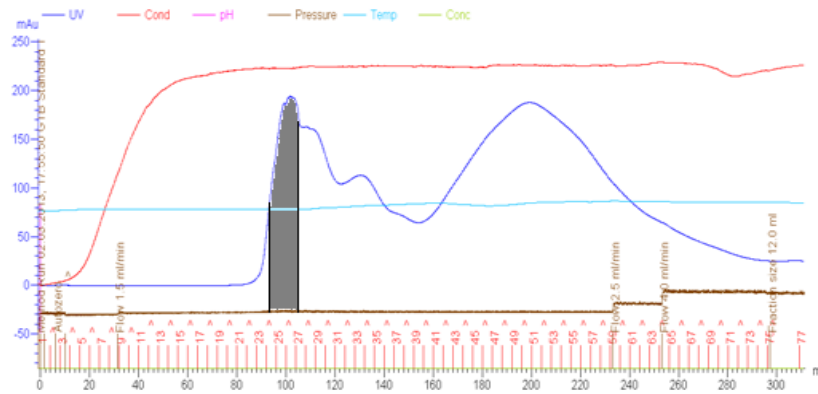
3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. LipS350-2'nin Kısmi Olarak Saflaştırılması

S. lienomycini 350-2 suşu ISP2 broth besiyerine inoküle edilmiş, 30 °C' de 130 rpm'de 7. güne kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda Whatman 42 filtre kağıdından süzölmüş ve süpernatant kısmi saflaştırmada kullanılmıştır.

Elde edilen süpernatanta, pH 8.0'de ve % 90 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürme işlemi uygulanmıştır. Çöktürme işleminden sonra protein çözeltisi santrüfüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 50 mM pH 9.0 Tris-HCl tamponu ile çözölerek diyaliz membranına aktarılmıştır. Hazırlanan diyaliz membranı (3 nm por çaplı) 50 mM pH 9.0 Tris-HCl tamponu içinde, +4 °C'de gece boyunca (yaklaşık 16-18 saat) bırakılarak tuzun uzaklaştırılması sağlanmıştır.

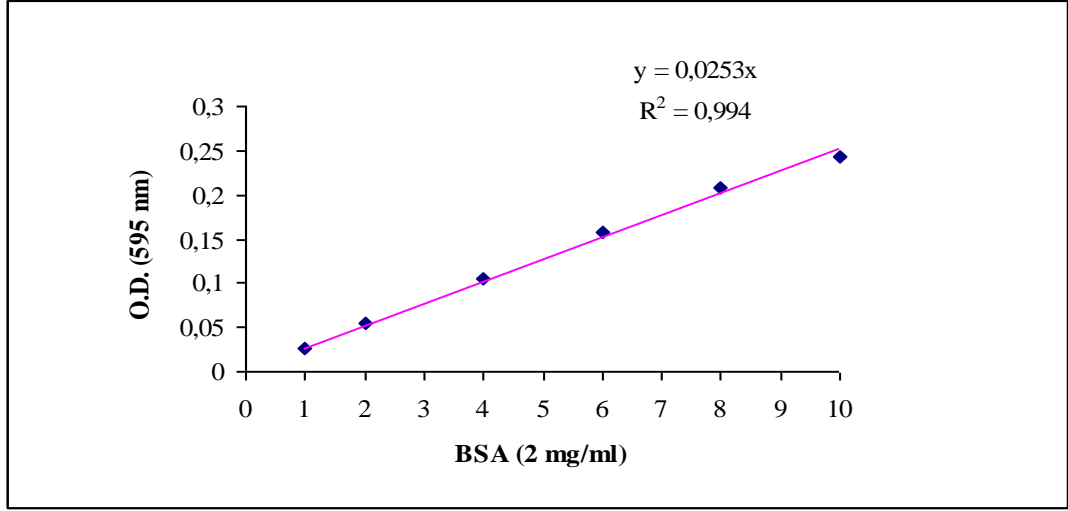
Diyaliz sonrasında elde edilen enzim solüsyonu ultrafiltrasyon ile yoğunlaştırılmıştır. Konsantre edilen enzim solüsyonu Sephacryl S-100 HR jel filtrasyon kolonuna yüklenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde elde edilen fraksiyonların UV₂₈₀ nm'deki absorbans değerleri Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Jel filtrasyon kromatografisinde elde edilen fraksiyonların UV₂₈₀ nm'deki absorbans değerleri (Mavi: Protein, Kırmızı: İletkenlik)

Elde edilen fraksiyonlarda lipaz aktiviteleri ölçülerek en yüksek lipaz aktivitesi görülen 24- 27 arası fraksiyonlar birleştirilmiştir.

Çeşitli saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlardaki toplam protein miktarları, Bradford protein tayin yöntemine göre, spektrofotometrik olarak elde edilen absorbans değerlerinden, BSA kullanılarak hazırlanan standart eğriye göre hesaplanmıştır. Şekil 3.2.'de BSA kullanılarak hazırlanan standart eğri verilmiştir.



Şekil 3.2. BSA standart eğrisi

LipS350-2'nin her bir saflaştırma basamağındaki lipaz aktivitesi ve protein miktarları hesaplanmış ve toplam hacim, toplam protein, toplam aktivite, spesifik aktivite, ürün verimi ve saflaştırma katsayısı belirlenmiştir (Çizelge 3.1.). Buna göre lipazın jel filtrasyon kromatografisi sonrası spesifik aktivitesi 1466.8 U/mg, saflaştırma verimi % 1.170 ve saflaştırma katsayısı 1.56 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. LipS350-2'nin saflaştırma basamaklarındaki toplam protein, toplam aktivite, spesifik aktivite, verim ve saflaştırma katsayısı

Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham enzim (süpernatant)	1000	12.53	11782	940.303	100	1
Amonyum sülfat çök.+ Diyaliz	55.56	6.314	7785.96	1233.06	66.08	1.308
Sephacryl S-100 HR jel filtrasyon kromatografisi	22.22	0.094	137.88	1466.8	1.170	1.56

LipS350-2'nin kısmi saflaştırma sonucunda spesifik aktivite yükselmiş ancak verimde önemli bir düşüş meydana gelmiştir. Bunun jel filtrasyon kromatografisinde tampona ilave edilen NaCl'nin enzim üzerinde meydana getirdiği inhibisyon kaynaklı olduğu düşünülebilir.

Enzimlerle ilgili birçok ticari uygulama her zaman enzimin homojen preparasyonuna gerek duymamaktadır (Saxena vd., 2003; Gupta vd., 2004) fakat homojen preparasyon etkili ve başarılı bir kullanıma olanak vermektedir (Saxena vd., 2003). Saf kimyasal, farmasötik ve kozmetik gibi endüstrilerdeki final uygulamalarda enzimin belli bir düzeyde saflaştırılması gereklidir (Gupta vd., 2004). Ancak atık suların arıtılması ve biyodizel üretimi gibi endüstriyel uygulamalarda kısmi olarak saflaştırılmış veya ham enzim preparatlarının kullanılması mümkün olabilmektedir. Ham enzimin kullanımı ile saflaştırmadan kaynaklanan maliyet artışı önemli oranda giderilebilmektedir.

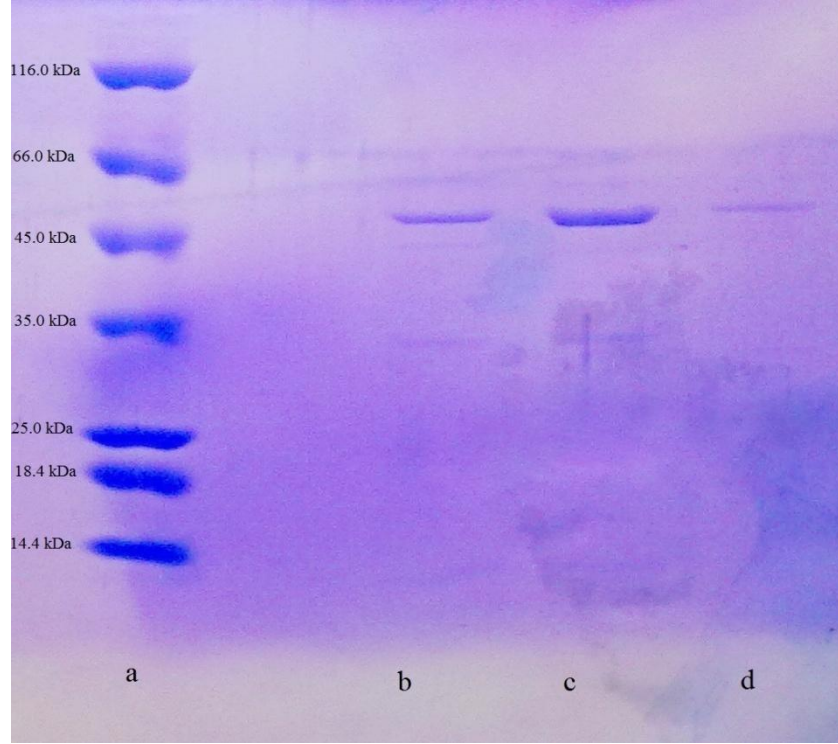
Literatürde lipazlarla ilgili çok sayıda saflaştırma çalışması mevcuttur. *P. tolaasii* lipazının saflaştırılmasında, Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi sonrası enzimin spesifik aktivitesi 200 U/mg, verim % 9 ve saflaştırma katsayısı 1000 olarak belirlenmiştir (Baral ve Fox, 1997). *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazının saflaştırılmasında jel

filtrasyon sonunda enzimin spesifik aktivitesi 428.08 U/mg, verim % 19.7 ve saflaştırma katsayısı 201.45 olarak tespit edilmiştir (Sharma vd., 2002). *Streptomyces rimosus* GDS(L) ile yapılan bir çalışmada saflaştırmanın son basamağı olan FPLC (Fast protein liquid chromatography) Mono-Q kolonunun kullanıldığı kolon kromatografisi ile lipaz saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 436.2 U/mg, verim % 68.4 ve saflaştırma katsayısı 3.6 olarak belirlenmiştir (Vujaklija, 2003). *Pseudomonas aeruginosa* lipazının saflaştırmasında Sephacryl S-200 jel filtrasyon sonrası enzimin spesifik aktivitesi 19.285 U/mg, verim % 2.1 ve saflaştırma katsayısı 21.5 olarak hesaplanmıştır (Singh ve Banerjee, 2007). *P. fluorescens* JCM5963'den elde edilen organik solvent toleranslı lipazın saflaştırılmasında Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi sonucu enzimin spesifik aktivitesi 442.1 U/mg, verim % 53.5 ve saflaştırma katsayısı 13.5 olarak bulunmuştur (Zhang vd., 2009). *S. aureus*'dan elde edilen lipaz ile yapılan bir saflaştırma çalışmasında enzimin spesifik aktivitesi 4200 U/mg, verim % 23 ve saflaştırma katsayısı 420 olarak belirlenmiştir (Horchani vd., 2009). *P. fluorescens* JCM5963'den elde edilen organik solvent toleranslı lipazın saflaştırılmasında jel filtrasyon kromatografisi kullanılmış ve enzimin spesifik aktivitesi 442.1 U/mg, verim % 53.5 ve saflaştırma katsayısı 13.5 olarak tespit edilmiştir (Zhang vd., 2009). *Staphylococcus xylosus*'dan elde edilen termotolerant wt-SXL2 ve r-SXL2 adlı lipazların saflaştırılmasında, wt-SXL2 adlı lipaz Mono-Q kolonu kullanılarak saflaştırılmış ve enzimin spesifik aktivitesi 6300 (U/mg) ve saflaştırma katsayısı 32.5 olarak bulunmuştur. r-SXL2 adlı lipazın saflaştırılmasında ise Ni-NTA afinite kromatografisi kullanılmış ve bunun sonucunda enzimin spesifik aktivitesi 4100 (U/mg) ve saflaştırma katsayısı 3.41 olarak tespit edilmiştir (Bouaziz vd., 2011).

3.2. Moleküler ağırlığının belirlenmesi

SDS-PAGE jeldeki kuyucuklara moleküler ağırlığı bilinen marker ve elde edilen protein örnekleri yüklenmiştir. Yüklenmiş örnekler 200 Volt, 80 miliamperde elektroforeze tabi tutulmuştur. Daha sonrasında boyama ve yıkama işlemleri

yapılmış ve protein bantları tamamen görünür hale gelince oluşan bantlar markır bantları ile karşılaştırılarak lipazın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 52 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. SDS-PAGE'de elde edilen protein bantları, a) Protein markırı b) Süpernatant, c) Ultrafiltrasyon d) Jel filtrasyon kromatografisi

Yapılan çalışmalarda mikrobiyal lipazların moleküler ağırlıklarının çok çeşitli olduğu görülmektedir. Bakteriyel lipazlarla ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalarda tespit edilen en küçük moleküler ağırlığa sahip *B. thermoleovorans* CCR11 lipazın 11 kDa ağırlığından (Castro-Ochoa vd., 2005), bilinen en büyük *P. tolaasii*'den izole edilmiş lipazın molekül ağırlığı 670 kDa'a (Baral ve Fox, 1997) kadar değişebilmektedir.

Bunun dışında moleküler ağırlığı 30-45 kDa arasında olan çok sayıda lipaz izole edilmiştir (Lee ve Rhee, 1993; Lin vd., 1996; Sharma vd., 2002; Snellman vd., 2002; Wang vd., 2009; Demir ve Tükel, 2010; Ayaz, 2011; Show vd., 2012; Yao vd., 2013). Moleküler ağırlığı 50 kDa'dan büyük olan lipazlar da mevcuttur (Dharmsthiti ve Luchai, 1999; Kanwar ve Goswami, 2002; Rahman vd., 2005; Karadzic vd., 2006; Kandasamy vd., 2010; Saraç, 2011).

Yapılan çalışmalara bakıldığında Streptomiset lipazlarının moleküler ağırlıkları 14.3 ile 75 kDa arasında değişiklik göstermektedirler (Abramic vd., 1999; Lescic vd., 2001; Vujaklija vd., 2002; Vujaklija vd., 2003; Cote ve Shareck, 2008; Ayaz, 2011; Mander vd 2011; Park vd., 2011; Fodil vd., 2011; Aly vd., 2012; Jiang vd., 2012; Fodil vd., 2012; Rahulan vd., 2012; Sugimori vd., 2012; Mander vd., 2012; Yang vd., 2012; Mander vd., 2013; Hlimaa vd., 2013; Chi vd., 2013; Ayala vd., 2013; Vennila ve Krishnaveni, 2013).

3.3. LipS350-2'nin Karakterizasyonu

Enzimin sahip olduğu çeşitli özellikler belirlenerek karakterize edilmiştir. Biyodizel üretimi için kullanılacak ideal bir lipazın geniş pH ve sıcaklık aralıklarında aktif ve stabil olmalı, geniş substrat spesifitesine sahip olmalı ve alkollerin varlığında stabil kalabilmelidir. Ayrıca verimli olarak kullanılabilmesi için depolanabilir bir enzim olmalıdır.

Bu nedenle LipS350-2'nin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendikten sonra, pH ve sıcaklık stabiliteleri, çeşitli alkollerin farklı konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde enzim aktivitesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Ayrıca enzimin substrat spesifitesi ve depolanma stabilitesi de tespit edilmiştir.

