

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

2022-YL-062

Anoxybacillus sp. HBB229'UN LİPAZ ÜRETİMİ
ÜZERİNE KÜLTÜR KOŞULLARININ ETKİSİ

GONCAGÜL ÖZGER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. KUBİLAY METİN

AYDIN-2022

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım ve araőtırmam boyunca her zaman yanımda olan, sabrı, motivasyonu, emeği ve engin bilgisi için danıőmanım Prof. Dr. Kubilay METİN'e en içten teőekkürlerimi sunarım. Bu tezi araőtırmam ve yazmam sırasında onun rehberliği ile akademik ve bilimsel becerilerimi geliőtirdim. Öđrencilerini büyük bir emek ve disiplinle geliőtiren, geleceklarine ışık tutan danıőmanıma sonsuz sayđı ve minnetlerimi sunarım.

Deđerli bilgileriyle çalışmaya katkılar sunan Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. H. Halil BIYIK'a sayđılarımı ve sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmamızın her aőamasında bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen özellikle istatistik değerlendirmelerindeki yardımlarımdan, tüm tez sürecindeki bilgi deneyimini benimle paylaőtıđı için doktora öğrencisi Sayın Sezgin KARAMAN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda laboratuvarında çalışırken bana desteklerini esirgemeyen hocam Arő. Gör. Zehra Burcu BAKIR'a ve arkadaőlarım Arő. Gör. Gizem ANTİKA'ya, Arő. Gör. Aslı ÇANAKÇI'ya, Princess Sindiswa SOKHULU'ya, Atakan PİPİLOS'a ve Cennet ÜLKÜ'ye teőekkürlerimi sunarım.

Tez komitesine ve jüri üyelerine gösterdikleri ilgiden dolayı en içten teőekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatım boyunca her koőulda bana inanan, destek olan ve sevgilerini esirgemeyen kardeőim B. Kardelen ÖZGER'e annem Ayőe ÖZGER'e ve babam Yusuf ÖZGER'e teşekkür ederim.

Goncagül ÖZGER

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	2
1.2. Enzimlerin Tarihçesi	4
1.3. Enzimlerin İsimlendirmesi.....	5
1.3.1. Geleneksel İsimlendirme.....	6
1.3.2 Sistematik İsimlendirme	6
1.4. Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması	6
1.5. Enzimlerin Üretimi	9
1.6. Lipazlar	10
1.6.1. Mikrobiyal Lipazlar	10
1.6.2. Termofilik Bakterilerde Lipaz Enzimi	11
1.6.3. Bakteriyel Lipaz Enziminin Karakterizasyonu	12
1.6.4. Bakteriyel Lipazların Fizikokimyasal Özellikleri	12
2. KAYNAK ÖZETİ.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18

3.1. Kimyasallar	18
3.2. Mikroorganizmalar.....	19
3.3. Kantitatif Lipaz Aktivite Tayini.....	19
3.4. Kültür Koşullarının <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229 Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi	21
3.4.1. Başlangıç pH'nın Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi	21
3.4.2. İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi	21
3.4.3. Lipaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi	22
3.4.4. Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi	23
3.4.5. İnkübasyon Süresinin Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi	23
3.5. <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229 Lipazının Karakterizasyonu.....	24
3.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	24
3.5.2 Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	24
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Besi Ortamının <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229'un Lipaz Üretimine Etkisi.....	25
4.1.1. Besiyeri Sıcaklığı	25
4.1.2. Besi Yeri Başlangıç pH'sı.....	26
4.1.3. Karbon Kaynaklarının Bakteriyel Üreme ve Lipaz Aktivite Üzerine Etkileri.....	28
4.1.4. Azot Kaynaklarının Bakteriyel Üreme ve Lipaz Aktivite Üzerine Etkileri.....	32
4.2. Zamana Bağlı Üreme ve Lipaz Enzimi Üretimi	34
4.3. <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229 Lipazının Kantitatif Enzim Aktivite Tayini.....	35
4.3.1. HBB229 Lipaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	35
4.3.2. HBB 229 Lipaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	37
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKÇA.....	44
BİLİMSEL ETİK BEYAN	50



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Absorbans
ANOVA	: Varyans Analizi
°C	: Santigrad Derece
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
€	: Molar Absorbans Katsayısı
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
g	: Gram
g	: Yer Çekimi İvmesi
HBB	: Halil Bıyık Bakteri
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IUB-MB-EC	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komisyonu
kDa	: Kilodalton
Km	: Michaelis-Menten Sabitesi
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
M	: Molar
NCBI	: Ulusal Biyoinformatik Bilgi Merkezi
µL	: Mikrolitre

OD	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pNP	: P-Nitrofenol
pNPL	: P-Nitrofenil Laurat
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SA	: Spesifik Aktivite
sp.	: Tür
t	: İnkübasyon Zamanı
U	: Enzim Ünitesi
UV	: Ultraviyole
vd.	: Ve Diğerleri
v	: Örnek Hacmi
V	: Reaksiyon Hacmi
VA	: Volum Aktivite
Vmax	: Maksimum Enzim Aktivitesi
%	: Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları.....	3
Şekil 2. Besiyeri sıcaklığının <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229 bakteri üremesi ve lipaz üretimine etkisi.....	25
Şekil 3. Başlangıç pH'sının <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229'nin lipaz enzimi üretimine etkisi....	27
Şekil 4. Karbon kaynaklarının termofilik lipaz aktivite üzerine etkileri.....	29
Şekil 5. Karbon kaynaklarının bakteriyel üreme üzerine etkileri.....	29
Şekil 6. Karbon kaynağı olarak yağların bakteriyel üreme üzerine etkileri.....	31
Şekil 7. Karbon kaynağı olarak yağların lipaz volüm aktivite üzerine etkileri.....	31
Şekil 8. Farklı azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisi.....	33
Şekil 9. Farklı azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisi ortalama OD ₆₀₀	33
Şekil 10. Zamana bağlı bakteriyel yoğunluk ve lipaz enzimi üretimi.....	34
Şekil 11. <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229 lipaz enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.....	36
Şekil 12. Sıcaklığın <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229'un enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	37

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Biyokatalizörlerin kimyasal katalizörlere göre endüstrideki avantajları.....	4
Tablo 2. Enzim sınıfları ve katalizledikleri reaksiyonlar.....	7
Tablo 3. Enzimlerin sınıflandırılması ve endüstriyel kullanım alanları.....	8
Tablo 4. Son zamanlarda çalışılan bakteriyel lipazların fizikokimyasal özellikleri.....	13
Tablo 5. Kullanılan kimyasalların listesi.....	18
Tablo 6. Luria-BERTANİ Agar ortam içeriği.....	19
Tablo 7. Lipaz aktivite tayininde kullanılan ortamın bileşenleri.....	20
Tablo 8. Optimum koşullar belirlendikten sonra lipaz aktivite tayininde kullanılan ortamın bileşenleri.....	20
Tablo 9. Yağ içeren karbon kaynakları denemelerinde kullanılan kontrol besiyeri.....	23
Tablo 10. Azot kaynağı denemelerinde kullanılan besi ortamı.....	23
Tablo 11. Besiyeri sıcaklığının <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229 bakteri üremesi ve lipaz üretimine etkisi.....	26
Tablo 12. Başlangıç pH'sının <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229'un lipaz enzimi üretimine etkisi..	27
Tablo 13. Karbon kaynaklarının bakteriyel üreme ve lipaz aktivite üzerine etkileri.....	28
Tablo 14. Karbon kaynağı olarak yağlar.....	30
Tablo 15. Farklı azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisi.....	32
Tablo 16. Zamana bağlı bakteriyel yoğunluk ve lipaz enzimi üretimi.....	35
Tablo 17. pH'ın <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229 lipaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	36
Tablo 18. <i>Anoxybacillus</i> sp. HBB229'un lipaz enzimi üzerine sıcaklığının etkisi.....	38