3.3.1. Optimum pH

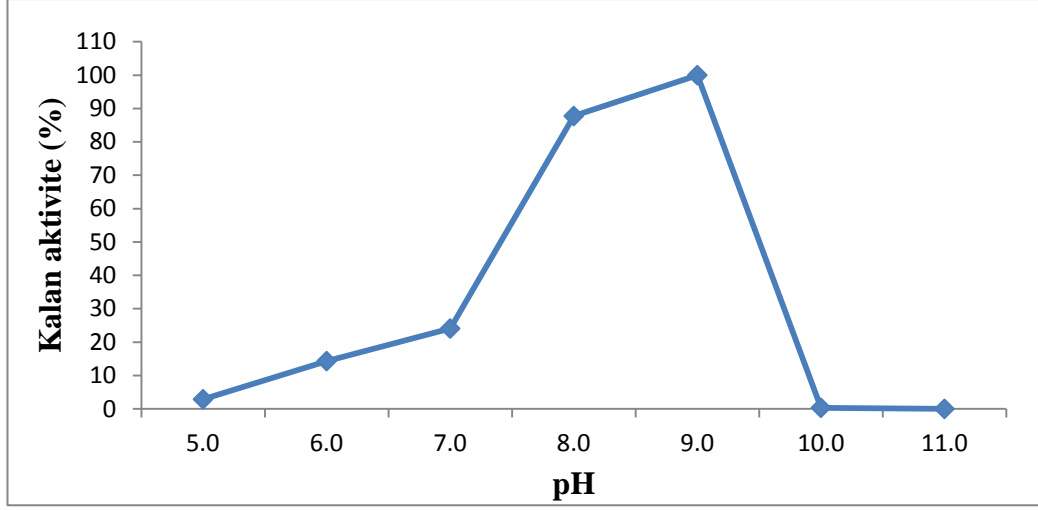
LipS350-2'nin değişik pH değerlerindeki aktivitesi spektrofotometrik ve titrimetrik olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik yöntem ile ölçülen enzim aktiviteleri Çizelge 3.2.'de ve titrimetrik olarak ölçülen aktivite değerleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir. Ölçümler sonucunda enzimin optimum pH değeri 9.0 olarak belirlenmiştir. pH 9.0'daki aktivite değeri % 100 kabul edilmiş ve diğer pH değerlerindeki aktiviteler buna oranlanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.).

Çizelge 3.2. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde spektrofotometrik olarak belirlenen aktivitesi

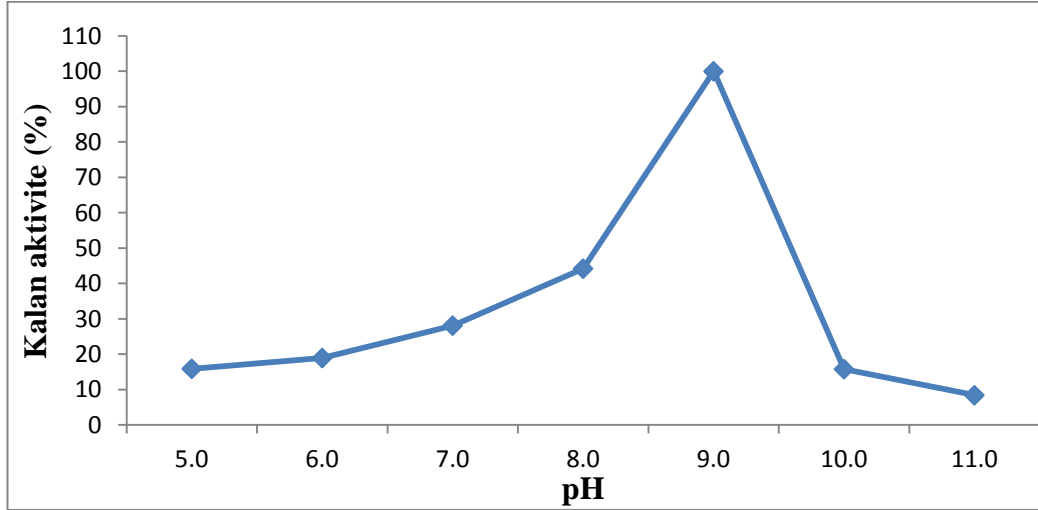
pH	Enzim Aktivitesi (U/ml)
5.0	0.218
6.0	1.084
7.0	1.824
8.0	6.65
9.0	7.578
10.0	0.025

Çizelge 3.3. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde titrasyon ile belirlenen aktivitesi

pH	Enzim Aktivitesi (U/ml)
5.0	53
6.0	18
7.0	26.7
8.0	42
9.0	95
10.0	15
11.0	8



Şekil 3.4. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde spektrofotometrik olarak belirlenen kalan aktivite değerleri



Şekil 3.5. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde titrasyon ile belirlenen kalan aktivite değerleri

p-nitrofenol asidik pH'lardan önemli ölçüde etkilendiği için asidik pH'larda bu esterlerle ölçüm yapılamamaktadır (Kademi vd., 2000). Düşük pH değerlerinde yağ asitleri tam olarak iyonize olamamakta ve bu durum yanlış ölçümlerle sonuçlanmaktadır (Gilham ve Lehner, 2005).

Bu nedenle spektrofotometrik ölçümler sadece nötral veya alkali pH değerlerinde yapılabilmektedir ki bu değerler bazı lipazlar için optimum değildirler (Gilham ve Lehner, 2005).

Ancak yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde de (Gutarra vd., 2009) *p*- nitrofenil esterleri stabil olmadığı için (Lin vd., 1996; Sharmavd., 2002; Salameh ve Wiegel, 2007; Gutarra vd., 2009) bu ekstrem koşullarda da *p*-nitrofenil esterlerinin kullanıldığı spektrofotometrik ölçüm ile sağlıklı sonuçlar alınamamaktadır (Lin vd., 1996; Lotrakul ve Dharmsthiti, 1997; Gao vd., 2000; Sharma vd., 2002; Kambourova vd., 2003; Salameh ve Wiegel, 2007; Horchani vd., 2009; Sabri vd., 2009).

Bu nedenle spektrofotometrik yöntem alternatif olarak düşük ve alkali pH değerlerinde lipaz aktivitesi zeytinyağı emülsiyon (Gao vd., 2000; Kojima ve Shimizu, 2003), polivinil emülsiyon metodu (Omar vd., 1987; Kanwar ve Goswami, 2002), pH-Stat (Jaeger vd., 1994; Meyers vd., 1996; Beisson vd., 2000; Kambourova vd., 2003) ve titrimetrik metot (Iizumi vd., 1990; Sugihara vd., 1991; Makhzoum vd., 1996; Lotrakul ve Dharmsthiti, 1997; Lescic vd., 2001; Rathi vd., 2001; Litthauer vd., 2002; Dutta ve Ray, 2009; Horchani vd., 2009; Kandasamy vd., 2010; Vishnupriya vd., 2010; Bayramoğlu vd., 2011) kullanılarak belirlenebilmektedir.

Yapılan ölçümlere göre LipS350-2'nin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri hem spektrofotometrik hem de titrimetrik metotta 9.0 olarak tespit edilmiştir.

Bakteriyel lipazların en iyi aktivite gösterdikleri pH değerleri, nötral (Dharmsthiti ve Luchai, 1999; Lee vd., 2009; Sugimori vd., 2012; Sugimori vd., 2013) veya alkali pH'lar (Kanwar ve Goswami, 2002; Dutta ve Ray, 2009; Yoo vd., 2011; Ayaz, 2011; Saraç, 2011) olmakla beraber asidik pH'larda maksimum aktivite gösteren çeşitli lipazlar da mevcuttur (Kandasamy vd., 2010; Ramani vd., 2010).

Yapılan çalışmalara bakıldığında Streptomiset lipazlarının en iyi aktiviteyi pH 7-9 arasında gösterdiği görülmektedir (Mander vd 2011; Park vd., 2011; Fodil vd., 2011; Jiang vd., 2012; Fodil vd., 2012; Rahulan vd., 2012; Sugimori vd., 2012; Mander vd., 2012; Yang vd., 2012; Mander vd., 2013; Hlimaa vd., 2013; Chi vd., 2013; Ayala vd., 2013; Vennila ve Krishnaveni, 2013).

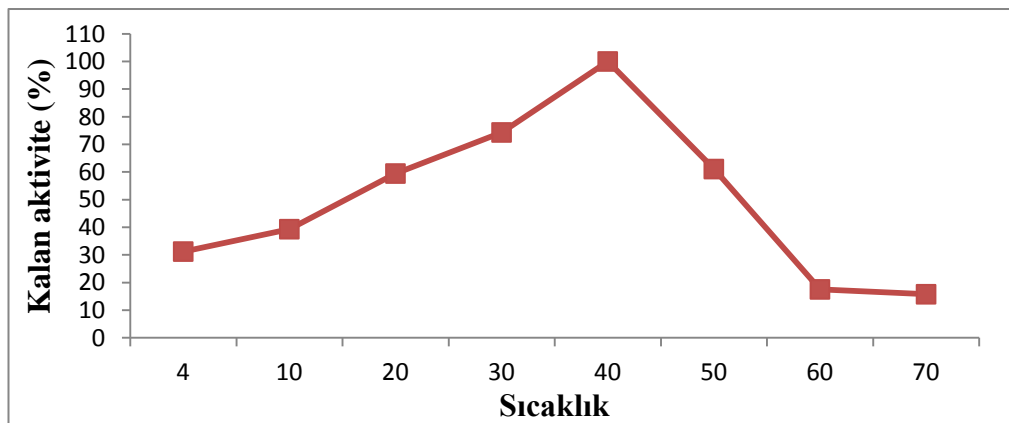
Spektrofotometrik metot ve titrimetrik metot ile belirlenen optimum pH değeri olan 9.0 enzimin diğer karakterizasyon ve stabilizasyon parametrelerinde optimum pH değeri olarak kullanılmıştır.

3.3.2. Optimum sıcaklık

LipS350-2'nin değişik sıcaklık değerlerindeki aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve LipS350-2'nin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 40 °C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.4.). 40 °C'deki aktivite değeri % 100 kabul edilmiş ve diğer sıcaklık değerlerindeki aktiviteler buna oranlanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.6.).

Çizelge 3.4. LipS350-2'nin çeşitli sıcaklık değerlerindeki aktivitesi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (U/ml)
4	3.680
10	4.633
20	7.006
30	7.578
40	11.782
50	7.197
60	2.066
70	1.859



Şekil 3.6. LipS350-2'nin çeşitli sıcaklık değerlerinde belirlenen kalan aktivite değerleri

Bakteriyel lipazların optimum sıcaklıkları genellikle 30-60°C aralığındadır (Kanwar vd., 2002; Litthauer vd., 2002; Castro-Ochoa vd., 2005; Dandavate vd., 2009; Wang vd., 2009; Zhang vd., 2009; Ramani vd., 2010; Kandasamy vd., 2010; Ayaz, 2011; Sharma vd., 2011; Saraç, 2011; Wang vd., 2011; Cao vd., 2012; Wang vd., 2012; Abdulla ve Ravindra, 2013; Bose ve Keharia., 2013; Joshi ve Khare, 2013). Fakat bu sıcaklık değerlerin altında (Cai vd., 2009; Sharma vd., 2011) veya üstünde (Castro-Ochoa vd., 2005; Horchani vd., 2009; Wang vd., 2009; Sharma vd., 2011; Kumara vd., 2012; Stergiou vd., 2013) optimum sıcaklığı olan bakteriyel lipazlar da mevcuttur.

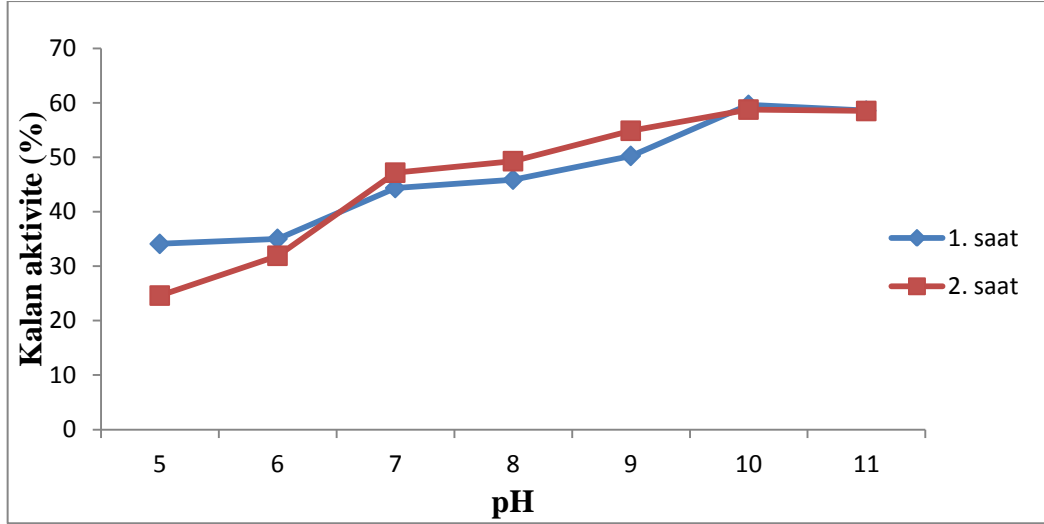
Streptomisetlerle yapılan çalışmalara bakıldığında bu cinse ait lipazlarının en iyi aktiviteyi 30-55 °C arasında gösterdiği görülmektedir (Mander vd 2011; Park vd., 2011; Fodil vd., 2011; Fodil vd., 2012; Jiang vd., 2012; Mander vd., 2012; Rahulan vd., 2012; Sugimori vd., 2012; Yang vd., 2012; Ayala vd., 2013; Chi vd., 2013; Hlimaa vd., 2013; Mander vd., 2013; Vennila ve Krishnaveni, 2013).

Yapılan çalışmalar göz önüne alındığı zaman streptomisetlerden elde edilen lipazların optimum pH'larının pH 6.0-10.0 arasında, sıcaklıklarının ise çok geniş aralıkta 20-60°C olduğu görülmüştür. Çalışmada elde edilen lipazın optimum değerleri de bu aralıklarda bulunmuştur.

Belirlenen optimum sıcaklık değeri olan 40 °C, enzimin diğer karakterizasyon ve stabilizasyon parametrelerinde optimum sıcaklık değeri olarak kullanılmıştır.

3.3.3. pH stabilitesi

Saflaştırılan enzimin stabil kalabildiği pH değerleri belirlenmiştir. LipS350-2'nin pH stabilitesinin belirlenmesinde enzim çeşitli pH'larda 1 ve 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Enzim aktivitesi optimum şartlar olarak belirlenen pH 9.0'da 40 °C'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kontrolde elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğer değerler kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.7.).



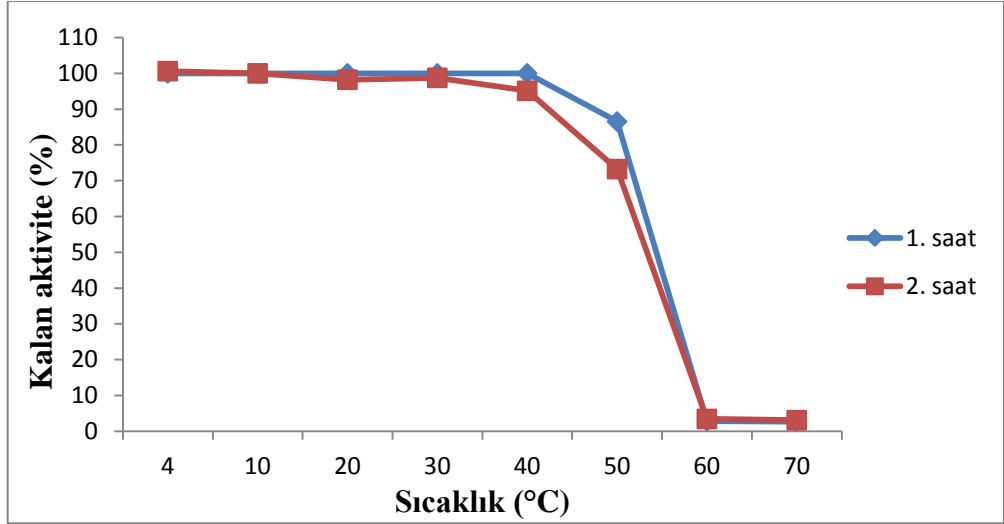
Şekil 3.7. LipS350-2'nin çeşitli pH değerlerinde 1 ve 2 saat sonundaki kalan aktivite değerleri

LipS350-2'nin nötral ve alkalın pH değerlerinde stabil olduğu saptanmıştır. Enzimin 1. ve 2. saatin sonunda aktivitesini büyük oranda koruduğu görülmüştür. Maksimum stabilite pH 7.0-11.0 aralığında belirlenmiştir.

Bakteriyel lipazlar pH 4.0-11.0'in üzerindeki geniş pH değerlerinde stabiliteye sahiptirler (Kojima vd., 1994; Wang vd., 1995; Khyami-Horani, 1996; Dong vd., 1999; Sharma vd., 2011). pH 6.0-10.0 (Lin vd., 1996; Fodil vd., 2012; Rahulan vd., 2012; Bose ve Keharia., 2013), pH 4.0-11.5 (Karadzic vd., 2006; Kumara vd., 2012; Yoo vd., 2012) ve pH 4.0-10.0 aralığında (Lee ve Rhee, 1993; Mander vd 2013) stabil kalabilen lipazlar mevcuttur.

3.3.4. Sıcaklık stabilitesi

LipS350-2'nin stabil kalabildiği sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla LipS350-2'nin çeşitli sıcaklıklarda 1 ve 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuş ve lipaz aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesi pH 9.0'da 40 °C'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kontrolden elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. LipS350-2'nin çeşitli sıcaklık değerlerinde 1 ve 2 saat sonundaki kalan aktivite değerleri

Enzimin 1. ve 2. saat sonunda 4-40 °C aralığında aktivitesinin %100'den fazlasını koruduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesinin 50 °C'de kısmen, 60-70°C'de ise enzimin tamamen inhibe olduğu belirlenmiştir.

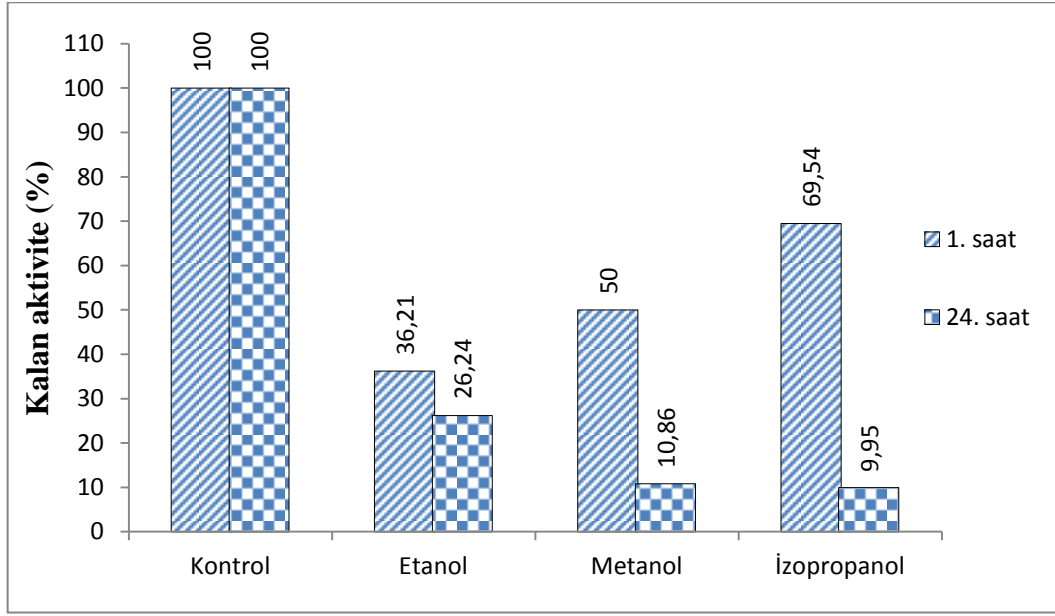
LipS350-2'nin düşük sıcaklıklardaki endüstriyel proseslerde etkin bir şekilde kullanılabilir özelliklere sahip olmasının yanında nisbeten termofilik koşullarda da kullanıma uygundur. Ancak bu enzim yüksek termofilik koşullarda kullanıma uygun özellikte değildir.

Streptomiset lipazlarının sıcaklık stabilitelerine bakıldığında, 20-60 °C'de (Ayaz, 2011; Mander vd 2011; Park vd., 2011; Jiang vd., 2012; Rahulan vd., 2012; Sugimori vd., 2012; Mander vd., 2012; Yang vd., 2012; Mander vd., 2013; Hlimaa vd., 2013; Chi vd., 2013; Ayala vd., 2013; Vennila ve Krishnaveni, 2013) ve 60-80°C'de (Niladevi vd 2008; Fodil vd., 2011; Fodil vd., 2012) stabil lipazlar bulunmaktadır.

3.3.5. Çeşitli alkollerin LipS350-2'nin aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi

Çeşitli alkollerin (etanol, metanol ve izopropanol) enzim aktivitesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Enzim aktivitesi pH 9.0'da 40 °C'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kontrolde elde edilen değerler % 100 olarak kabul edilip diğerleri

kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.9.).

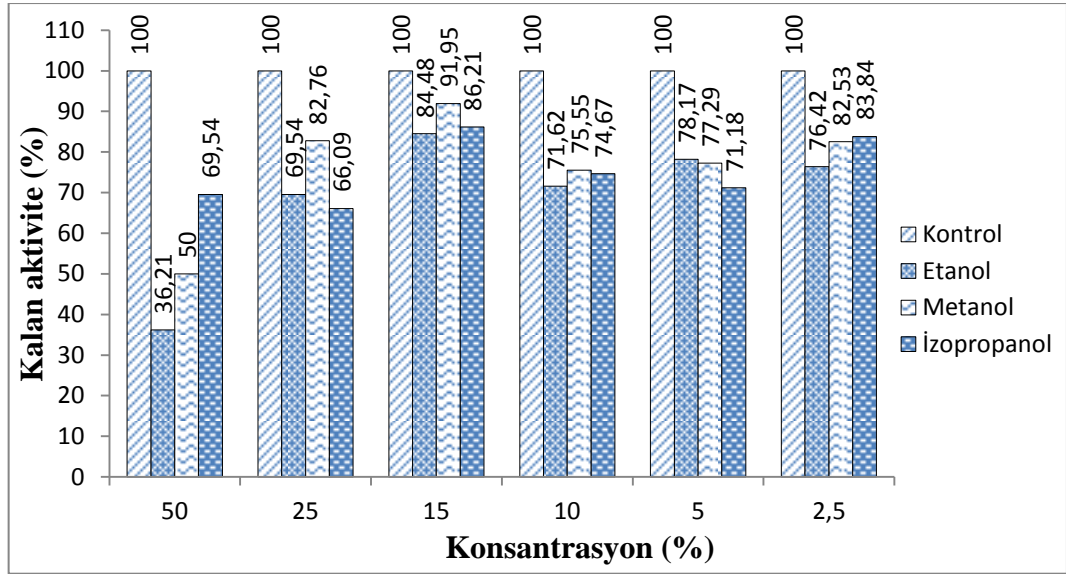


Şekil 3.9. LipS350-2'nin çeşitli alkollerin varlığında kalan aktivite değerleri

Elde edilen sonuçlarda LipS350-2'nin aktivitesinin, 1. ve 24. saatte etanol varlığında metanol ve izopropanole göre daha stabil kaldığı belirlenmiştir.

3.3.6. Alkollerin çeşitli konsantrasyonlarının lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi

Alkollerin çeşitli konsantrasyonlarının LipS350-2'nin aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla enzim % 2,5, 5, 10, 15, 25, 50'lik konsantrasyonlarda alkol ile karıştırılıp 30 °C sıcaklıkta 130 rpm'de 1 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Enzim aktivitesi pH 9.0'da 40 °C'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kontrolden elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.10.).

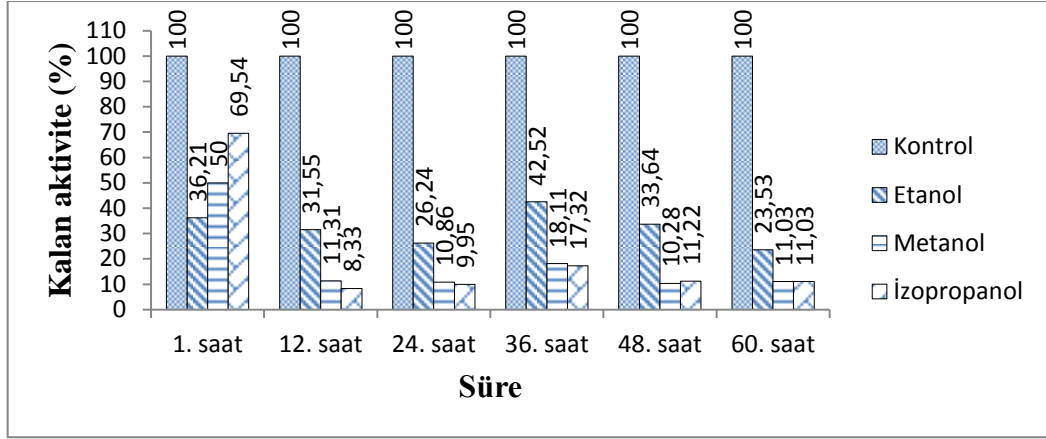


Şekil 3.10. LipS350-2'nin alkollerin çeşitli konsantrasyonlarında kalan aktivite değerleri

Yapılan çalışma sonucu LipS350-2'nin aktivitesinin alkol konsantrasyonunun artışı ile azaldığı görülmüştür. Tüm alkoller için en iyi aktivite % 15' lik konsantrasyonda belirlenmiştir. % 10, %5, %2.5'luk konsantrasyonlarda enzim aktivitelerinin büyük oranda stabil kaldığı gözlenmiştir.

3.3.7. Alkollerin çeşitli ön inkübasyon sürelerinde lipaz aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi

LipS350-2, % 50'lik konsantrasyonlarda alkoller ile karıştırılarak 30 °C sıcaklıkta 130 rpm'de 1, 12, 24, 36, 48, 60 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Enzim aktivitesi pH 9.0'da 40 °C'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kontrolde elde edilen değerler % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. LipS350-2'nin alkollerin çeşitli ön inkübasyon sürelerinde kalan aktivite değerleri

LipS350-2'nin alkollerle ön inkübasyonları sonucunda etanol varlığındaki kalan aktivitesinin 60. saate kadar genel olarak stabil kaldığı, diğer alkollerin varlığında aktivitenin zamana bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

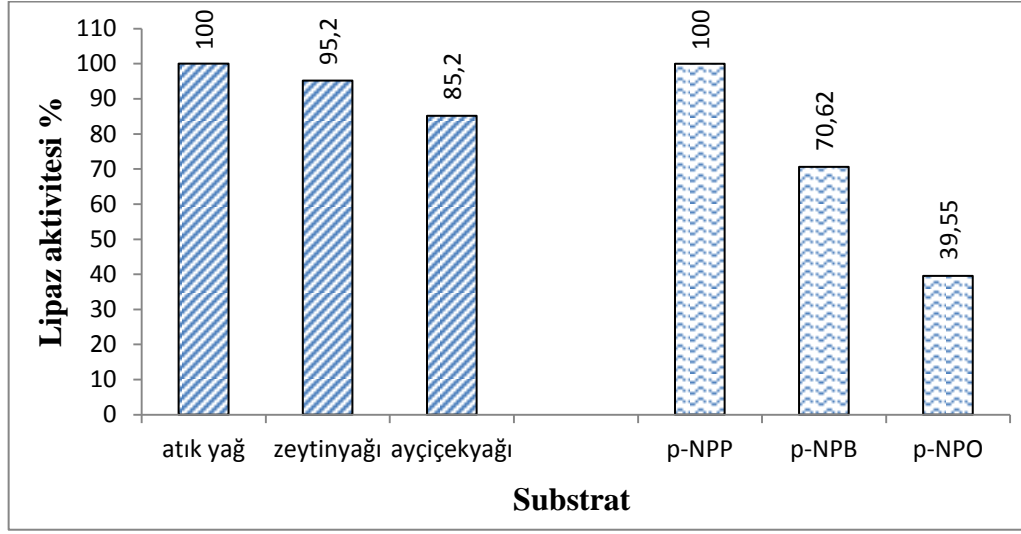
Yapılan çalışmalarda bazı lipazlar üzerinde izopropanolün (Castro-Ochoa vd., 2005; Gaur vd., 2008; Zhang vd., 2009; Karadzic vd., 2006; Ruchi vd., 2008; Wang vd., 2009; Cadirci ve Yasa, 2010) metanolün (Castro-Ochoa vd., 2005; Gaur vd., 2008; Zhang vd., 2009; Karadzic vd., 2006; Cadirci ve Yasa, 2010) ve etanolün (Lescic vd., 2001; Castro-Ochoa vd., 2005; Karadzic vd., 2006; Gaur vd., 2008) önemli ölçüde inhibisyon oluşturduğu görülmüştür.

3.3.8. LipS350-2'nin substrat spesifitesinin belirlenmesi

Çeşitli yağ asidi zincir uzunluklarına sahip doğal (zeytinyağı, ayçiçeği yağı ve atık yağ) ve sentetik substratlar (*p*-NPP, *p*-NPB ve *p*-NPO) enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. LipS350-2'nin *p*-nitrofenil esterlerine karşı spesifitesinin belirlenmesinde pH 9.0'da 40 °C'de spektrofotometrik, doğal substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesinde ise titrimetrik metot kullanılmıştır.

Enzimin en yüksek spesifiteyi doğal substratlardan atık yağ, sentetik substratlardan *p*-NPP'ye karşı gösterdiği tespit edilmiş % 100 olarak alınmıştır. LipS350-2'nin aktivitesi zeytinyağında % 95.2, ayçiçeği yağında % 85.2 olarak, *p*-NPB'de % 70.62, *p*-NPO'da % 39.55 olarak ölçülmüştür (Şekil 3. 12.). Lipazın atık yağlar üzerinde

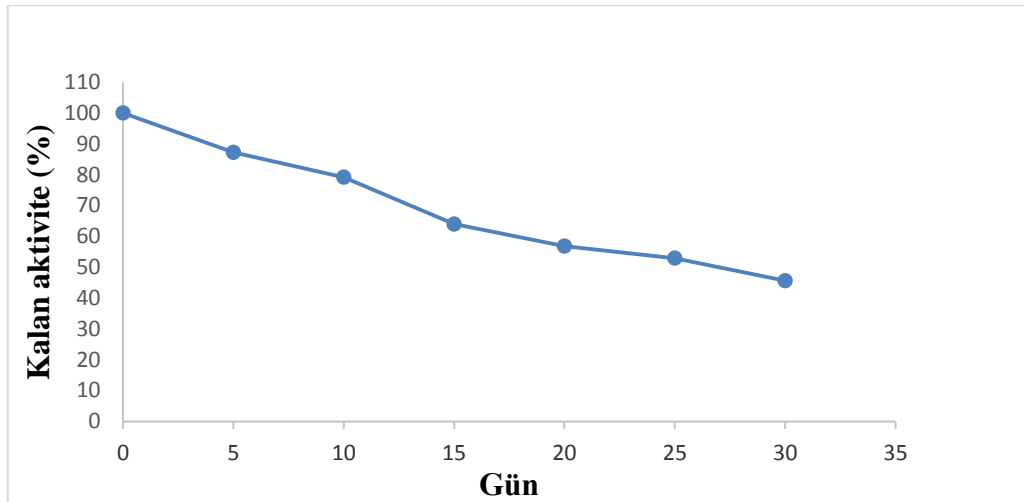
yüksek spesifite göstermesi bu enzimin özellikle atık yağlardan biyodizel üretiminde etkili ve verimli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 3.12. LipS350-2'nin substrat spesifitesi

3.3.9. LipS350-2'nin depolanma stabilitesinin belirlenmesi

LipS350-2'nin +4 °C'deki depolanma stabilitesi belirlenmiştir. Enzim aktivitesi pH 9.0'da 40 °C'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 0. gündeki aktivite % 100 olarak kabul edilmiş ve 5., 10., 15., 20., 25., 30., günlerdeki aktiviteler bu değere kıyaslanarak kalan aktivite değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. LipS350-2'nin +4 °C'deki depolama stabilitesi