ÖZET

Anoxybacillus sp. HBB229'UN LİPAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE KÜLTÜR KOŞULLARININ ETKİSİ

**Özger G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Programı, Yüksek Lisans, Aydın, 2022**

Amaç: *Anoxybacillus* sp. HBB229 tarafından üretilen lipazın, üretim koşullarının optimizasyonu yapılarak enzim üretimi ve en yüksek verimde enzim üretiminin sağlanması amaçlanmıştır.

Materyal Yöntem: Substrat olarak p-NPL (p-nitrofenil laurat) kullanılarak spektrofotometrik olarak lipaz aktivite tayini yapılmıştır.

Bulgular: Bu çalışmada Aydın ili sıcak su kaynaklarından izole edilerek Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü kültür stoklarında kayıtlı bulunan HBB229 izolatu kullanıldı. Lipolitik aktivite gösterdiği daha önceden bilinen HBB229 izolatu; termofilik, gram-pozitif, endospor oluşturan, çubuk şeklinde ve hareketli bir bakteridir. HBB229 suşu en iyi enzim üretimi için kültür koşulları optimize edildiğinde; karbon kaynağı olarak %0,5'lik mısır yağı, azot kaynağı olarak %1'lik maya özütü içeren, pH 8,00 ve 50°C'de saptanmıştır. HBB229 izolatu optimum koşullarda geliştirildiğinde lipaz enzim üretimi volüm aktivite ölçümlerine göre logaritmik faz ile doğrusal olarak arttığı ve 12 saat inkübasyon sonrası maksimuma ulaştığı tespit edilmiştir. *Anoxybacillus* sp. HBB229 lipazının pH 9,00'da ve 55 °C optimum aktivite gösterdiği belirlendi.

Sonuç: *Anoxybacillus* sp. HBB229 bakterisinden elde edilen lipazın, endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda termostabil lipaz uygulamalarında kullanım potansiyeli olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *Anoxybacillus* sp., Üretim Optimizasyonu, Termofilik, Enzim Karakterizasyonu.

ABSTRACT

THE EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON LIPASE PRODUCTION BY *Anoxybacillus* sp. HBB229

Özger G. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Biology Program, Master's Thesis, Aydın, 2022

Objective: This study is intended to assure enzyme production and enzyme production with the best efficiency by improving the production conditions of lipase produced by *Anoxybacillus* sp. HBB229.

Material and Methods: Lipase activity was determined spectrophotometrically using p-NPL (p-nitrophenyl laurate) as a substrate.

Results: In this study, HBB229 isolate, registered in culture stocks of microbiology laboratory, Biology Department Adnan Menderes University, was isolated from the hot water sources of Aydın province. It was previously known that HBB229 isolate have lipolytic activity and is a thermophilic, gram-positive, endospore-forming, rod-shaped and motile bacterium. When the culture conditions of HBB229 strain are optimized the best enzyme production were; 0.5% corn oil as carbon source, 1% yeast extract as nitrogen source, pH 8,00 and 50°C. It was assigned that lipase enzyme production increased linearly with logarithmic phase according to volume activity measurements and reached its maximum level after 12 hours of incubation while HBB229 isolate was grown under optimum conditions. It was determined that *Anoxybacillus* sp. HBB299 lipase showed optimum activity at pH 9,00 and 55 °C.

Conclusion: The results of this thesis study suggested that lipase obtained from *Anoxybacillus* HBB229 bacteria has the potential to be used in thermostable lipase applications in industrial and biotechnological fields.

Keywords: Lipase, *Anoxybacillus* sp., Production Optimization, Thermophilic, Enzyme Characterization.

1. GİRİŞ

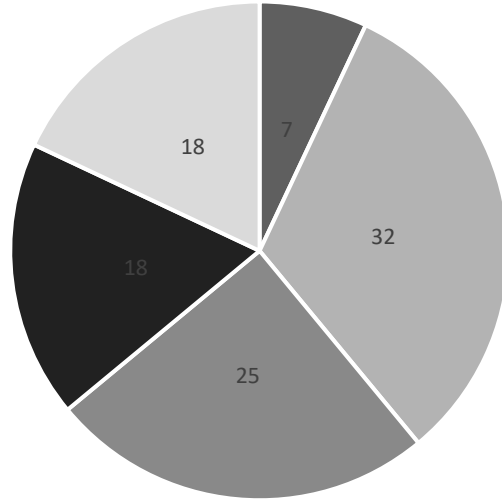
Gezegelimizde yüksek organizmaların var olmasından önce mikrobiyal yaşam oluşmaya başlamıştır. Mikrobiyal yaşam sadece gördüğümüz hava, toprak ve göllerde değil, kutuplardaki buzullardan, kaynayan volkanik bacalara, tuzlu göllerden sodalı sulara ve yüksek asitli ortamlara kadar yayılmaktadır. Su sıcaklığının yüksek değerlere ulaştığı ortamlarda bile mikrobiyal yaşam varlığını sürdürmektedir. Bunun yanında, 65 °C 'nin üzerinde sadece prokaryotik yaşam formları var olmasına rağmen, sadece bazı bakteri ve arke grupları daha yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar derin deniz termalleri gibi farklı anaerobik habitatların varlığı biyoteknolojik potansiyeli olan anaerobik mikroorganizmaların izole edilmesini mümkün kılmaktadır (Akkaya ve Kıvanç 2008). Tüm mikroorganizmalar, en yüksek gelişim ve üreme oranlarını sergiledikleri bir sıcaklık aralığına sahiptir. Bu sıcaklık aralığına optimum sıcaklık denilmektedir. Bakteriler optimum sıcaklıklarına göre sınıflandırılırken ortaya dört farklı grup çıkmaktadır. Psikrofillerin optimum sıcaklıkları düşüktür; mezofiller ılık bir optimum sıcaklığa sahiptir, termofiller, yüksek sıcaklık optimumlarına sahip mikroorganizmalardır ve hipertermofiller, çok yüksek sıcaklık optimumlarına sahip mikroorganizmalardır. Termofilik bakteriler gelişim sıcaklıklarına göre üç grupta incelenebilirler. Zorunlu veya ekstrem termofiller olarak bilinenlerin optimum gelişim sıcaklıkları 65-75 °C'dir, bu nedenle 40-42 °C'nin altında çoğalamazlar. Fakültatif termofiller ise 50-65 °C arasında gelişirler, fakat 30 °C'de gelişebilmektedirler. Termotolerant olanların ise, maksimum gelişim sıcaklıkları 45-50 °C'dir ve 30 °C'nin altında da gelişebilirler. Teorik olarak, maksimum gelişim sıcaklığı sıvı haldeki suyun kullanılabilirliği ile kısıtlı olmasına rağmen, çevrenin asitliği arttıkça, sıcaklık üst sınırlarının düştüğü bildirilmiştir (Brock, 1967).