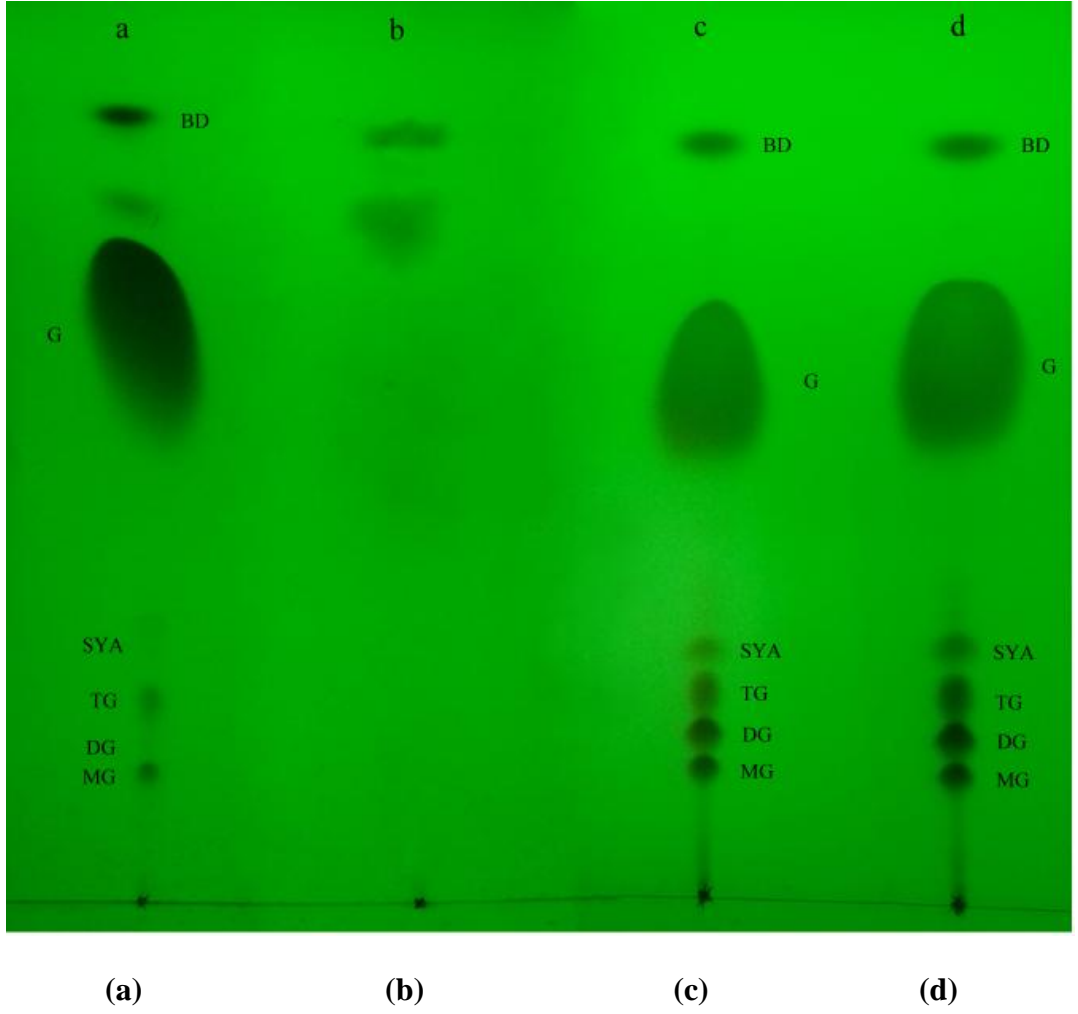
Çalışma sonucunda LipS350-2'nin aktivitesinin +4 °C'de zamana bağlı olarak, kısmi olarak azaldığı belirlenmiştir. 30. gün sonunda enzim aktivitesini %50 civarında koruduğu tespit edilmiştir.

Streptomyces lipazları ile yapılmış karakterizasyon çalışmaları incelendiğinde bu enzimlerin aktivite gösterdiği ve stabil kaldığı koşulların farklı olduğu görülmektedir (Sommer vd., 1997; Large vd., 1999; Vujaklija vd., 2003; Aly vd., 2012; Mander vd., 2012). Enzimlerin sahip olduğu aktivite ve stabilite değerleri endüstriyel kullanım alanlarının belirlenmesinde yol gösterici olmaktadır. Özellikle geniş pH ve sıcaklık aralıklarında aktif ve stabil olan, geniş substrat spesifitesine sahip ve alkollerin varlığında stabil kalabilen enzimler biyodizel uygulamalarında önemli avantajlara sahiptirler. LipS350-2'nin de geniş pH ve sıcaklık değerlerinde stabilitesini koruması ve alkollerin varlığında stabil kalabilmesi nedeniyle biyodizel üretiminde kullanılabilir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

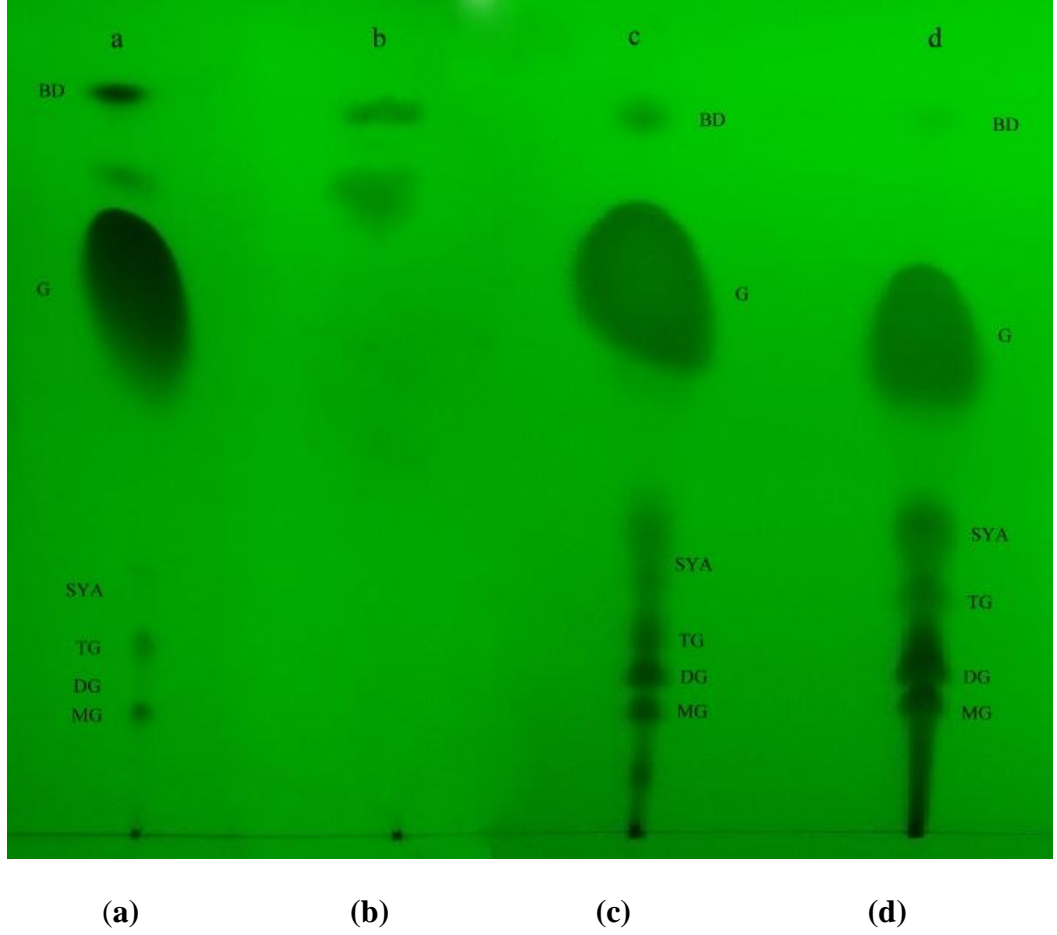
3.4. LipS350-2'nin biyodizel üretim kapasitesinin ve endüstriyel uygulanabilirliğinin belirlenmesi, reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile analizi

LipS350-2'nin transesterifikasyon kapasitesinin kalitatif olarak belirlenmesi ile biyodizel üretiminde kullanılabilirliği belirlenmiştir. Biyodizel üretim reaksiyonu ilk olarak zeytinyağı ile metanol ve etanol varlığında, 40 °C'de, 200 rpm'de 48 saatte gerçekleştirilmiştir. Standart olarak metil oleat, pozitif kontrol olarak biyodizel üretiminde endüstriyel olarak kullanılan Novozym 435 (*Candida antarctica* lipaz B) kullanılmıştır (Şekil 3.14.).

Biyodizel reaksiyonu ayrıca ayçiçek yağı ve atık yağlarla da gerçekleştirilmiş ve TLC sonuçları Şekil 3.15.'de verilmiştir.



Şekil 3.14. Zeytinyağı ile yapılan biyodizel reaksiyonunda reaksiyon ürünlerinin TLC ile analizi
(a): Pozitif Kontrol (Novozym 435), (b): Standart (Metil oleat), (c): zeytinyağı (metanol),
(d): zeytinyağı (etanol), BD: Biyodizel, G: Gliserol, SYA: Serbest Yağ Asidi, TG:
Trigliserit, DG: Digliserit, MG: Monogliserit



Şekil 3.15. Ayçiçek yağı ve atık yağ ile yapılan biyodizel reaksiyonunda reaksiyon ürünlerinin TLC ile analizi (a): Pozitif Kontrol (Novozym 435), (b): Standart (Metil oleat), (c): Ayçiçek yağı, (d): Atık yağ, BD: Biyodizel, G: Gliserol, SYA: Serbest Yağ Asidi, TG: Trigliserit, DG: Diğliserit, MG: Monogliserit

Zeytinyağı ile gerçekleştirilen reaksiyonun TLC'de elde edilen kalitatif biyodizel sonuçlarına bakıldığında, LipS350-2 tarafından üretilen metil ester bandının metil oleat standardına ve Novozym 435 tarafından üretilen metil ester bandına benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında LipS350-2'nin biyodizel üretiminde etkili ve verimli bir şekilde kullanılabilceği ve elde edilecek biyodizelin metil oleat standardına yakın kalitede olduğu öngörülmektedir. Aynı reaksiyonun ayçiçek yağı ve atık yağda da zeytinyağına yakın bir verimde gerçekleşmiş olması bu enzimin özellikle atık yağlardan biyodizel üretiminde etkili ve verimli bir şekilde kullanılabilceğini göstermektedir. Yapılacak ileri analizlerle biyodizel üretimi kantitatif olarak belirlenebilmesi mümkün olacaktır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünyada enerji gereksiniminin % 80'i kömür, petrol ve doğalgaz gibi fosil kaynaklı yakıtlarla karşılanmaktadır. Fosil yakıtların dünyada bilinen rezerv dağılımları; % 68 kömür, %18 petrol ve %14 doğalgaz olarak bilinmektedir. Yapılan araştırmalara göre: petrolün 41, doğalgazın 62, kömürün ise önümüzdeki 218 yıl içinde tükeneceği belirlenmiştir. Günümüzde artan petrol kullanımının yanı sıra petrol kaynaklarının azalması, pazardaki değişkenlik ve ham petrole ulaşılabilirliğin sınırlı olması, petrol kökenli yakıtların ciddi boyutlarda hava kirliliğine neden olması alternatif kaynaklara olan talebi arttırmaktadır.

Çevre dostu ya da yeşil enerji türleri olarak adlandırdığımız enerji kaynakları geleceğin enerji kaynakları olarak ortaya çıkmaktadır. Günümüzde benzin ve dizel yakıtına alternatif yakıtlar etanol ve biyodizeldir.

Bu tez çalışmasında, biyodizel için kullanılabilir üstün özelliklere sahip yeni bir lipaz enziminin elde edilmesi hedeflenmiştir. Öncü çalışmalar sonucunda yüksek lipaz aktivitesi gösteren *S. lienomycini* 350-2 suşu tarafından üretilen lipaz kısmi olarak saflaştırılmış ve biyodizel için gerekli özellikleri açısından karakterize edilmiştir. Elde edilen lipazın transesterifikasyon kapasitesi kalitatif olarak belirlenerek biyodizel üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

LipS350-2 amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon ve jel filtrasyon kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Çeşitli saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlarda protein miktarı, Bradford Protein Tayin Yöntemi'ne göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Jel filtrasyon kromatografisi sonrası enzimin spesifik aktivitesi 1466,8 U/mg, saflaştırma verimi % 1,170 ve saflaştırma katsayısı 1,56 olarak hesaplanmıştır.

Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiş ve saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı 52 kDa olarak hesaplanmıştır.

Saflaştırılan enzim biyodizel üretimi için gerekli olan parametreler yönüyle karakterize edilmiştir. Lipazın optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Ardından pH ve sıcaklık stabiliteleri, çeşitli alkollerin varlığındaki stabiliteleri, farklı alkollerin farklı konsantrasyonları ve farklı ön inkübasyon süreleri kullanılarak tespit edilmiştir. Enzimin ayrıca substrat spesifitesi ve depolama stabilitesi belirlenmiştir.

Enzimin optimum pH değeri 9.0 ve optimum sıcaklık değeri 40 °C olarak belirlenmiştir. Enzimin nötral ve alkali pH değerlerinde stabil olduğu saptanmıştır. Enzim 1. ve 2. saatin sonunda aktivitesini büyük oranda korumuştur. Maksimum stabilite pH 7.0-11.0 aralığında belirlenmiştir. LipS350-2'nin 1. ve 2. saat sonunda 4-40 °C aralığında aktivitesinin tamamını, 50 °C'de % 80 oranında koruduğu, 60-70 °C'de ise tamamen inhibe olduğu görülmüştür.

1. saat'in sonunda enzimin stabilitesi metanol ve izopropanolde etanole göre daha yüksek olmasına rağmen 24. saatte en yüksek stabilite etanol varlığında görülmüştür.

Enzimin stabilitesi üzerine alkollerin % 2.5, 5, 10, 15, 25, 50'lik konsantrasyonlarının etkisi incelendiğinde % 10, %5, % 2.5 konsantrasyonlarda enzim aktivitelerinin yüksek oranda stabil kaldığı gözlenmiştir. Tüm alkoller için en iyi aktivite % 15'lik konsantrasyonda belirlenmiştir.

Enzim alkoller ile 1, 12, 24, 36, 48, 60 saat ön inkübasyona tabi tutulmuş ve enzimin etanol varlığında 60. saate kadar yüksek oranda stabil kaldığı, diğer alkollerin varlığında aktivitenin zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür.

LipS350-2'nin atık yağlar üzerinde yüksek spesifite gösterdiği belirlenmiştir. LipS350-2'nin depolanma stabilitesi incelendiğinde enzimin +4 °C'de 30. gün sonunda aktivitesini % 50 civarında koruduğu tespit edilmiştir.

Ardından saflaştırılan enzimin transesterifikasyon kapasitesi belirlenerek biyodizel üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Biyodizel üretiminde endüstriyel olarak kullanılan Novozym 435 (*Candida antarctica* lipaz B) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Reaksiyon sonunda biyodizel üretimi kalitatif olarak TLC ile belirlenmiştir.

Biyodizel reaksiyonu zeytinyağı, ayçiçek yağı ve atık yağ kullanılarak gerçekleştirilmiş ve biyodizel elde edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; biyodizel üretiminde kullanılabilcek nitelikte yeni bir lipaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Geniş pH ve sıcaklık değerlerinde stabilitesini koruyan, alkollerin varlığında stabil kalabilen LipS350-2'nin biyodizel üretiminde kullanılabilcek potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle atık yağ ile gerçekleştirilen reaksiyonda biyodizel üretiminin sağlanması bu enzimin atık yağlardan biyodizel üretiminde kullanılabilirliğini göstermektedir.