Katalizör, kimyasal bir reaksiyonu başlatan ve bu reaksiyonun hızını etkileyen ve harcanmadan kalan bir maddedir. Katalizör, bir veya daha fazla reaktan ile kimyasal bir bağ oluşturur ve böylece reaksiyon dönüşümünü etkiler. Ancak, reaksiyon dengesi üzerinde önemli bir etkisi yoktur. Çoğu endüstriyel sentez ve neredeyse tüm biyolojik reaksiyonlar katalizör gerektirir (Gürel, 2001). Enzimler canlı ve cansız ortamdaki tepkimeleri katalize eden organik moleküllerdir. Tüm canlı organizmalarda sentezlenmektedirler. Hücre dışı aktiviteleri; kararlı ürün vermeleri, çeşitli pH ve sıcaklıkta çalışmaları nedeniyle endüstride, tıp, kozmetik, deterjan endüstrisi, deri, atık suların temizlenmesi, gıda gibi alanlarda kullanılmaktadırlar. Enzimler 20.

yüzyılda mikroorganizmalardan keşfedilmesine rağmen, izolasyonu, özelliklerinin karakterizasyonu, deneme ölçeğinde üretim ve biyo-endüstride uygulamaları ile ilgili çalışmalar sürekli ilerlemiş ve bilgiler düzenli olarak güncellenmiştir (Nigam, 2013). Günümüzde yaklaşık 4000 enzim bilinmektedir ve bunların 200'ü ticari kullanımdadır. Endüstriyel enzimlerin temel kaynağı mikroorganizmalardır. Mikroorganizmaların enzim üretiminde kullanılmasının bazı önemli avantajları vardır. Bitki ve hayvan enzimleriyle karşılaştırıldığında mikrobiyal enzimler aşırı koşullarda daha yüksek stabilite gösterebilir ve daha yüksek miktarlarda üretilirler. Dahası, mikrobiyal enzimlerin üretimi organik atıklar üzerinden düşük maliyetle gerçekleştirilebilmektedir. Öte yandan, enzim üretici mikroorganizmalar kolay ve hızlı bir şekilde taranabilmekte ve enzim üretimini artırmak için gerekli olan genetik modifikasyonlar mikroorganizmalar üzerinde daha kolay gerçekleştirilebilmektedir (Baltacı vd., 2019).

1.1. Enzimler

Enzimler, hücrelerin içinde veya dışında kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonları katalize edebilen proteinlerdir. Bunlar, substrat tipine oldukça spesifik doğal katalizörlerdir ve yüksek dönüşüm oranları ile hafif sıcaklık, basınç ve pH koşulları altında çalışırlar (Silva, ve Guidini, 2019). Dış ortamda da aktivite gösterebilen enzimler, biyoteknolojik yöntemlerle çeşitli canlı gruplarından izole edilebilmekte ve farklı endüstriyel alanlarda kullanılabilirler. Biyoteknolojinin gelişmesi ve ilerlemesi ile canlı hücrelerden elde edilen enzimler; bira üretiminde, sütçülükte, etlerin işlenmesinde, meyve şuruplarının berraklaştırılmasında, gıda alanında, yağ atıklarının parçalanması için deterjan sektöründe, deri ve dokuma sanayide, tıpta tanı ve teşhislerde, tıbbi tedavi yöntemlerinde, deterjan ve diğer kimyasal temizleyicilerin ağartma işlemlerinde büyük katkı sağlamaktadır (Şekil 1.) (Voget vd., 2006).



■ Tekstil Endüstrisi ■ Yiyecek Endüstrisi ■ Temizlik Endüstrisi
 ■ Etanol Tahıl Endüstrisi ■ Hayvan Yemi Endüstrisi

Şekil 1. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları (McAuliffe vd., 2007).

Enzimler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilir (Abdel-Fattah vd., 2008). Günümüzde endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin yaklaşık %96'sı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Aehle, 2007). Bunların yaklaşık %60'ı filamentli mantarlar, %24'ü bakteriler, %6'sı hayvanlar, %4'ü mayalar ve %2'si Streptomyces tarafından üretilir (Lowe vd., 2001). Bu kaynaklar arasında mikrobiyal enzimler, yüksek enzim verimleri, çok çeşitli katalitik aktiviteleri, mevsimsel üretim farklılıklarının olmaması sebebiyle sürekli kullanılabilirliği, genetik manipülasyon kolaylığı ve ucuz ortamlarda mikroorganizmaların hızlı büyümesi nedeniyle genellikle daha faydalı kabul edilmektedir (Bakir vd., 2017). Dünya enzim satışı yılda 2 milyar doların üzerindedir. Satışların yaklaşık yüzde 50'si deterjan, süt ve deri endüstrileri tarafından kullanılan proteolitik enzimlerden gelmektedir. Pişirme, demleme, damıtma, nişasta ve tekstil endüstrilerinde kullanılan başlıca amilazlar, izomerazlar, pektinazlar, selülazlar ve hemiselülazlar olmak üzere karbohidrazlar, toplam enzim pazarının yaklaşık %40'ını temsil etmektedir (Şekil 1. ve Tablo 1.) (McAuliffe vd., 2007). Enzimler, endüstriyel katalizörler olarak oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal katalizörlere kıyasla Tablo 1.'de listelenen avantajları sunarlar.

Tablo 1. Biyokatalizörlerin kimyasal katalizörlere göre endüstrideki avantajları (McAuliffe vd., 2007).

Biyokatalizörlerin Endüstriyel Avantajları
- Eylemde spesifiktirler ve bu nedenle istenmeyen yan reaksiyonların oluşumunu en aza indirirler.
- Ham formda kullanıldıklarında nispeten ucuzdurlar.
- Enzimlere bağlı olarak çok çeşitli koşullar altında kimyasal dönüştürmeler için etkilidirler.
- Genetik yollarla değiştirilebilir ve geliştirilebilirler.
- Nispeten toksik değildirler ve bu nedenle gıda prosesleri ve tıbbi tedavilerdeki uygulamalar için kabul edilebilirler.
- Çok çeşitli substrat konsantrasyonları için etkilidirler.

1.2. Enzimlerin Tarihçesi

Enzimatik reaksiyonların doğası bilinmemekle birlikte, tarih öncesi çağlardan beri önce gözlemlenmiş ve daha sonra da kullanılmıştır. Sütün mayalanması, alkol, şarap, sirke ve peynir üretimi için şeker fermantasyonu ve ekmeğin fermantasyonu gibi enzimatik reaksiyonlar uzun süredir bilinmekte ve kullanılmaktadır. Yunanlılar, şarap yapmak için fermantasyon kullanımının keşfini Bacchus'a bağlarlar. Bu reaksiyonlara enzimlerin neden olduğu bilinmektedir. Ancak uzun bir süre bu reaksiyonların ancak bazı mikroorganizmaların varlığı ve varlığı ile mümkün olabileceği düşünülmüştür. Payen ve Persoz, 1833'te malt ekstraktından nişastayı alkolle dönüştüren enzimi izole etti ve buna diastaz adını verdi. Aynı zaman aralığında Beaumont, mide suyunun sindirim etkisinin kimyasal bir maddeye bağlı olduğunu keşfetti ve Bchvrann bu maddeyi 1836'da izole etti ve buna pepsin adını verdi. Leuchs ve Claire Bernard'ın tükürük ve pankreas suyunun sindirim maddeleri veya mayaları üzerindeki çalışmaları da bu zaman aralığına denk gelmektedir. Louis Pasteur fermantasyonu, paslandırıcı vb. gibi kimyasal reaksiyonların canlı mikroorganizmalar tarafından meydana getirildiği gösterilmiştir. Ancak Pasteur, bu olayların ancak bozulmamış canlı hücreler tarafından meydana getirilebileceğini iddia etti. Bu nedenle fermantasyon gibi enzimatik reaksiyonlarda canlı hücrelerin varlığının esas olduğu düşünülmüştür. Ancak Büchner, fermente olan maya hücrelerini kumla ezerek hücreleri parçaladıktan ve bu karışımın yüksek basınç altında süzülerek, glikozun fermente

edilmesiyle elde edilen bu hücretsiz sıvının, fermantasyon gibi enzimatik reaksiyonlarda canlı hücrelerin varlığının şart olmadığını gösterdi. Pasteur'ün fikrinin aksine maya hücrelerinin bu reaksiyonları katalize eden bir enzim karışımı içerdiği anlaşıldı.

Enzim adını W. Kühne vermiş ve maya anlamına gelmektedir. Ancak günümüzde enzim kelimesi, kökeni ne olursa olsun tüm biyolojik katalizörler için kullanılmaktadır (Enzimler, 1965). Emil Fischer'in 1894'te başlayan müteakip çalışması, enzimatik eylemin, özellikle substrat özgülüğü kavramının daha iyi anlaşılmasına yol açtı. Eduard Buchner'in daha sonraki çalışmaları, hücretsiz bir sistemde alkolik fermentasyonu gösterdi ve bu teori ilk başta geniş çapta kabul görmese de enzimlerin sorumlu olduğunu öne sürdü. Enzimlerin protein yapısı, 1926'da James B. Sumner tarafından üreazın kristalleştirilmesi yoluyla gösterildi ve bu katkılarından dolayı 1946 Nobel Ödülü'nü aldı. Enzimin ve proteinlerin genel olarak kesin yapısı, lizozimin 3-D yapısının nihayet X ışını kristalografisi yoluyla Phillips ve çalışma arkadaşları tarafından çıkarıldığı 1965 yılına kadar belirsiz kaldı. Kimyasalların üretiminde biyokatalizin kullanımı, 1960'larda Japon Tanabe Seigaku tarafından kiral olarak saf amino asitlerin üretimi için immobilize edilmiş aminoasilazların geliştirilmesi ve 6-aminopenisilanik asit'lerin (6 APA) üretimi için penisilin asilaz uygulamasıyla ciddi ilgi görmeye başladı. 6-APA, yarı sentetik antibiyotiklerin üretiminde önemli bir ara madde. Yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) üretimi 1969'da Takasaki ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen tüm hücreleri kullanan bir toplu işlemin uygulanmasıyla başladı." HFCS'nin endüstriyel üretimi, dünya çapında en büyük biyolojik dönüşüm olmaya devam ediyor. Bu uygulamalar, proteazların artan kullanımıyla aynı zamana denk geldi. Temizlik ve endüstriyel enzimlerin üretiminde ve izolasyonunda önemli gelişmeler 1970'lerde rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışını, 1984'te Cetus Corporation'da çalışırken Kary Mullis tarafından DNA amplifikasyonu için güçlü PCR reaksiyonunun geliştirilmesi izledi. Biyotıpta devrim yaratmanın yanı sıra, bu ve diğer teknolojiler, yeni biyolojik dönüşümlerin ekonomik olarak uygulanabilir hale geldiği noktaya kadar birçok vahşi tip enzimi değiştirme ve iyileştirme kabiliyetine yol açmıştır (McAuliffe vd., 2007).

1.3. Enzimlerin İsimlendirmesi

Şu anda enzimler için iki farklı isim benimsenmiştir: geleneksel ve sistematik. Bir enzimin geleneksel veya rasyonel adı, enzimin etki ettiği madde veya reaksiyonun adının sonuna az eki getirilerek oluşturulur.

1.3.1. Geleneksel İsimlendirme

Enzimler için ilk zamanlarda genel bir tanıma uymayan pepsin, rennin, tripsin gibi isimlendirilme kullanılmıştır. Daha sonra enzimin substrat ismine –az eki getirilir ya da substratın ardından katalizlediği reaksiyon tipiyle ilgili kelime eklenerek isimlendirilir.

1.3.2 Sistematik İsimlendirme

Enzimler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komisyonu (IUBMB-EC) tarafından 4 rakamla tanımlanır.

1.4. Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

Günümüzde enzimlerin sınıflandırılması çeşitli kategorilere göre değişmektedir. Örneğin kompozisyonlarına göre; Basit enzimler ve bileşik enzimler olarak iki kısımda incelenir. Basit enzimler, sadece proteinden oluşan tek veya çoklu alt birimleri olan enzimler iken bileşik enzimler, protein alt yapısına ek olarak küçük bir organik molekül veya metal içeren enzimlerdir. Enzimleri buldukları yere göre ekzoenzimler (hücre dışı) ve endoenzimler (hücre içi) olarak sınıflandırmak mümkündür (Topal, 1985).

Enzimlerin organizmaların yaşam aktivitelerinde önemli bir yeri vardır. Enzimler metabolizmayı, beslenmeyi, enerjiyi ve diğer pek çok kimyasal reaksiyonu yönetir. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB), sınıflandırma kategorilerinin çok çeşitli olması nedeniyle karışıklığı önlemek için enzimlerin kendi adlarına ek olarak sistematik isimlerle de sınıflandırılmasını önermiş ve bu sınıflandırma enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonun tipine ve mekanizmalara göre düzenlenmiştir. Sistematik isimlendirmede enzimler katalize ettikleri reaksiyonlara göre yedi gruba ayrılırlar. Her enzimin bir kod numarası vardır. Kod numarası dışında sistematik bir isim de verilir. Bu sistematik ad, substratın adını veya tüm substratların adını içerir -az ile biten kelime, katalize edilen reaksiyonun işlevini gösterir. Bu kelime, enzimlerin 7 ana sınıfından veya alt sınıflarından birini ifade eder (Tablo 2.). Tepkime iki tür değişim içeriyorsa, ikinci işlev parantez içinde gösterilir.

Tablo 2. Enzim sınıfları ve katalizledikleri reaksiyonlar.