LipS350-2'nin atık yağlardan biyodizel üretiminde etkili ve verimli bir şekilde kullanılması ile hem atık yağlar etkili bir şekilde değerlendirilebileceği hem de düşük maliyetli biyodizel üretiminin gerçekleştirilebileceği sonucuna varılmıştır.

lke ekonomisi için son derece önemli olan ve enerji ihtiyacında yurt dışına bağımlılığı önemli oranda azaltacak olan biyodizel üretiminin artırılması, kimyasal yöntemlerle biyodizel üretiminden kaynaklı çevresel sorunların önlenmesi büyük oranda enzimatik transesterifikasyonla mümkün olacaktır. Biyodizel üretiminde etkin ve verimli olarak kullanılabilcek ideal bir lipaz enzimi ülke ekonomisine büyük oranda katkıda bulunacaktır. Bu enzimatik transesterifikasyonda atık yağların kullanılması halinde hem atık yağların neden olduğu çevresel sorunlar büyük oranda giderilecek hem de ülke ekonomisine kazanç sağlanacaktır. Çalışmada elde edilen sonuçların biyodizel endüstrisine aktarılması ile ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlayacaktır. Enzimin atık yağların transesterifikasyonunda kullanılabilir olması ucuz hammadde ile biyodizel üretimini mümkün kılacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y.A., Soliman, N.A., Yousef, S.M. ve El-Helow, E.R. (2012) Application of experimental designs to optimize medium composition for production of thermostable lipase/esterase by *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1, *J. of Gen. Eng. and Biotech.*, 10: 193-200.
- Abdulla, R. ve Ravindra, P. (2013) Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix, *J. of the Taiwan Inst. of Chem. Eng.*, 44: 545-551.
- Abdullah, A.Z., Razali, N., Mootabadi, H. ve Salamatinia, B. (2007) Critical technical areas for future improvement in biodiesel technologies, *Environ. Res. Lett.*, 2, 034001.
- Abigor, R.D., Uadia, P.O., Foglia, T.A., Haas, K.C., Okpefa, J.E. ve Obibuzor, J.U. (2000) Lipasecatalyzed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils, *Biochem. Soc Trans*, 28: 979-81.
- Abo, M. (1990) Method of purifying dry-cleaning solvent by decomposing liquid contaminants with a lipase, *World Org. Patent*, 9,007,606.
- Abramic, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W. ve Pigac, J. (1999) Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*, *Enzyme and Microb. Technol.*, 25: 522-529.
- Adlercreutz, D., Budde, H. ve Wehtje, E. (2002) Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction, *Biotech. And Bioeng.*, 78 (4): 403-411.
- Ahmed, E.H., Raghavendra, T. ve Madamwar, D. (2010) An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis, *Biores. Tech.*, 101: 3628-3634.

- Alatossava, M. ve Alatossava, T. (2006) Phenotypic characterization of raw milk associated psychrotrophic bacteria, *Microb. Res.*, 161 (4): 334-346.
- Alberghina, L., Schmid, R.D., ve Verger, R. editorler (1991) *Lipases: structure, mechanism and genetic engineering: Contributions to the CEC-GBF Int. Workshop*, Braunschweig, Germany, 440s.
- Alptekin, E. ve Çanakçı, M. (2006) Biyodizel ve Türkiye'deki durumu, *Müh. ve Mak.*, 47 (561): 57-64.
- Aly, M.M., Tork, S., Al-Garni, S.M. ve Nawar, L. (2012) Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil, *African J. of Microb. Research*, 6(6): 1125-1137.
- Anguita, J., Rodriguez-Aparicio, L.B. ve Naharro, G. (1993) Purification, gene cloning, amino acid sequencing analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate, *Appl. Environ. Microb.*, 59: 2411-2417.
- Annapurna, K., Paramita, M., Vijay, G.K. ve Rintu, B. (2009) Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil, *Biotechnology for Biofuels*, 2, 1.
- Anonim, (1992) Enzyme Nomenclature, Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB), California.
- Anzai, K., Nakashima, T., Kuwahara, N., Suzuki, R., Ohfuku, Y., Takeshita, S. ve Ando, K. (2008) Actinomycetebacteria isolated from the sediments at coastal and off shore area of nagasaki prefecture, Japen: Diversity and biological activity, *J. of Bios. and bioeng.*, 106 (2): 215-217.
- Atadashi, I.M., Aroua, M.K. ve Aziz, A.A. (2011) Biodiesel separation and purification: A review, *Renewable Energy*, 36: 437-443.
- Ateslier, Z.B.B. ve Metin, K. (2006) Production, and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus sp.*, *Enzy. and Microb. Tech.*, 38: 628-635.

- Ayala, J. C., Pimienta, E., Rodríguez, C., Anne, J., Vallin, C., Milanés, M. T., King-Batsios, E., Huygen, K. ve Mellaert, L.V. (2013) Use of Strep-tag II for rapid detection and purification of *Mycobacterium tuberculosis* recombinant antigens secreted by *Streptomyces lividans*, *J. of Microb. Meth.*, 94: 192-198.
- Ayaz, B. (2011) *Streptomisetlerde Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla SK Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Aybastier, Ö. (2010) *Bitkisel Atık Yağların Karakterizasyonu ve Biyodizel Üretiminde Değerlendirilmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Azcan, N. ve Danisman, A. (2007) Alkali catalyzed transesterification of cottonseed oil by microwave irradiation, *Fuel*, 86: 2639-2644.
- Babu, I.S. ve Rao, G.H. (2007) Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM35989, *Res. J. Microbiol.*, 2: 88-93.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P.N. ve Mehrota, R. (2010) Biodisel production through lipase catalyzed transesterification: an overview, *J. Mol. Catal. B Enzyme*, 62, (1): 9-14.
- Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A. ve Fukuda, H. (2001) Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles, *Biochem Eng J*, 8: 39-43.
- Banos, R., Agugliaro, F.M., Montoya, F.G., Gil, C., Alcayde, A. ve Gomez, J. (2011) Optimization methods applied to renewable and sustainable energy: A review, *Renewab. and Sustainab. Energy Rev*, 15: 1753-1766.
- Baral, A. ve Fox, P.F. (1997) Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas tolaasii*, *Food Chem.*, 58, (1-2): 33-38.
- Basım, P. (2009) Fruktoz-Stearatin T-Butanol: DMSO Çözücü karışımı ve iyonik sıvılarda lipaz katalizli sentezi. (Yüksek lisans tezi) Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Basilio, A., Gonzalez, Vicente, M. F., Gorrochategui, J., Cabello, A. ve Gonzalez, A. (2003) Patterns of antimicrobial activities from soil Actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity, *J. Appl Mikrobiol.*, 95: 814-823.
- Bautista, L.F., Vicente, G., Rodriguez, R. ve Pacheco, M. (2009) Optimization of fame production from waste cooking oil for biodiesel use, *Biomass and Bioener.*, 33: 862-872.
- Bayramoğlu, G., Hazer, B., Altıntaş, B. ve Arıca, M.Y. (2011) Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor synthesis, *Proc. Biochem.*, 46 (1): 372-378.
- Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C. ve Verger, R. (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 133-153.
- Bhardwaj, K., Raju, A. Ve Rajasekharan, R. (2001) Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran. *Plant Physiol.*, 127: 1728-1738.
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E. ve Kirk, O. (1991) The future impact of industrial lipases, *Trends Biotechnol.*, 9: 360-363.
- Boehman, L.A. (2005) Biodiesel Production and Processing, *Fuel Proc. Tech.*, 86: 1057-1058.
- Bora, L. ve Kalita, M.C. (2007) Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus sp.*LBN4, *Inter. J. Microbiol.*, 4 (1): 1-12.
- Boran, R. ve Ugur, A. (2010) Partial Prufication and Characterization of the Organic Solvent-Tolerant Lipase Produced by *Pseudomonas fluorescens* RB02-3 isolated from Milk, *Praparar. Biochem. and Biotech.*, 40 (4): 229-241.
- Bornscheuer, U.T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis, *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 73-81.

- Schwaneberg, U. ve Bornscheuer, U.T. (2000) *Fatty acid hydroxylations using P450 monooxygenases*, in: *Enzymes in Lipid Modification*, Bornscheuer, U.T. Editör, Weinheim, Wiley-VCH, 414s.
- Bose, A. Ve Keharia, H. (2013) Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2, *Biocatal. and Agricul. Biotech.*, 2: 255-266.
- Bouaziz, A., Horchani, H., Salem, N.B., Gargouri, Y. ve Sayari, A. (2011) Expression, purification of a novel alkaline *Staphylococcus xylosus* lipase acting at high temperature, *Biochem Eng. J.*, 54: 93-102.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Braun, P., Ockhuijsen, C., Eppens, E., Koster, M., Bitter, W. Ve Tommassen, J. (2001) Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, *J Biol Chem.*, 276: 26030-26035.
- Büyükmıhçı, M.K. (2003) Yenilenebilir Enerji Kaynakları Avrupa Birliği Ülkelerindeki Uygulamalar ve Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, TMMOB, 3-4 Ekim Kayseri, 15-22.
- Cadirci, B.H., Yasa, I. (2010) An organic solvent tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 64 (3-4): 155-161.
- Cai, Y.J., Wang, L., Liao, X.R., Ding, Y.R. ve Sun, J. (2009) Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum sp.* SYBC WU-3, *Proc. Biochem.*, 44: 786-790.
- Canakci, M. ve Van Gerpen, J. (2001) Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids, *Transactions of the ASAE*, 44: 1429-36.

- Cao, Y., Zhuang, Y., Yao, C., Wu, B. ve He, B. (2013) Purification and characterization of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 and its application for efficient resolution of (R, S)-1-phenylethanol, *Biochem. Eng. J.*, 64: 55-60.
- Cardenas, F., de Castro, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V, Valmaseda, M., Elson, S.W. ve Alvarez, E. (2001) Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, 28: 145-154.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodriguez-Gomez, C., Valerio-Alfaro, G. ve Ros, R.O. (2005) Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11, *Enzyme and Microb. Technol.*, 37: 648-654.
- Cavalcanti-oliveira, E.D., Silva P.R., Ramos A.P., Aranda D.A.G. ve Freire D.M.G. (2011) Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification, *Enzyme Res.*, 618692: 1-8.
- Ce'sar A.S. (2012) The competitiveness of the biodiesel production in Brazil: a comparative analysis of castor, palm and soy, Ph. D. Thesis, Department of Management Engineering, Federal University of Sao Carlos, Sao Carlos, In Portuguese.
- Charpe, T.W. ve Rathod, V.K. (2011) Biodiesel production using waste frying oil, *Waste Manag.* 31: 85-90.
- Chen, J.Y., Wen, C.M. ve Chen, T.L. (1999) Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radoresistens*. *Biotech. Bioeng.*, 62: 311-316.
- Chhetri, A.B., Watts, K.C. ve Islam, M.R. (2008) Waste Cooking Oil as an Alternate Feedstock for Biodiesel Production, *Energ.*, 1: 3-18.
- Chi, W., Lim, J.H., Park, D.Y., Park, J.S. ve Hong, S. (2013) Production and characterization of a thermostable endo-type produced by a newly-isolated *S. thermocarboxydus* subspecies strain from Jeju Island, *Proc. Biochem.*, 48: 1736-1743.

- Chowdury, J. ve Fouky, K. (1993) Vegetable oils: from tablet o gas tank. *Chemical Eng.*, 100: 35-9.
- Christen, G.L. ve Marshall, R.T. (1984) Thermostability of selected lipase produced by psychrotrophic bacteria, *J. Dairy Sci.*, 63 (Suppl. 1): 46.
- Converse, C.A., Cooper, A.ve Nutley, M.A. (1981) A radial-diffusion assay for serum lipase, *Biochem. Soc. Trans.*,9: 320-321.
- Copeland, R.A. (2000) *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis (2nd Ed.)*, Wiley-VCH, New York.
- Cortez, J., Mangiapane, H., Cortez, L. ve Griffin, M. (1999) Application of Enzyme Technology in the Textile Industry, *The Nottingham Trent Univ.*, ISBN 0–905488–45–8.
- Cote, A. ve Shareck, F. (2008) Cloning, purification and characterization of two lipases from *S. coelicolor* A3 (2), *Enzyme and Microb. Tech.*, 1-27.
- Crookes, R.J., Kiannejed , F. ve Nazha, M.A.A. (1997) Systematic assessment of combustion characteristics of biofuels and emulsions with water for us as diesel engine fuels, *Energy Conver. and Manag.*, 38 (6):1785-1795.
- Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H. ve Madamwar, D. (2009) Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis, *Biores. Technol.*, 100: 3374-3381.
- Dati, F. ve Grenner, G. (1984) A new approach to the diagnosis of pancreatic diseases by immunochemical lipase quantitation, *La Ricerca In Clinica e In Lab.*, 14 (3): 399-407.
- Deeth, H.C. ve Touch, V. (2000) Methods for detecting lipase activity in milk and milk products, *Aust. J. of Dairy Tech.*, 55: 153-168.
- Degrassi, G., Uotila, L., Klima, R. ve Venturi, V. (1999) Purification and Properties of an Esterase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Identification of the Encoding Gene. *Appl. Environ. Microb.*, 65: 3470-3472.

- Demir, B.S. ve Tükel, S.S. (2010) Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 64 (3-4): 123-128.
- Demirbas, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 33 (1): 1-18.
- Demirbaş, A. (2005) Biodiesel production from vegetable oils v,a catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods, *Prog. in Energy and Combust. Sci.*, 31: 466-487.
- Dharmsthiti, S. ve Luchai, S. (1999) Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus sp.* THL027. *FEMS Microb. Lett.*, 179: 241-246.
- Dogan, B. ve Boor, K.J. (2003) Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants, *Appl. And Envir. Microb.*,130-138.
- Doğan, M. (2001) Sanayileşme ve Çevre Sorunları, Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, TMMOB, 12-13 Ekim 2001, Kayseri, 245-251.
- Dong, H., Gao, S., Han, S. ve Cao, S. (1999) Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and properties in non-aqueous media, *Biotech. Appl. Biochem.*, 30: 251-256.
- Du, W., Li, W., Sun, T., Chen, X. ve Liu, D. (2008) Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts, *Appl. Microb. Biotech.*, 79 (3): 331-7.
- Dutta, S. ve Ray, L. (2009) Production and Characterization of an Alkaline Thermostable Crude Lipase from an Isolated Strain of *Bacillus cereus* C7. *Appl. Biochem. Biotech.*, 159: 142-154.
- Ebrahimpour, A., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M. ve Salleh, A.B. (2011) High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus sp.* strain ARM, *Bioresour. Tech.* 102: 6972-6981.

- Eggersdorfer, M., Meyer, J. ve Eckes, P. (1992) Use of renewable resources for non-food materials, *FEMS Microb. Rev.*, 103: 355-64.
- El Khattabi, M., van Gelder, P., Bitter, W. ve Tommassen, J.(2000) Role of the lipase specific foldase of *Burkholderia glumae* as a stearic chaperone, *J. Biol. Chem.*, 275: 26885-26891.
- El-Sawah, M.M.A., Sherief, A. A., Bayoumy, S. M., 1995. Enzymatic properties of lipase and characteristic production by *Lactobacillus delbrueckii* sub species *bulgaricus*, *Antonie von Leeuwenhoek*, 67: 356-362.
- Emanuilova, E., Kambourova, M., Dekovska, M. ve Manolov, R. (1993) Thermoalkalophilic lipase-producing *Bacillus* selected by continuous cultivation, *FEMS Microbiol. Lett.*, 108: 247-250.
- Ertuğrul, S., Döñez, G. ve Takaç, S. (2007) Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity, *J. Hazard. Mat.*, 149 (3): 720-724.
- Faber, K. (1997) *Biotransformations in Organic Chemistry*, third ed. Springer-Verlag, New York.
- Falconer, C. (1988) *The isolation, physiology and taxonomy of carboxydrotropic Actinomycetes*, Ph. D Thesis, University of Newcastle upon Tyne, UK.
- Fjerbaek, L., Christensen, K.V. ve Norddahl, B. (2009) A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification, *Biotech. Bioeng.*, 102 (5): 1298-1315.
- Fodil, D., Badis, A., Jaouadi, B., Zarai, N., Ferradji, F.Z. Ve Boutoumi, H. (2011) Purification and characterization of two extracellular peroxidases from *Streptomyces* sp. strain AM2, a decolorizing actinomycetes responsible for the biodegradation of natural humic acids, *Int. Biodeter. & Biodegra.*, 65: 470-478.
- Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., Nadia, J.Z., Ferradji, F.Z., Bejar, S. ve Boutoumi, H. (2012) A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. strain AH4: Purification and biochemical characterization, *Bioresour. Tech.*, 111: 383-390.