Enzim sınıfı	Gerçekleştirdiği reaksiyon
E.C.1. Oksidoredüktazlar	Redüksiyon ve oksidasyon bu enzimlerin tepkimeleridir. Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının katalizlendiği enzim gruplarıdır
E.C.2. Transferazlar	Alıcı ve verici molekül arasında hidrojen haricinde atomların transfer edildiği enzimlerdir.
E.C.3. Hidrolazlar	Tepkime sonucunda bir mol su katılması ile bağları hidrolize eden enzimlere denir.
E.C.3. Hidrolazlar	Tepkime sonucunda bir mol su katılması ile bağları hidrolize eden enzimlere denir.
E.C.4. Liyazlar	Bileşiklerden su molekülü çıkmadan substrat gruplarının uzaklaştırılması, çift bağların oluşturulması reaksiyonlarının gerçekleştirildiği enzimlerdir.
E.C.5. İzomerazlar	Moleküllerde değişiklik yapan ve dizilişini değiştiren enzimlere denmektedir.
E.C.6. Ligazlar	ATP veya GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının parçalanması sonucu açığa çıkan enerji ile bileşiklerin bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
E.C.7. Translokazlar	İyonların veya moleküllerin membranlar arasındaki hareketini veya bunların membranlar içindeki ayrılmasını katalize etmektedirler.

Tablo 3. Enzimlerin sınıflandırılması ve endüstriyel kullanım alanları.

Enzim sınıfı	Enzim	Görevi
Oksidoredüktazlar	Gluko oksidaz Laktaz Lipoksigenaz	Hamur güçlendirmek Meyve sularının netleştirilmesi ve bira yapımında aroma arttırmak Hamur güçlendirilmesi, ekmek beyazlatmada
Transferazlar	Siklodekstrin Glikoziltransferaz Fruktoziltransferaz Transglutaminaz	Siklodekstrin üretimi Fruktoz oligomerlerinin transferi Viskoelastik özelliklerinin modifikasyonu, hamur işleme, et işleme
Hidrolazlar	Amilaz Galaktosidaz Glukanaz Glukoamilaz İnvertaz Laktaz Lipaz Proteaz Pektinaz Peptidaz Fitaz	Nişasta sıvılaştırma Raf ömrünü artırmak ve nemli tutarak kalitesinin iyileştirilmesi Ekmeğe yumuşaklık ve hacim katılması, un ayarı Homojen maya fermantasyonunun sağlanması Suyu arıtma Düşük kalorili bira üretimi Hayvani yem olarak kullanılır Arpa ve hayvan yemi olarak kullanılan yulafın viskozite azalması, sindirimi geliştirme Sakarifikasyon Sakkaroz hidrolizi, şeker şurubu üretimi Laktozun hidrolizi, peyniraltı suyu hidrolizi Peynir tat, hamurun havalandırılması için emülsiyon, aromatik moleküllerin sentezi Proteinin hidrolizi, sütün pıhtılaşması, düşük alerjenik bebek gıdası, Süt ve peynir de lezzet iyileştirme Meyve suyu durultma Proteinin hidrolizi, peynirin olgunlaşması Fitattan fosfat serbest bırakılması, gelişmiş sindirilme
Liyazlar	Asetoasetat Dekarboksilaz	Biranın olgunlaşması
İzomerazlar	Glukoz İzomera	Glukozun fruktoza izomerasyonu

1.5. Enzimlerin Üretimi

Enzimler artık, büyük kapasiteli yüksek tonajlı işlemlerden, rafine kullanımlar için küçük ölçekli uygulamalara ve enzimlerin özel olarak kabul edildiği araştırmalara kadar çeşitli uygulamalar için üretilmektedir (Thomas vd., 2002). Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH ve sıcaklık değerleri vardır. Bu değerlerin üstünde ve altında aktivite azalır. Ancak tüm enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı değildir (Kıran vd., 2006). Diğer yandan, biyoteknolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi birçok fayda sağlar. Sıcaklığın artırılması, organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyoyararlanımı açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklıktaki artış, viskozitede bir azalmayı ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısında bir artışa neden olur. Sonuç olarak, küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızları gerçekleşir (Niehaus vd., 1999). Üretim düzeyi ve uygulama türü, üretimin süreç türünü de tanımlar. Tıpta ve sağlık ürünlerinde kullanılacak özel enzimler genellikle yüksek saflık seviyelerinde oldukça küçük miktarlarda gerekirken, gıda, yem, kumaş ve yakıtın toplu üretiminde kullanılan enzimler genellikle oldukça ham müstahzarlar (hazır ilaç) olarak yüksek oranda üretilir. Büyük ölçekli işlemler için in mobilize enzimlerin artan kullanımı, daha saf enzim preparatlarına olan talebi artırmaktadır.

Üretim süreci, enzimin kaynağına ve lokalizasyonuna bağlıdır. Bitki ve hayvan kaynaklı enzimler, ilgili dokulardan basitçe ekstrakte edilebilir veya ilgili sıvılardan geri kazanılabilir. Mikrobiyal enzimler ise genellikle fermentasyon yoluyla üretilir veya kullanılmış fermantasyon ortamından (hücre dışı enzimler) ya da hücre yırtılması veya geçirgenleştirme yoluyla ekstraksiyondan sonra hücre macunundan geri kazanılır (Aehle, 2007).

Üretim sürecini dört aşamaya ayırabiliriz:

1. **Enzim sentezi:** Üreten hücrelerin çoğalma ve yayılma aşamasını temsil eder.
2. **Enzim geri kazanımı:** Enzimin üretici hücre sisteminden ekstraksiyonunu temsil eder ve katı-sıvı ayırıklarını, hücre ekstraksiyonunu ve/veya konsantrasyonunu içerir.
3. **Enzim saflaştırması:** Enzim geri kazanımından sonra istenmeyen kirleticileri (esas olarak eşlik eden proteinler) ortadan kaldırmayı amaçlayan bir dizi işlemi temsil eder.
4. **Enzim ürün formülasyonu:** Enzim ürününe nihai sunumunu vermeyi amaçlayan farklı işlemlerden oluşur; son işlemlerini, stabilizasyonu ve standardizasyonu içerir.

1.6. Lipazlar

Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar, E.C. 3.1.1.3), trigliseritlerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolizini katalize eden hidrolazlardır. Ek olarak lipazlar, diğer esterlerin hidrolizini ve transesterifikasyonunu ve ayrıca esterlerin sentezini katalize eder ve enantioselektif özellikler sergiler (Singh ve Mukhopadhyay 2012). Lipazların doğal substratları olan uzun zincirli yağ asitlerinin gliserin esterleri suda az çözünür. Lipazlar, enzimin çözündüğü sulu faz ile su ile karışmayan substrat fazı arasındaki ara yüzde ester bağlarının hidrolizini katalize eder. Lipazlar suda çözünür esterlere karşı çok düşük aktiviteye sahiptir (Eren, 2002). Lipazlar deterjan, oleokimyasal, organik sentez, mandıra, katı ve sıvı yağ modifikasyonu, farmasötik gibi çok çeşitli endüstrilerde çeşitli uygulamalara sahiptirler (Gupta vd., 2007).

Lipazlar bitki, hayvan ve mikrobiyal kökenlidir, ancak mikrobiyal lipazlar endüstriyel düzeyde üretilir ve daha yüksek katalitik aktivite, mevsimsel değişikliklerden bağımsız üretim, genetik manipülasyon kolaylığı nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda ve organik kimyada en yaygın kullanılan enzim sınıfını temsil ederler. İstenen özellikler, toplu miktarda üretim ve daha ucuz yetiştirme kültürü ortamının kullanımı, genetik ve çevresel manipülasyon kolaylığı, mikrobiyal lipazların üretimi için, çeşitli katalitik aktivitelerle değiştirilmiş enzim üretmemize izin verip fayda sağlamaktadır. Bakteriyel lipazlar hücre içi, hücre dışı veya zara bağlı olabilir. Çeşitli kaynaklardan lipaz üretiminin çeşitli yönleri ve uygulamaları hakkında kapsamlı çalışmalar yapılmıştır ve halen yapılmaktadır (Javed vd., 2018).

1.6.1. Mikrobiyal Lipazlar

Mikrobiyal lipazların çoğu ticari olarak mantarlardan, mayalardan ve bakterilerden elde edilir. Lipazların izolasyonu için yeni kaynaklar, geniş pH aralığına ve yüksek termal stabiliteye dayanma yetenekleri nedeniyle geniş uygulamalar için aranmaktadır. Bu anlamda bakteriyel lipazlar, diğer mikroorganizmalardan ekstrakte edilen lipazlara kıyasla daha yüksek sıcaklıklarda daha kararlı ve geniş bir pH aralığına toleranslı oldukları için önem kazanmıştır. Bu nedenle, organizmaların uygun şekilde taranması, saflaştırılması ve karakterizasyonu, oldukça aktif ve kararlı lipaz üretimi için önemli hale gelmiştir. Şimdiye kadar çok sayıda lipaz üreten bakteri kaynağı bilinmesine rağmen, sadece birkaçı ticari olarak kullanılmaktadır. Bunlardan en önemli olanları; *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* ve *Pseudomonas* bakterisi türleridir. Bunlar arasında,

Pseudomonas'tan elde edilen lipazlar, farklı özelliklerine bağlı olarak ticari önemleri nedeniyle çeşitli biyoteknolojik ve katalitik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Ramani vd., 2010). Kullanılan çeşitli bakteriyel lipazlar arasında, *Pseudomonas* ve *Burkholderia* cinslerinden olanlar, sıcaklık kararlılığı, yüksek enantiyo-seçicilik ve daha geniş pH aralığında aktivite gibi özelliklere sahip olması nedeniyle her iki bakteri grubunun da ürettiği enzimlerin endüstriyel kullanımı daha çok tercih edilmektedir. Bu nedenle *Pseudomonas sp.* kullanılarak elde edilen lipaz üretimi konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Günümüzde büyük bir problem olan endüstriyel atık malzeme olarak atılan lipit substratlardan ve lipid içeren katı atıklardan lipolitik enzimlerin üretilmesi çevre dostu bir teknolojinin geliştirilmesine yol açabilir (Gupta vd., 2004). Bu sebeple yüksek stabiliteye sahip lipaz enzimi üreten bakterilerin karakterizasyon ve saflaştırılma işlemleri bu endüstriyel soruna yeni bir umut olabilir.

1.6.2. Termofilik Bakterilerde Lipaz Enzimi

Termofilik bakteriler, toprakta ve volkanik habitatlarda yaygındır ve sınırlı bir yaşam alanına sahiptirler. Yine de tüm ana besin öğelerini tüketirler ve mezofilik bakterilerle aynı substratları metabolize ederler. 60°C'nin oldukça üzerindeki optimum büyüme sıcaklığında çoğala bilirler, bu özellikleri son derece termal olarak kararlı biyo moleküller ile ilişkilidir. Yüksek sıcaklıkta büyüme ve benzersiz biyo moleküllerinin varlığının bir sonucu olarak, termofilik bakteriler, benzer mezofilik türlere göre yüksek metabolik hızlara, fiziksel ve kimyasal olarak kararlı enzimlere ve daha düşük büyümeye ancak daha yüksek son ürün verimine sahip olabilir (Zeikus, 1979). 50°C ile 80°C arasındaki sıcaklıklarda gelişen termofilik mikroorganizmalar (örneğin: *Geobacillus*, *Alycyclobacillus*, *Anoxybacillus*) tarafından sentezlenen enzimler, endüstriyel biyokatalizde bulunan çeşitli engellerin üstesinden gelmek için bize bir alternatif sunar. Örneğin, termofilik enzimler (genellikle termozimler olarak adlandırılır) daha sağlamdır ve aynı zamanda hem termostabil hem de termoaktiftir, bu da onların yüksek sıcaklıktaki biyoproseslerde en iyi şekilde performans göstermelerini sağlar (Zhang vd., 2016). Ayrıca, çoğu endüstriyel uygulamada bulunan koşullar olan yüksek basınç ve protein denatüre edici çözücülere karşı genellikle toleranslıdır. Bu özellikler onları mezofilik benzerlerinden üstün kılar. Endüstriyel işlemlerde daha yüksek sıcaklıkların kullanılması ayrıca substrat ve ürün çözünürlüğünü artırır, hidroliz süresini azaltır ve mikrobiyal kontaminasyon riskini en aza indirir. Bu nedenlerle, termostabil enzimler biyokatalizör olarak özellikle arzu edilir (Atalah vd.,2019). İlginç bir şekilde, mezofilik

konakçılarda klonlanıp eksprese edildiğinde, termozimler, ebeveyn suşları ve konakçı arasındaki filogenetik mesafeye rağmen, bu özelliklerin genetik olarak kodlandığını gösteren termal özellikler genellikle korunmaktadır (Vieille ve Zeikus, 2001).

1.6.3. Bakteriyel Lipaz Enziminin Karakterizasyonu

Literatürde mevcut olan filogenetik analizler bakteriyel lipazlar arasında geniş çapta çeşitlilik olduğunu göstermektedir. Yağ asidi yan zincirlerinde C2 ila C16 (p-NP asetat ila p-NP palmitat) sahip çeşitli p-Nitrofenil (p-NP) esterleri, bakteriyel lipazlar tarafından hidrolize edilebilir. Bakteriyel lipazların çalışma sıcaklıklarının ve pH'larının optimum koşulları sırasıyla 15-70 °C ve 5.0-10,8 olarak belirtilmiştir. Lipaz aktivitesi açısından bu optimum koşullar bakterilerin türü ve büyüme koşulları ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Yüzey hidrofobikliği, enzim aktivitesi, organik çözücülerde ve yüksek sıcaklıkta stabilite, proteolitik direnç ve substrat toleransı, mühendislikle geliştirilmiş bakteriyel lipazların özellikleridir (Javed vd., 2018).

1.6.4. Bakteriyel Lipazların Fizikokimyasal Özellikleri

Yakın zamanda incelenen (2010–2017) bakteriyel lipazların fizikokimyasal özellikleri Tablo 4'te özetlenmiştir. Bu çalışmalardan *Halobacillus* sp LY5 suşu ve *Pseudomonas gessardii* dışındaki tüm bakteriyel lipazların 70 kDa'dan daha az molar kütleyle sahip olduğu sonucuna varılabilir (Xin vd., 2012, Ramani vd., 2010). Gricajeva vd., (2016) ve Ramakrishnan vd. (2016) tarafından yapılan çalışmalarda sırasıyla *Bacillus stratosphericus* ve *Enterococcus faecium*'dan alınan lipazlar için minimum 19 ve 19.2 kDa'lık bir molar kütle gözlemlenmiştir. Tablo 4'te özetlendiği gibi *Pseudomonas gessardii*, *Spirulina platensis* ve *Bacillus pumilus* RK31'den elde edilen lipazlar, asidik pH'da optimal olarak çalışırken, diğer tüm bakteriyel lipazlar alkali pH'ta çalışmaktadır.