- Freedman, B., Pryde, E.H. ve Mounts T.L. (1984) Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils, *JAOCS*, 61 (10): 1638-43.
- Fukuda, H., Kondo, A. ve Noda, H. (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils, *J. Biosci. Bioeng.*, 92: 405-16.
- Gandolfi, R., Marinelli, F., Lazzarini, A. ve Molinari, F. (2000) Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities, *J. Appl. Microbiol.*, 89: 870-875.
- Gao, X.G., Cao, S.G., Zhang, K.C. (2000) Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain, *Enzyme and Microb. Tech.*, 27: 74-82.
- Gaur, R., Gupta, A. ve Khare, S.K. (2008) Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA, *Proc. Biochem.*, 43: 1040-1046.
- Geller, H. (2002) *Energy Revolution: Policies for a Sustainable Future*, Island Pres, Washington DC.
- Ghanem, A. ve Aboul-Enein, H.Y. (2004) Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents *Tetrahedron: Asymmetry*, 15: 3331-3351.
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P. ve Davidson, S. (1996) Microbial lipases: production and applications, *Scien. progress.*, 79 (2): 119-157.
- Gilham, D. ve Lehner, R. (2005) Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro, *Methods*, 36: 139-147.
- Gill, J. ve Parish, J.H. (1997) Minireview: Lipases-Enzymes at an Interface, *Biochem. Edu.* 25 (1): 2-5.
- Gitlesen, T., Bauer, M. ve Adlercreutz, P. (1997) Adsorption of lipase on polypropylene powder, *Biochim. Biophys Acta*, 1345: 188-196.
- Goodfellow, M. ve Simpson, K.E. (1987) Ecology of streptomycetes, *Frontiers in Appl. Microb.*, 2: 97-125.

- Gowland, P., Kernick, M. ve Sundaram, T.K. (1987) Thermophilic bacterial isolates producing lipase, *FEMS Microb. Let.*, 48 (3): 339-343.
- Grenner, G., Deutsch, G., Schmidtberger, R. ve Dati, F. (1982) Hochempfindlicher Enzym immuno assay zur Bestimmung von Human-Pankreas-Lipase, *J. Of Clinical Chem. And Clinical Biochem.*, 20 (7): 515-519.
- Guilbault, G.G. (1976) *Handbook of Enzym. Meth. of Analysis*, Marcel Dekker, New York.
- Guncheva, M. ve Zhiryakova, D. (2011) Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 68 (1): 1-21.
- Gunstone, F.D. (1999) Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids, *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1535-1549.
- Gupta, N., Rathi, P. ve Gupta, R. (2002) Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases, *Anal. Biochem.*, 311: 98-99.
- Gupta, R., Gupta, N. ve Rathi, P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, *Appl. Microb. Biotech.*, 64: 763-781.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N. ve Bradoo, S. (2003) Lipase assay for conventional and molecular screening: an overview, *Biotech. Appl. Biochem.*, 37: 63-71.
- Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., Freire, D.M.G. ve Castilho, L.R. (2009) Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *P. simplicissimum*, *Biores. Tech.*, 100: 5249-5254.
- Gutierrez, A., del Rio, J.C., Martinez, M.J. ve Martinez, A.T. (2001) The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing, *Trends in Biotech.*, 19 (9): 340-348.
- Haba, E., Bresko, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquets, M. ve Manresa, A. (2000) Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying selective substrate, *Enzyme and Microb. Tech.*, 26: 40-44.

- Haki, G.D. ve Rakshit S.K. (2003) Development in industrially important thermostable enzyme: a review, *Bioresour. Tech.*, 89: 17-34.
- Han, M., Yi, W., Wu, Q. ve Liu, Y. (2009) Yongchun Hong, Dezheng Wang, Preparation of biodiesel from waste oils catalyzed by a Bronsted acidic ionic liquid, *Bioresour. Tech.*, 100: 2308-2310.
- Hasan, F., Shah, A.A. ve Hameed, A. (2005) Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microb. Tech.*, 39: 235-251.
- Heler, L. (2006) US enzyme market poised for continued growth.
- Heravi, K.M., Eftekhari, F., Yakhchali, B. ve Tabandeh, F. (2008) Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus* sp. from soil, *Pak. J. Biol. Sci.*, 11 (5): 740-745.
- Hlimaa, H.B., Ayadia, D., Aghajarib, N. ve Bejara, S. (2013) Differential properties of native and tagged or untagged recombinant glucose isomerases of *Streptomyces* sp. SK and possible implication of the glycosylation, *J. of Mol. Catal. B: Enzym.*, 94: 82- 87.
- Horchani, H., Mosbah, H., Ben Salem, N., Gargouri, Y. ve Sayari, A. (2009) Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 56 (4): 237-245.
- Hossain, A.B.M.S. ve Boyce, A.N. (2009) Biodiesel Production from Waste Sunflower Cooking Oil as an Environmental Recycling Process and Renewable Energy, *Bulg. J. of Agricul. Scie.*, 15: 312-317.
- Hou, C.T. (1994) pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection, *J. Ind. Microbiol.*, 13: 242-248.
- Hou, C.T. (2002) Industrial Uses of Lipase New York, USA, Lipid Biotechnology, 387-394.
- Houde, A., Kademi, A. ve Leblanc, D. (2004) Lipases and their industrial applications, *Appl. Biochem. Biotech.*, 118: 155-170.

http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/Benefits%20of%20Biodiesel.Pdf,
National Biodiesel Board. Benefits of Biodiesel, Erişim tarihi: 31.08.2011.

<http://www.novozymes.com/en/MainStructure/Productfinder/ProductFinder.htm>.
Novozymes, Products & Solutions. 15.11.2010

http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/cf0ed8641cfcbbf_ek.pdf, Türkiye'de Biyodizel
ve Biyoetanol Üretiminin Tarım Sektörü

Hu, J., Du, Z., Li, C. ve Min, E. (2005) Study on the Lubrication Properties of Biodiesel as Fuel Lubricity Enhancers, *Fuel*, 84: 1601-1606.

Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretchmar, M. ve Schafer, W. (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members, *Arch. Microbiol.*, 174: 362-374.

Huggins, C. ve Lapides, J. (1947) Chromogenic Substrates: IV. Acyl Esters of p-Nitrophenol as Substrates for the Colorimetric Determination of Esterase, *J. Biol. Chem.*, 170: 467-482.

Iizumi, T., Nakamura, K. ve Fukase, T. (1990) Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56, *Agric. Biol. Chem.*, 54: 1253-1258.

Jacks, T.J. ve Kircher, H.W. (1967) Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone, *Anal. Biochem.*, 21: 279-284.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. ve Reetz, M.T. (1999) Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases, *Annual Rev. Microb.*, 53 (1): 315-351.

Jaeger, K.E. ve Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology, *Curr. Opin, Biotech.*, 13: 390-7.

Jaeger, K.E. ve Reetz, M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *TIBTECH*, 16: 396-403.

- Jaeger, K.E. ve Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology, *Curr. Opinion in Biotech*, 13: 390-397.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. ve Misset, O. (1994) Bacterial lipases, *FEMS Microb. Rev.*, 15: 29-63.
- Jennings, B.H. ve Akoh, C.C. (2000) Lipase-catalyzed modification of rice bran oil to incorporate capric acid, *J. of Agricul. and Food Chem*, 48 (9): 4439-4443.
- Jensen, R.G., deJong, F.A. ve Clark, R.M. (1983) Determination of lipase specificity, *Lipids*, 18 (3): 239-252.
- Jesus, P. C., Rezende, M.C. ve Nascimento, M.G. (1995) Enzymatic resolution of alcohols via lipases immobilized in microemulsion-based gels, *Tetrahedron Asymm.*, 6: 63-66.
- Jiang, X., Chen, D., Chen, L., Yang, G. ve Zou, S. (2012) Purification, characterization, and action mode of a chitosanase from *Streptomyces roseolus* induced by chitin, *Carbohyd. Res.*, 355: 40-44.
- Jin G. ve Bierma T.J. (2010) Whole-cell Biocatalysts for Producing Biodiesel from Waste Greases, ISTC Reports, Illinois.
- Jinwal, U.K., Roy, U., Chowdhury, A.R., Bhaduri, A.P. ve Roy, P.K. (2003) Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from a Newly Isolate *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and Chemoselective Hydrolysis of Fatty Acid Ester, *Bioorg. & Medic. Chem*, 11: 1041-1046.
- Joshi, C. ve Khare, S.K. (2012) Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled Jatropha seed cake, *Biocatal. and Agricul. Biotech.*, 2: 32-37.
- Jürgens, D., Huser, H., Brunner, H. ve Fehrenbach, F.J. (1981) Purification and characterization of *S. aureus* lipase, *FEMS Microbiol. Lett.*, 12: 195-199.
- Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. ve Baratti, J.C. (2000) Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*, *Appl. Microbiol. and Biotech.*, 54: 173-179.

- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E. ve Fukuda, H. (1999) Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *R. oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent, *J. Biosci. Bioeng.*, 88 (6): 627-31.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R. ve Derekova, A. (2003) Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 22: 307-313.
- Kamini N.R.ve Lefuji H. (2001) Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus spp. S-2*. *Proc. Biochem*, 37, 405-/10.
- Kandasamy, R., Kennedy, L.J., Vidya, C., Boopathy, R. ve Sekaran, G. (2010) Immobilization of acidic lipase derived from *P. gessardii* onto mesoporous activated carbon of olive oil, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 62: 59-66.
- Kanwar, S.S., Ghazi, I.A., Chimni, S.S., Joshi, G.K., Rao, G.V., Kaushal, R.K., Gupta, R. ve Punj, V. (2006) Purification and properties of thermotolerant metallolipase of *B. coagulans* MTCC-6375 isolate, *Protein Expr. Purif.*, 46: 421-8.
- Kanwar, L. ve Goswami, P. (2002) Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using lipase, *Enzyme Microb. Technol.*, 31: 727-735.
- Kanwar, L., Gogoi, B.K. ve Goswami, P. (2002) Production of a *Pseudomonas* lipase in *n*-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique, *Bioresour. Tech.*, 84: 207–211.
- Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L.I. ve Fujiwara, N. (2006) Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *P. aeruginosa* Isolated from Putrid Mineral Cutting Oil, *J. Biosci. Bioeng.*, 102 (2): 82-89.
- Karaosmanoğlu, F. (2002) Türkiye için Çevre Dostu Yenilenebilir Bir Yakıt Adayı: Biyomotorin, Ekojenerasyon Dünyası- Kojenerasyon Dergisi, ICCI Özel Sayısı, 50-56, İstanbul.
- Kashyap, M.L., Meelies, M.J. Brady, D. Hnd, B.A. ve Robinson, K. (1980) A micromethod using gas-liquid chromatography from measuringin dividual rich lipoprotein lipase, *Anal. Biochem.*, 107 (2): 432-435.

- Kazlauskas, R.J. ve Bornscheuer, U.T. (1998) *Biotransformations with lipases*, Rehm, H.J., Pihler, G., Stadler, A. ve Kelly, P.J.W. editorler. Biotechnology. vol. 8. New York: VCH, 37-192s.
- Khyami-Horani, H. (1996) Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase, *World J. Microb. Biotech.*, 12: 399-401.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, ve Dostbil, N. (2006) Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1).
- Kim, E.K., Jang, W.H., Ko, J.H., Kang, J.S., Noh, M.J. ve Yoo, O.J. (2001) Lipase and Its Modulator from *Pseudomonas* sp. Strain KFCC 10818: Proline-to-Glutamine Substitution at Position 112 Induces Formation of Enzymatically Active Lipase, *J. of Bact.*, 183 (20): 5937-5941.
- Kim, K.R., Kwon, D.Y., Yoon, S.H., Kim, W.Y. ve Kim, K.H. (2004) Purification, refolding and characterization of recombinant *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Protein Expr. Purif.*, 39 (1): 124-129.
- Kim, S.B., Falconer, C., Williams, E. ve Goodfellow, M. (1998) *Streptomyces thermocarboxydivorans* sp. nov. and *S. thermocarxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydrotrophic species from soil, *Int. J. of syst. Bact.*, 49: 1845-1851.
- Kıran, G.S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, R., Arunkumar, M., Thangavelu, T. ve Natarajaseenivasan, K. (2007) Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057), *Bioprocess Biosyst Eng.*, DOI 10. 1007/s00449-007-0186-0.
- Klibanov, A.M. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water?, *Trends Biotech.*, 15: 97-101.
- Klibanov, A.M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, 409: 241-246.
- Knothe, G., Gerpen, J.V. ve Krahl, J. (2005) *The Biodiesel Handbook*, AOCS Press, ABD, 36-50.

- Kobayashi, H. (1989) *Liquid leather cleaners*, Japanese Patent1, 225-700.
- Kojima, Y. ve Shimizu, S. (2003) Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380, *J. Biosci. and Bioeng.*, 96 (3): 219-226.
- Kojima, Y., Yokoe, M. ve Mase, T. (1994) Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 1564-1568.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. ve Schmid, R.D. (1991) Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction Data, *J. Bacteriol.*, 173 (15): 4836-4841.
- Korn-Wendish, F. ve Kutzner, H.J. (1992) *The family Streptomycetaceae. In The Prokaryotes*. Edited by A. Balows, H. G. Trusper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer, 921-995s.
- Kose, O., Tuter, M. ve Aksoy, A.H. (2002) Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium, *Bioresour. Technol.*, 83: 125-129.
- Kouker, G. ve Jaeger, K.E. (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 211-213.
- Kulkarni, N. ve Gadre, R.V. (1999) A novel alkaline, thermostable, protease-free lipase from *Pseudomonas* sp. *Biotech. Letters*, 21: 897-899.
- Kumar, R., Singh, R. ve Kaur, J. (2013) Characterization and molecular modelling of an engineered organicsolvent tolerant, thermostable lipase with enhanced enzyme activity, *J. of Mol. Catal. B: Enzymatic*, 97: 243-251.
- Kumara, L., Singh, B., Adhikari, D.K., Mukherjee, J. ve Ghosh, D. (2012) A thermoalkaliphilic halotolerant esterase from *Rhodococcus* sp. LKE-028 (MTCC 5562): Enzyme purification and characterization, *Proc. Biochem.*, 47: 983-991.

- Kumari, V., Shah, S. ve Gupta, M.N. (2007) Preparation of biodiesel by lipasecatalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*, *Energ. Fuels*, 21 (1) 368-72.
- Kumura, H., Hirose, S., Sakurai, H., Mikawa, K., Tomita, F. ve Shimazaki, K. (1998) Molecular cloning and analysis of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* No. 33., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62: 2233-2235.
- Kurooka, S., Okamoto, S. ve Hashimoto, M. (1977) A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase, *J. Biochem.*, 81: 361-369.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685.
- Lam, M.K., Lee, K.T. ve Mohamed, A.R. (2010a) Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review, *Biotech. Adv.*, 28:500-518.
- Lanz, W.W. ve Williams, P.P. (1973) Characterization of esterases produced by a ruminal bacterium identified as *Butyrivibrio fibrisolvens*, *J. Bacteriol.*, 113: 1170-1176.
- Large, K.P., Mirjalili, N., Osborne, M., Peacock, L.M., Zormpaidis, V., Walsh, M., Cavanagh, M. E., Leadlay, P.F. ve Ison, A.P. (1999) Lipase activity in *Streptomyces*, *Enzyme and Microb. Tech.*, 25: 569-575.
- Laszloa, J.A., Jacksona, M. ve Blanco, R.M. (2011) Active-site titration analysis of surface influences on immobilized *Candida antarctica* lipase B activity, *J. of Mol. Catal. B: Enzym.*, 69: 60-65.
- Lawrence, R.C., Frayer, T.F. ve Reiter, B. (1967) Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases, *Nature*, 213: 1264-1265.
- Lee, D.W., Kim, H.W., Lee, K.W., Kim, B.C., Choe, E.A., Lee, H.S., Kim, D.S. ve Pyun, Y.R. (2001) Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Enzyme Microb. Technol.*, 29: 363-371.
- Lee, D.W., Park, Y.M. ve Lee, K.Y. (2009) Heterogeneous Base Catalysts for Transesterification in Biodiesel Synthesis, *Catal. Surv. Asia*, 13: 63-77.