Tablo 4. Son zamanlarda çalışılan bakteriyel lipazların fizikokimyasal özellikleri.

Bakteriyel Suş	Bakteriyel Lipaz Enzimi			
	Kütle (kDa)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>Halobacillus sp. strain LY5</i>	96	10,0	50	(Xin vd., 2012)
<i>Pseudomonas gessardii</i>	92	5,0	30	(Ramani vd., 2010)
<i>Bacillus stratosphericus</i>	19	9,0	35	(Gricajeva vd., 2016)
<i>Enterococcus faecium</i>	19.2	10,8	40	(Ramakrishnan vd., 2016)
<i>Spirulina platensis</i>	45	6,5	45	(Demir ve Tükel, 2010)
<i>Bacillus pumilus</i>	27	8,0	45	(Faouzi vd., 2015)
<i>Streptomyces lividans</i>	31,43	8,0	50	(Wang vd., 2016)

2. KAYNAK ÖZETİ

Şimdiye kadar bir dizi termofilik lipaz üreten bakteri tanımlanmıştır. Janssen vd. (1994) biyoteknolojik uygulamalarla termostabil enzimleri araştırırken, tek karbon kaynağı olarak bir trigliserit kullanarak lipaz üreten bir termofilik bakteri izole etmişlerdir. Bu çalışmada yeni izole edilmiş son derece termofilik *Bacillus* sp. Yeni Zelanda'nın Kuzey Adası'ndaki Waimangu termal alanından izole edilmiştir. Bu bakterinin 70 °C'de tripalmitin ve diğer trigliseritler üzerinde büyüebildiği ve 70 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 12 dakika yarılanma ömrüne sahip bir p-nitrofenil-palmitat esteraz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Janssen vd., 1994).

Schmidt-Dannert vd. (1994)'ün çalışmasında, lipaz aktivitesi, substrat olarak keten tohumu yağı, balık yağı, triolein, soya fasulyesi yağı ve zeytinyağı ile ölçülmüştür. pH-stat testi sırasında keten tohumu yağı ile %155, soya fasulyesi yağı ile %113, balık yağı ile %89 ve triolein ile %87 (% 100 = zeytinyağı ile aktivite) seviyesinde enzim aktivitesi gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre, lipazın özellikleri şu şekilde özetlenebilir; yüksek çalışma sıcaklığı, iyi stabilite, kolay ve ucuz immobilizasyon ve özellikle immobilize formdaki organik solventlere karşı yüksek stabilite özellikleri lipazı teknik uygulamalar için iyi bir aday yapmaktır (Schmidt-Dannert vd., 1994).

Chiş vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışma, *E. coli*'de klonlanmış ve aşırı hücre dışı esteraz/lipaz eksprese eden yerel bir *Anoxybacillus flavithermus* suşu tanımlamıştır. *Anoxybacillus flavithermus*, geniş bir sıcaklık aralığında (30-72°C) büyüyen, fakültatif olarak aerobik, endospor oluşturan, orta derecede termofilik Gram pozitif bir çubuk olarak tanımlanır (Heinen vd., 1982). Saflaştırılmış rekombinant enzimin, aminoasit dizisi, yapısal özellikler ve biyokimyasal özellikler açısından diğer birkaç termostabil *Anoxybacillus* ve *Geobacillus*'un karboksil esteraz enzimlerine çok benzer bir dizilime sahip olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada karakterize edilen *A. flavithermus* T1 Esteraz/Lipaz dahil olmak üzere bu ailedeki ilgili esterazların kısa bir karşılaştırması, bunların yaklaşık 245-249 amino asit kalıntısı dizisini paylaştıklarını, moleküler ağırlık yaklaşık 25-30 kDa ve optimum çalışma sıcaklıklarının 60-65 °C olduğu gösterilmiştir. En çok 60-65 °C'de ve nötre yakın aralıkta (pH 6,5-8) aktif olan saflaştırılmış ekstrasellüler esteraz/lipaz enzimi, 60°C'de yaklaşık 5 saatlik bir yarı ömür sergilemiştir. Ayrıca, bu enzimin metanol, DMSO, asetonitril gibi çözücülere yakın bir tolerans sergilediği ve düşük konsantrasyondaki deterjanlar (SDS, Triton) ile termostabilitesinin arttığı

rapor edilmiştir. En yüksek aktivite p-nitrofenil bütirat ile elde edilmiş, ancak enzim triolein gibi aynı zamanda uzun zincirli yağ asidi esterlerini de hidrolize edebilmiştir. (Chiş vd., 2013).

Bakir ve Metin, (2015) yaptıkları çalışmada, Aydın/Türkiye'deki doğal kaplıcalardan izole edilen ve Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü kültür stoklarına kayıtlı 201 termofilik bakteriyi kullanmışlardır. Bu bakterilerin 43'ünün lipolitik aktivite, 22'sinin ise lipaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada 22 izolatın lipaz pozitif olduğu saptanmış ve LB broth ortamında büyütülerek kantitatif lipaz aktiviteleri saptanmıştır. HBB 134 suşu 19,925 U/mL lipaz aktivitesi ile en iyi lipaz üreten izolat olarak seçilmiştir. 16S rRNA dizilerine göre izolatın *Anoxybacillus flavithermus* ile maksimum benzerlik (%99) gösterdiği tespit edilmiştir. HBB 134'ten elde edilen en iyi enzim üretimi ise karbon kaynağı olarak %0,5 zeytinyağı ve nitrojen kaynağı olarak %0,5 pepton içeren ortamda, pH 6,50 ve 45 °C'de belirlenmiştir. HBB 134 izolatı optimum kültür koşullarında büyütüldüğünde, lipaz üretiminin logaritmik büyüme fazının başlangıcında başladığı ve logaritmik fazın ortasında (12 saat) maksimum seviyeye ulaştığını ortaya koymuşlardır (Bakir ve Metin, 2015).

Aynı çalışma grubunun 2016 yılındaki çalışmasında, *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 kaynaklı bir hücre içi lipazını, 7,4 kata kadar saflaştırmıştır. Enzimin moleküler kütlelerinin yaklaşık 64 kDa olduğu tespit edilmiştir. Enzimin maksimum aktivitesi pH 9,0 ve 50 °C'de olduğunu saptanmıştır. Enzim pH 6,0 ile 11,0 arasında 25 °C, 40 °C ve 50 °C'de 24 saat boyunca stablitesini koruyabildiği ortaya konulmuştur. Substrat olarak p-nitrofenil laurat (pNPL) kullanıldığında enzimin Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0,084 mM ve 500 U/mg olarak tespit edilmiştir. Gliserol, sorbitol ve mannitol, enzim termostabilitesini arttırdığını ve enzimin aseton, etil asetat ve dietil etere karşı oldukça kararlı olduğunu belirten bulgular elde etmişlerdir. Uzun zincirli triaçilgliseroller tercih ettiği için enzimin gerçek bir lipaz olduğu varsayılmıştır (Bakir ve Metin, 2016).