- Lee, J. Y., Lee, J.Y., Jung, H. W. ve Hwang, B.K. (2005) *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3butenois acid, *Int. J. of Syst. and Evolut. Microb.*, 55:257-262.
- Lee, S.Y. ve Rhee, J.S. (1993) Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK, *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 617-623.
- Lescic, I., Vukelic, B., Majeric- Elenkov, M., Saenger, W. ve Abramic, M. (2001) Substrate specificity and effects of water-miscible solvents on the activity and stability of extracellular lipase from *Streptomycesrimosus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 29: 548-553.
- Li, H. ve Zhang, X. (2005) Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1, *Protein Expr. Purif.*, 42: 153-9.
- Li, Y., Hu, M. ve McClements, D.J. (2011) Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method, *Food Chem.*, 126: 498-505.
- Lin, S.F., Chiou, C.M., Yeh, C.M. ve Tsai, Y.C. (1996) Purification and partial characterization of an Alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111, *Appl. and Enviro. Microb.*, 62 (3): 1093-1095.
- Litthauer, D., Ginster, A. ve Skein, E.V.E. (2002) *Pseudomonas luteola* lipase: A new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family, *Enzyme Microb. Technol.*, 30: 209-215.
- Lopez, C., Guerra, N.P. ve Rua, M.L. (2000) Purification and characterization of 2 isoforms from *Candida rugosa* lipase-B, *Biotechnol. Lett.*, 22: 1291-1294.
- Lotrakul, P. ve Dharmstithi, S., (1997) Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal, *World J. Microb. Biotech.*, 13: 163-166.
- Ma, F. ve Hanna M.A. (1999) Biodiesel production: A review, *Bioresour, Techn.*, 70
- Macedo, G.A., Lozano, M.M.S. ve Pastore, G.M. (2003) Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp., *J Biotech.*, 6

- Madigan M.T. ve Martingo J.M. (2009) *Brock mikroorganizmaların Biyolojisi*, Çeviri Editörü: Cumhur Çökmüş, Palme Yayınevi, Ankara, 992s.
- Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M. ve Gokhale, D.V. (2002) Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Proc. Biochem.*, 38: 715-721.
- Mahanta, N., Gupta, A. ve Khare, S.K. (2008) Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate, *Biores. Tech.*, 99 (6): 1729
- Makhzoum, R.K., Owusu-Apenten, R.K. ve Knapp, J.S. (1996) Purification and Properties of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* Strain 2D, *Int. Dairy J.*, 6: 459-472.
- Manchenko, G.P. (2003) *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*, 2nd ed. Printed in the United States of America, 553s.
- Mander, P., Cho, S.S., Simkhada, J.R., Choi, Y.H., Park, D.J. ve Yoo, J.C.C. (2012) An organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. CS133 for enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media, *Proc. Biochem.*, 47: 635-642.
- Mander, P., Cho, S.S., Simkhada, J.R., Choi, Y.H. ve Yoo, J.C. (2011) A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624, *Proc. Biochem.*, 46: 1449-1455.
- Mander, P., Choi, Y.H., G.C.P., Choi, Y.S., Hong, J.H., Sik Cho, S. ve Yoo, J.C. (2013) Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate, *Proc. Biochem.*.
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U. ve Errazu, A.F. (2007) Possible methods for biodiesel production, *Renewab. and Sustainab. Energy Rev.*, 11: 1300-1311.
- Martinez, A. ve Soberon-Chavez, G. (2001) Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83, *Appl. Micro. Biotech.*, 56: 731-735.

- Marul, B., (2007). Fabrika atıklarından izole edilen *Bacillus* sp.'den aktif ve kararlı lipaz üretim koşullarının ve üretilen enzimin deterjan endüstrisinde kullanımının araştırılması. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü.
- Masomian, M., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B. ve Basri M. (2013) A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ, *Proc. Biochem.*, 48: 169-175.
- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A. ve Fukuda, H. (2001) Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production, *Appl Microb. Biotech*, 57: 515/20.
- Maurich, V., Moneghini, M., Zacchigna, M., Pitotti, A. ve Lencioni, E. (1991) High performance liquid chromatographic assay of pancreatic lipase activity, *J. of Pharma. and Biomed. Analysis*, 9 (5): 427-431.
- Meghwanshi, G.K., Agarwal, L., Dutt, K. ve Saxena, R.K. (2006) Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates, *J. of Mol. Catal. B: Enzym.*, 40: 127-131.
- Meher, L.C., Sagar, D.V. ve Naik, S.N. (2006) Technical aspects of biodiesel production by transesterification: A review, *Renew. Sustain. Energ. Rev.*, 10 (3): 248-68.
- Meng, Y., Wang, G., Yang, N., Zhou, Z., Li, Y., Liang, X., Chen, J., Li, Y. ve Li, J. (2011) Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase, *Biotechnol, Biofuels*, 4, 6.
- Meyers, S.A., Cuppett, S.L. ve Hutkins, R.W. (1996) Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil, *Food Microb.*, 13: 383-389.
- Mittelbach, M. (1990) Lipase catalyzed of sunflower oil, *JAOCS*, 67 (3): 168-70.
- Mittelbach, M., Worgetter, M., Pernkopf, J. ve Junek, H. (1983) Diesel fuel derived from vegetable oils: Preparation and use of rape oil methyl-ester, *Energ, Agr.*, 2 (4): 369-84.

- Modi, M.K., Reddy, J.R.C., Rao, B.V.S.K. ve Prasad, R.B.N. (2007) Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor, *Biores. Tech.*, 98: 1260-4.
- Mohan, T.S., Palavesam, A. ve Immanuel, G. (2008) Isolation and characterization of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste, *Afr. J. Biotech.*, 7 (15): 2728-2735.
- Moriguchi, H., Hirata, J. ve Watanabe, T. (1990) Microorganism based agent for treatment of organic wastes, Japanese Patent 2,105,899.
- Mutlu, A. (2002) Nükleer Demodelik mi, Sürdürülebilir Enerji mi, Standart, Temmuz- 2002, 66s.
- Naka, Y. ve Nakamura, T. (1992) The Effects of Serum Albumin and Related Amino Acids on Pancreatic Lipase and Bile Salts Inhibited Microbial Lipases, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (7): 1066-1070.
- Nakamura, K. ve Nasu, T. (1990) Enzyme containing bleaching composition, Japanese Patent 2,208,400.
- Namboodiri, V.M.H. ve Chattopadhyaya, R. (2000) Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*, *Lipids*, 35, 495-502.
- Negre-Salvayre, A., Dagan, A., Gatt, S. ve Salvayre, R. (1991) New fluorescent pyrenecointaining substrates for assaying cellular lipases, cholesterol esterases and carboxyl esterases, *Appl. Fluoresc. Tech.*, 3: 1-6.
- Nelson, L.A., Foglia, T.A. ve Marmer, W.N. (1996) Lipase-catalyzed production of biodiesel, *JAACS*, 73, 1191-5.
- Nguyen, L.N., Dao, T.T., Zivkovic, T., Fehrholz, M., Schafer, W. ve Salomon, S. (2010) Enzymatic Properties and Expression Patterns of five Extracellular Lipases of *Fusarium graminearum* *in vitro*, *Enzyme Microb. Tech.*, 46 (6): 479-486.

- Nie, K., Xie, F., Wang, F. ve Tan, T. (2006) Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production, *J.of Mol. Catal. B: Enzym.* Vol. 43 (1-4): 142-147.
- Niladevi, K.N., Jacob, N. ve Prema, P. (2008) Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization, *Proc. Biochem.*, 43: 654-660.
- Omar, I.C., Nishio, N. ve Nagai, S. (1987) Fat hydrolysis and esterification by a lipase from *Humicola lanuginosa*, *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2153-2159.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol C.R., Nigam, P., Krieger, N. ve Soccol, U.T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotech. Appl. Biochem.*, 29:119-131.
- Park, J.K., Kim, J., Park, Y.I. ve Kim, S. (2011) Purification and characterization of a 1,3- β -d-glucanase from *Streptomyces torulosus* PCPOK-0324, *Carbohydrate Polymers*, 87: 1641-1648.
- Peczynska-Czoch, W. ve Mordarski, M. (1988) *Actinomycete* Enzymes, In: *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, San Diego, 219s.
- Pencreac'h, G. ve Baratti, J.C. (1996) Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in nheptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, 18: 417-422.
- Phan, A.N. ve Phan, T.M. (2008) Biodiesel production from waste cooking oils, *Fuel*, 87: 3490-3496.
- Pinyaphong, P., Sriburi, P. ve Phutrakul, P., (2011) Biodiesel Fuel Production by Methanolysis of Fish Oil Derived from the Discarded Parts of Fish Catalyzed by *Carica papaya* Lipase, *World Acad. of Scie., Eng. and Tech.* 52: 466-472.
- Prakash D.R. ve Chandra B. (1998) A critical review of biodiesel as a transportation fuel in Canada, Transportation Systems Branch Air Pollution Prevention Directorate Environment Canada, March 25.

- Rahman, R.N.Z.R.A., Baharum, S.N., Basri, M. ve Salleh, A.B. (2005) High- yield purification of an organic solvent- tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5, *Anal. Biochem.*, 341: 267-274.
- Rahulan, R., Dhar, K.S., Nampoothiri, K.M. ve Pandey, A. (2012) Characterization of leucine amino peptidase from *Streptomyces gedanensis* and its applications for protein hydrolysis, *Proc. Biochem.*, 47: 234-242.
- Ramani, K., Chockalingam, E. ve Sekaran, G. (2010) Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate, *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 37: 531-535.
- Rathi, P., Saxena, R. K. ve Gupta, R. (2001) A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepaia* for detergent formulation, *Proc. Biochem.*, 37: 187-192.
- Reetz, M.T. (2002) Lipases as practical biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 145-150.
- Reetz, M.T. ve Jaeger, K.E. (1998) Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases, *Chem Phys Lipids*, 93: 3-14.
- Refaat, A.A., Attia, N.K., Sibak, A., El Sheltawy, S.T. ve El Diwani, G.I. (2008) Production optimization and quality assessment of biodiesel from waste vegetable oil, *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 5: 75-82.
- Rohit, S., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotech. Adv.*, 19: 627-62.
- Rollof, J., Hedstrom, S.A. ve Nilsson-Ehle, P. (1984) A simple turbidometric method for specific measurement of *Staphylococcus aureus* lipase activity, *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, Sect B, 92B(3), 155-158. CA 101
- Ruchi, G., Anshu, G. ve Khare, S.K. (2008) Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application, *Biores. Technol.*, 99: 4796-480.

- Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Pastor, F. I. J., Diaz, P. ve Saso, L. (2004) Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus* related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay, *Biochim. et Biophysica Acta*, 1672: 184-191.
- Ruiz, L., Roudriguez-Fernandez, M.F.C. (1982) Kinetic study of hepatic triglyceride lipase from rat liver soluble fraction, *Enzyme*, 27: 215-219.
- Sabri, S., Rahman, R.N.Z.R.A., Leow, T.C., Basri, M. ve Salleh, A.B. (2009) Secretary expression and characterization of a highly Ca²⁺-activated thermostable L2 lipase, *Protein Expr. Purif.*, 68: 161-166.
- Salameh, M.A. ve Wiegel, J. (2007) Purification and Characterization of Two Highly Thermophilic Alkaline Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (23): 7725-7731.
- Samad, M.Y.A., Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Zin Van Yunus, W.M., Ampon, K. ve Basri, M. (1989) A plate assay for primary screening of lipase activity, *J. Microb. Meth. J. Microbi.*, 9: 51-56.
- Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A. ve Shimada, Y. (2000) Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil, *J Biosci. Bioeng.*, 90(2),180-3.
- Sangeetha, R., Arulpandi, I. ve Geetha, A. (2011) Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview, *Res. J. Microbiol.*, 6: 1-24.
- Saraç, N. (2011) LipAH02-30'un Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Endüstriyel Kullanımı, (Doktora Tezi), Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sarıyıldız, Ü. (2005) Petrol Dar Boğazına Alternatif: Biyodizel, <http://www.tepkime.net/2005/10/petrol-dar-boazna-alternatif-biyodizel.html>, Erişim tarihi: 30.08.2011.
- Savitha, J., Srividya, S., Jagat, R., Payal, P., Priyanki, S., Rashmi, G.W., Roshini, K.T. ve Shantala, Y.M. (2007) Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase, *Afr. J. Biotech.*, 6 (5): 564-568.

- Saxena R.K., Ghosh P.K., Gupta R., Davidson S.W., Bradoo S. ve Gulati R. (2008) Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry, *Current Sci. Online*, 95 (2).
- Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A., Giri, B. (2003b) Purification and characterisation of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochem.*, 39: 239-247.
- Saxena, R. K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. ve Gulati, R. (1999) Microbial lipases: potential biocatalyst for the future industry, *Current Science*, 77: 101-115.
- Schmid, R. ve Verger, R. (1998) Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37: 1608-1633.
- Sellappan, S. ve Akoh, C.C. (2001) Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalyzed by lipozyme IM60, *J. of Agricult. and Food Chem.*, 49 (4): 2071-2076.
- Sharma, D., Sharma, B. ve Shukla, A.K. (2011) Biotechnological approach of microbial lipase: A review, *Biotech.*, 10 (1): 23-40.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotech. Advances*, 19: 627-662.
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L. ve Gupta, J. (2002) Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1, *Proc. Biochem.*, 37: 1075-1084.
- Sheehan, J., Camobreco, V., Duffield, J., Graboski, M. ve Shapouri, H. (1998) An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. National Renewable Energy Laboratory and US Department of Energy Report. 580-24772: 1-60
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. ve Tominaga, Y. (1999) Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *C. antarctica* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (7): 789-93.

- Show, P.L., Tan, C.P., Anuar, M.S., Ariff, A., Yusof, Y.A., Chen, S.K., Ling, T.C. (2012) Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems, *Bioresour. Tech.* 116: 226-233.
- Shu, Z.Y., Jiang, H., Lin, R.F., Jiang, Y.M., Lin, L. ve Huang, J.Z. (2010) Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases, *J. of Mol. Catal. B:Enzymatic*, 62: 1-8.
- Sierra, G. (1957) A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates, *Antonie van Leeuwenhoek*, 23: 15-22.
- Singh, M., Singh, S., Singh, R.S., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C. (2008) Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase, *Biores. Technol.*, 99: 2116-2120.
- Singh, S. ve Banerjee, U.C. (2007) Purification and characterization of trans-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Biochem.*, 42: 1063-1068.
- Smibert, R.M. ve Krieg, N.R. (1994) Phenotypic characteristics. In *Methods for General and Molecular Biology*, pp. 607-654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E.Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Snellman, E.A., Sullivan, E.R. ve Colwell, R.R. (2002) Purification and properties of the extracellular lipase, Lip A, of *Acinetobacter sp.* RAG-1, *Eur J Biochem.*, 269: 5771-5779.
- Soliman, N.A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y.R., Schmid, R.D. ve Lange, S. (2007) Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt, *Proc. Biochem.*, 42: 1090-1100.
- Sommer, P., Bormann, C. ve Gotz, F. (1997) Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3553-3560.

- Srivastava, A. ve Prasad, R. (2000) Triglycerides-based diesel fuels, *Renew, Sustain. Energ. Rev.*, 4 (2): 111-33.
- Staubmann, R., Ncube, I., Gubitzi, G.M., Steiner, W. ve Read, J.S. (1999) Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds, *J. Biotech.*, 75: 117-126.
- Stergiou, P. Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L. G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A. ve Papamichael, E. M. (2013) Advances in lipase-catalyzed esterification reactions, *Biotech. Advan.*, 31: 1846-1859.
- Stuer, W., Jaeger, K. ve Winkler, U.K. (1986) Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. of Bact.*, 168 (3): 1070-1074.
- Suehara, K., Kawamoto, Y., Fujii E., Kohda, J., Nakano, Y. ve Yano, T. (2005) Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali transesterification, *J. Biosci. Bioeng.*, 100 (4): 437-42.
- Sugihara, A., Tani, T. ve Tominaga, Y. (1991) Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.*, *J. Biochem.*, 109: 211-216.
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y. ve Tsunasawa, S. (1992) Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*, *J. Biochem.*, 112: 598-603.
- Sugimori D., Kano, K. ve Matsumoto Y. (2012) Purification, characterization, molecular cloning and extracellular production of a phospholipase A₁ from *Streptomyces albidoflavus* NA297, *FEBS Open Bio* 2: 318-327.
- Sugimori, D., Ogasawara, J., Okuda, K. ve Murayama, K. (2013) Purification, characterization, molecular cloning, and extracellular production of a novel bacterial glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*, *J. of Bios. and Bioeng.*, VOL. xx No. xx, 1-9.
- Sulong, J. (2006). Kedudukan wanita dalam pembahagian pusaka, *J. Syariah*, Vol. 14 (2): 121-143.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. ve Wieczorek, J. (1988) Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes, *Enzy. Microb. Tech.*, 10: 492-497.

- Şahin, N. (2005) Antimicrobial activity of *Streptomyces* species against mushroom blotch disease pathogen. *J. Basic Microb.*, 45: 64-71.
- Taipa, M. A., Moura-Pinto, P. ve Cabral, J.M.S. (1994) Identification and characterization of *C. riscosum* lipase, *Biotech. Tech.*, 8: 27-32.
- Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R. ve Cabral, J.M.S. (1992) Purification of lipases, *J. Biotechnol.*, 26: 111-142.
- Telefoncu, A. (1993) *Besin Kimyası*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No: 149. İzmir, 172s.
- Telefoncu, A. (1986) *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çeşme, İzmir-Türkiye, 326s.
- Thuren, T., Virtanen, J.A., Verger, R. ve Kinnunen, P.J.K. (1987) Hydrolysis of 1 palmitoyl 2 [6-pyren-1-yl]hexanoyl-*sn*-glycero-3-phospholipids by phospholipase A2: Effect of the polar head-group, *Biochim. Biophys. Acta*, 917: 411-417.
- Toscano, L., Gochev, V., Montero, G. ve Stoytcheva, M. (2011) Enhanced Production of Extracellular Lipase by Novel Mutant Strain of *Aspergillus niger*, *Biotech. & Biotech. Eq.*, 25: 2243-7.
- Tsai, S.H., Liu, C.P. ve Yang, S.S. (2007) Microbial conversion of food wastes for biofertilizer production with thermophilic lipolytic microbes, *Renewable Energy*, 32: 904-915.
- Van Gerpen J., Shanks B. ve Pruzko R. (2004) Biodiesel Production Technology, NREL/SR- 510-36244, National Renewable Energy Laboratory, Boulder, CO.
- Van Oort, M. G., Debeer, A. M. T. J., Dijkman, R., Tjeenk, M. L., Verheij, H. M., De Haas, G. H., Wenzig, E. ve Götz, F. (1989) Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase, *Biochem.*, 28: 9278-9285.
- Veerraghavan, K. (1990) A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. *Anal. Biochem.*, 186 (2): 301-305.

- Vennila, S. ve Krishnaveni, M. (2013) Bioactive compound produced from *Streptomyces aureofaciens* KF532950 and its antimicrobial activity, *Int. J. of chem. and analyt. Scie.*, 4: 153-155 .
- Verger, R. (1997) Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts, *Trends Biotech.*,15: 32-38.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., ve Haas, M.J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, 9: 113-148.
- Vionis, A.P., Katsifas, E.A. ve Karagouni, A.D. (1998) Survival, metabolic activity and conjugative interactions of indigenous and introduce *Streptomyces* strain in soil microcosms, *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 103-115.
- Vishnupriya, B., Sundaramoorthi, C., Kalaivani, M. ve Selvam, K. (2010) Production of lipase from *Streptomyces griseus* and evaluation of Bioparameters, *Int. J. of Chem. Tech. Research*, 2 (3): 1380-1383.
- Von Tigerstrom, R.G. ve Stelmaschuk, S. (1989) The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes, *Can. J. Microbiol.*, 35: 511-514.
- Vujaklija, D., Abramic, M., Lescic, I., Marsic, T. ve Pigac, J. (2003) *Streptomyces rimosus* GDS(L) lipase: Production, Heterologous overexpression and structurestability relationship, *Food Technol. Biotech.*, 41: 89-94.
- Vujaklija, D., Schröder, W., Abramic, M., Zou, P., Lescic, I., Franke, P. ve Pigac, J. (2002) A novel *Streptomyces* lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus*, *Arch. Microbiol.*, 178: 124-130.
- Wang, Z., Yuan, Y., Li, B., Mei, D. ve Sun, P. (2005) Study on emission test for biodiesel, *J. Agric. Ind.*, 21 (7): 77-80.
- Wang, J., Ma, C., Bao, Y. ve Xu, P. (2012) Lipase entrapment in protamine-induced bio-zirconia particles: Characterization and application to the resolution of (R,S)-1-phenylethanol, *Enzyme and Microb. Techn.*, 51: 40-46.
- Wang, L. ve Jagarao, B.M. (2001) Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk, *J. Dairy Sci.*, 84:1421-1429.

- Wang, X., Yu, X. ve Xu, Y. (2009) Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Enzyme Microb. Tech.*, 45: 94-102.
- Wang, Y., Srivastava, K.C., Shen, G.J. ve Wang, H.Y. (1995) Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841), *J. Ferment. Bioeng.*, 79: 433-438.
- Wang, W., Li, T., Ning, Z., Wang, Y., Yang, Y. ve Yang, X. (2011) Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis, *Enzyme and Microb. Tech.*, 49: 192-196.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. ve Tominaga, Y. (2000) Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase, *JAACS*, 77(4), 355-9.
- Wendisch, F.K. ve Kutzner, H.J. (1991) *The family Streptomycetaceae. In Prokaryotes*, Second edition, Vol:1. p, 922-995. Ed. by A. Ballows et al., Springer Verlag.
- Williams, S.T., Goodfellow, M. ve Alderson, G. (1989) Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339 AL. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. 2452-2492 s.
- Winkler, K.W., Ulrich, K. ve Stuckmann, M. (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*, *J. Bact.*, 138 (3): 663-670.
- Winteler, H.V., Schneidinger, B., Jaeger, K.E. ve Haas, D. (1996) Anaerobically controlled expression system derived from the arcDABC operon of *P. aeruginosa*: application to lipase production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3391-3398.
- Wiseman, A. (1987) *Handbook of Enzymes Biotechnology*, Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, 274-373s.
- Wiseman, A. (1995) *Introduction to principles. In: Wiseman A, editor. Handbook of enzyme biotechnology*, 3rd ed. Padstow, Cornwall, UK: Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd, 3-8s.

- Wooley, P. ve Petersen, S. (1994) (Eds), *Lipases: Their structure, biochemistry, and application*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 243-270s.
- Yadav, G.D. ve Trivedi, A.H. (2003) Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in nonaqueous media, *Enzyme Microb. Technol.*, 32: 783–789.
- Yamık, H. ve İçingür, Y. (2008) Bir dizel motorunda ayçiçek yağı esterlerinin yakıt olarak kullanılmasının performansa etkisi, *Teknoloji*, 11: 201-209.
- Yang, K.S., Sohn, J.H. ve Kim, H.K. (2009) Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration, *J. Biosci. Bioeng.*, 107 (6): 599-604.
- Yang, J., Xie, B., Bai, J. ve Yang, Q. (2012) Purification and characterization of a nitroreductase from the soil bacterium *Streptomyces mirabilis*, *Proc. Biochem.*, 47: 720724.
- Yao, C., Cao, Y., Wu, S., Li, S. ve He, B. (2013) An organic solvent and thermally stable lipase from *Burkholderia ambifaria*, Purification, characteristics and application for chiral resolution of mandelic acid, *J. of Mol. Catal. B: Enzymatic*, 85-86, 105-110.
- Yeo, S. H., Nihira, T. ve Yamada, Y. (1998) Screening and identification of a novel lipase from *Burkholderia* sp. YY62 which hydrolyses *t*-butyl esters effectively, *J.Gen. Appl. Microbiol.*, 44: 147-152.
- Yılmaz, S. (2008) Süperkritik Metanol Kullanarak Yağlardan Biyodizel Elde Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Yoo, H., Simkhada, J.R., Cho, S.S., Park, D.H., Kim, S.W., Seong, C.N. ve Yoo, J.C. (2011) A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production, *Biores. Tech.*, 102: 6104-6111.
- Yoshida, A., Hama, S., Nakashima, K. ve Kondo. A. (2011) Water activity dependence of performance of surface-displayed lipase in yeast cells: A unique water requirement for enzymatic synthetic reaction in organic media, *Enzyme and Microb. Tech.*, 48: 334-338.

- Yoo, J.C., Cho, S.S., Park da, J., Simkhada, J.R., Hong, J.H., Sohng, J.K. ve Lee, O.H. (2012) A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp. CS326, *Bioproc. Biosyst Eng*, 35(1-2):227-34.
- You, Q., Yin, X., Zhao, Y. ve Zhang, Y. (2013) Biodiesel production from jatropha oil catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on modified attapulgite, *Bioresour. Techn.*, 148 202–207.
- Zawadzki, A., Shrestha, D.S. ve He, B. (2007) Biodiesel blends level detection using ultraviolet absorption spectra, *Transactions of the ASABE*, 50 (4): 1349-53.
- Zhang, Y., Dube, M.A., Mclean, D.D. ve Kates, M. (2003) Biodiesel production from waste cooking oil. 1. Process design and technological assessment, *Biores. Technol.*, 89 (1): 1-16.
- Zhang, A., Gao, R., Diao, N., Xie, G., Gao, G. ve Cao, S. (2009) Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 56: 78-84.
- Zhao, X., Fan, M., Zeng, J., Du, W., Liu, C. ve Liu, D. (2013) Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation, *Enzyme and Microb. Tech.*.
- Zheng, S., Kates, M., Dube, M.A. ve McLean, D.D. (2006) Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil, *Biomass and Bioenergy*, 30, 267-272.
- Zheng, Y.Y., Guo, X.H., Song, N.N. ve Li, D.C. (2011) Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning expression and characterization, *J. of Mol. Cat. B:Enzym.*, 69: 127-13.

EKLER

Ek A. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Besiyerlerinin tamamı 121 °C'de otoklavda 15 dk sterilize edilmiştir.

A.1. International Streptomyces Project 2 Katı Besiyeri (ISP2) (Merck)

Yeast Extract	4 g
Malt Extract	10 g
Dextrose	4 g
CaCO ₃	2 g
Agar Agar	20 g
Distile Su	1000 ml
	pH 7.3

Bakterilerin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

A.2. International Streptomyces Project 2 Sıvı Besiyeri (ISP2) (Merck)

Yeast Extract	4 g
Malt Extract	10 g
Dextrose	4 g
CaCO ₃	2 g
Distile Su	1000 ml

Kantitatif lipolitik aktivite analizi için kültürün geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Ek B. Çalışmada Kullanılan Boya ve Solüsyonlar

Substrat Solüsyonu

A solüsyonu

<i>p</i> -NPP (Sigma)	30 mg
İzopropil alkol (Merck)	10 ml

B solüsyonu

Arabic Gum (Merck)	0.1 g
Triton X-100 (Merck)	2 ml
Tris-HCl (50 mM, pH 8.0)	90 ml

A ve B solüsyonları karıştırılarak iyice çalkalanır.

İzolatların ekstraselüler lipaz aktivitelerinin kantitatif ölçümünde kullanılmıştır.

Ek C. Çalışmada kullanılan tamponlar

50 mM Sitrat Fosfat Tamponu

Sitrik asit çözeltisi (0.2 M) 12.15 ml

Dibazik sodyum fosfat çözeltisi (0.2 M) 12.85 ml

Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

pH 5.0

50 mM Sitrat Fosfat Tamponu

Sitrik asit çözeltisi (0.2 M) 8.95 ml

Dibazik sodyum fosfat çözeltisi (0.2 M) 16.05 ml

Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

pH 6.0

50mM Tris-HCl Tamponu

Tris-HCl (Sigma) 7.28 g

Trizma Base (Sigma) 0.47 g

Distile su 1000 ml

pH 7.0

50mM Tris-HCl Tamponu

Tris-HCl (Sigma) 4.4 g

Trizma Base (Sigma) 2.65 g

Distile su 1000 ml

pH 8.0

50mM Tris-HCl Tamponu

Tris-HCl (Sigma) 0.76 g

Trizma Base (Sigma) 5.47 g

Distile su 1000 ml

pH 9.0

50 mM Glisin-NaOH Tamponu

Glisin çözeltisi (0.2 M) 12.5 ml

NaOH çözeltisi (0.2 M) 8.0 ml

Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

pH 10.0

50 mM Glisin-NaOH Tamponu

Glisin çözeltisi (0.2 M) 12.5 ml

NaOH çözeltisi (0.2 M) 13.375 ml

Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

pH 11.0

pH 5-11 arası tüm tamponlar, izolatların ekstraselüler lipaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesinde ve lipazın karakterizasyonunda kullanılmıştır.

Ek D. SDS- PAGE'de kullanılan jel, tampon ve solüsyonlar

Separating jel (Ayrıcı Jel) (% 16)

Acryl-Bisacryl (% 40)	6 ml
Distile su	2.6 ml
1.5M Tris.HCl. (pH: 8.8)	8.0 ml
SDS (%10)	150 µl
Amonyum persulfat (APS) % 1'luk	300 µl
TEMED	6.25 µl
Separating jel buffer	5.65 ml

Separating jel buffer

Tris-base	72.7 g
SDS	0.6 g

200 ml'ye distile su ile tamamlanır, pH=8.45 olacak şekilde HCl ile ayarlanır.

Stacking Jel (Yığıma Jel) (% 4'lük)

Acryl-Bisacryl (% 40)	0.6 ml
Stacking jel buffer	2.1 ml
Distile su	2.7 ml
SDS (%10)	62.5 µl
Amonyum persulfat (APS) % 1'luk	250 µl
TEMED	2.5 µl

Stacking Jel Buffer

Tris-base	72.7 g
SDS	0.6 g

200 ml'ye distile su ile tamamlanır, pH=8.45 olacak şekilde HCl ile ayarlanır.

Running Buffer (1x) (Yürütme Tamponu) (pH 8.3)

Trizma-base	3.63 g
Glisin	14.40 g
SDS	1.0 g
Distile su	1000 ml

Sample Buffer (Örnek Tamponu) (10 ml)

Trizma-Base (1 M) (pH 8.9)	1.6 ml
SDS (% 10'luk)	4.0 ml
Gliserol	2.0 ml
β -merkaptto etanol	1.0 ml
Brom fenol mavisi	4.0 mg
Distile su	1.4 ml

Staining Solution (Boyama Solüsyonu)

Coomassie Brilliant Blue R 250	1.5 g
İzopropil alkol	250 ml
Asetik asit	100 ml
Distile su	650 ml

Destaining Solution (Boya Çıkarıcı Solüsyon)

İzopropil alkol	250 ml
Asetik asit	100 ml
Distile su	650 ml

Saklama Solüsyonu

Asetik asit	100 ml
Distile su	900 ml

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Burak Şen

Uyruk : T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi: 02/05/1985

Medeni Hali : Bekar

Telefon : 0 555 869 3089

E-posta : buraksn@hotmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Muğla Anadolu Lisesi	2006
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2014

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2013	Nova Laboratuvar ve Mühendislik	Biyolog

Yayınlar

- Sarac, N. and Şen, B. (2014) Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*. *Industrial Crops and Products* 53 60– 64
- Sarac, N., Boran, R., Ugur, A., Şen, B., Ceylan, O.(2013)Cytotoxicity and Mutagenic Activity of the Rosy Hull of *Pistacia vera* from Turkey.ICOEST'2013 – CAPPADOCIA. Urgup, Turkey, June 18-21.
- Baş Sermenli, H.,Çatav, Ş. S.,Şen, B., Özbay, S. (2013) Effect of Plant-derived Smoke on Mycelial Growth of Six Macrofungi. *Akyaka, Muğla*

Sertifikalar

- ISO 9001: 2008 Kalite Yönetim Sistemi 2012
- ISO 14001: 2004 Çevre Yönetim Sistemleri 2012
- OHSAS 18001 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi 2012
- ISO/IEC 17025: 2005 Deney ve Kalibrasyon 2012
- Laboratuvarlarının Yeterliliği 2013
- GMP İyi Üretim Uygulamaları 2013
- GLP İyi Laboratuvar Uygulamaları 2013