Bakir ve Metin, (2017) yaptıkları çalışmada, termofilik *Anoxybacillus* sp.'nin lipaz üretim karakterizasyonu için ortam bileşenleri (karbon ve azot kaynakları), başlangıç pH'ı ve inkübasyon sıcaklığını incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, HBB16'nın geniş bir sıcaklık ve pH aralığında (45-55 °C ve pH 6,5–7,5 arası) etkin bir şekilde lipaz üretebildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, çalkalama hızı ve et özü konsantrasyonunun lipaz üretimini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, alternatif endüstriyel atıklar enzimlerin ve mikroorganizmalardan elde edilen enzim ürünlerinin üretim maliyetlerini azaltmak için önemli bir kaynak oluşturabileceği varsayılmaktadır. HBB16 suşunda lipazın maksimum aktivitesinin 55 °C'de ve pH 9,5'te meydana geldiğini gösteren sonuçlar, enzimin

çeşitli endüstriyel işlemler ve uygulamalar için faydalı olabileceğini göstermiştir (Bakir ve Metin, 2017).

Shahinyan vd. (2017) lipaz üreten termofilik basillerin dağılımını ve spesifik lipaz proteininin birincil yapılarını incelemek için Ermenistan ve Dağlık Karabağ topraklarındaki mezotermal (27,5-70 °C) kaynaklardan farklı cinslerden üç lipaz üretici bakteri izole etmişlerdir. Fenotipik özelliklerinin ve 16S rRNA gen dizilimi sonuçlarına göre izolatlar *Geobacillus* sp., *Bacillus licheniformis* ve *Anoxybacillus flavithermus* suşları olarak tanımlamıştır. Yaptıkları çeşitli çalışmalarla Ermenistan'da, Yeni Zelanda'da bir jeotermal kaynak ya da Tayvan'da kompost olsun, çevreden bağımsız olarak lipazların termostabilitesinin evriminin çok benzer bir örüntüye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Shahinyan vd., 2017).

Yadav vd. (2018) yaptıkları çalışmada Nepal'in Myagdi ilçesinde bulunan Sinkosh, Singha, Bhurung, Ratopani ve Paudwar adlı beş kaplıcadan izole ettikleri termofilik bakterileri fenotipik ve genotipik yöntemler kullanarak tanımlayıp, karakterize etmişlerdir. Seçtikleri suşları, termostabil enzimler için taramışlardır. Bakteriler morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre 16 gruba ayrılmıştır. Dahası, 16 izolatın 16S rRNA dizi analizi ve filogenetik analizi ise beş farklı taksonomik gruba ayrılmıştır. Gruplar, referans suşlarla \geq %95 benzerlik temelinde *Anoxybacillus*, *Aeribacillus*, *Brevibacillus*, *Bacillus* ve *Geobacillus* cinsleri olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma Nepal'in kaplıcalarından, *Anoxybacillus* sp. *Brevibacillus* sp. ve *Aeribacillus* sp.'yi bildiren ilk çalışmadır (Yadav vd., 2018).

Sahoo vd. (2020) lipaz bazlı formülasyonlar üzerine yaptıkları çalışmalarda öncelikle termo-kararlı bir *Anoxybacillus* sp. türünü (ARS-1) Hindistan, Taptapani Hotspring'den izole etmişlerdir. Daha sonra, bu enzimi hardallı keki kullanılarak katı substrat fermantasyonu (KSF) ile dört bağımsız değişken (sıcaklık, pH, % nem ve biyo-yüzey aktif madde) altında istatistiksel model merkezi kompozit tasarımı (CCD) kullanılarak optimum lipaz üretimi için karakterize etmişlerdir. Taptapani kaplıcasından elde edilen endüstriyel olarak uygun termostabil (57, 50 °C) ve alkali stabil (pH 8,31) özelliklere sahip *Anoxybacillus* sp. izolatının yapılan istatistiksel modelleme çalışmalarına göre ekonomik olarak uygun lipaz üretimi sağladığı gösterilmiştir. ARS-1 tarafından üretilen lipazın, hemen hemen tüm kimyasal deterjanlara ve ayrıca yaygın çamaşır deterjanına direnç gösterdiğini kanıtlamışlardır (Sahoo vd., 2020).

Yusoff vd. (2020) gram-pozitif çubuk ve endospor oluşturan bakterilerden petrolü katalizleyen enzimler elde edilebileceğini gösterdiler. Karbon kaynağı olarak ham petrolü kullanan *Geobacillus* sp.'nin hücre dışı ve hücre içi alkan hidroksilaz analizi sonuçlarına göre

bazı alkali enzimlerin hücre dışına atıldıktan sonra hücrelerin dışında asitlerle karşılaştığında bozulduğunu gösteren sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmalarında, *A. geothermalis* tarafından ham petrol degradasyonu ilk kez rapor edilmiştir. Bu izolatlar ve biyoremediasyon potansiyelleri hakkında tam bilgi sahibi olmak için, daha ileri karakterizasyon ve yollar, üretilen enzimler ve gen ifadeleri ile ilgili çalışmaların gelecekte yapılması gerektiği belirtilmiştir (Yusoff vd., 2020).

Louhasakul ve Cheirsilp, (2022) yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri mikrobiyal lipid ve lipaz için fermente edilebilir bir karbon kaynağı olarak ham gliserolün potansiyel kullanımına olanak sağlayabileceğini bulmuşlardır. Ayrıca hem lipit hem de lipazın, biyodizel besleme stoğu ve katalizör olarak uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir. Daha da önemlisi, yüksek dönüşüm verimi ile 100 °C'nin altında gerçekleştirilebilen doğrudan transesterifikasyon için umut verici bir uygulama olduğunu belirtmişlerdir. Biyodizel üretiminin sürdürülebilir, ekonomik ve ticarileştirilmesi için mikrobiyal lipazların kullanılabilirliğini ortaya koymuşlardır (Louhasakul ve Cheirsilp, 2022).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Tablo 5. Kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasal adı	Katalog No
4-Mitrophenyl dodecanoate (p-NLP)	61716
Agar	05039
Arabigam	1.04228.1000
Etanol	1.00986.2500
Galaktoz	48263
Kazain	22090
LB Broth	L3022
Maltoz	M2250
Maya Özütü	1.03753.0500
Mısır yağı	C-8267
NaCl	31434
Nişasta	85654
Olive Oil	7534
Pepton-1	1.07228.0500
Pepton-2	77199
Sukroz	1.0751.100
Süt tozu	70166
Triptone	16922
Tributirin	t-7752
Triolein	T-7752
Na ₂ CO ₃	969.023.1000

3.2. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan termofilik *Anoxybacillus* sp. HBB229 suşu daha önceden Aydın/Türkiye termal su kaynaklarından Biyoloji Bölümü Biyokimya laboratuvar ekibi tarafından izole edilmiştir. Bakteri stoğu çalışmaya başlamadan önce, içeriği Tablo 6’te verilen Luria-Bertani (LB) agar ortamında 50 °C’ de 24 saat geliştirilmiştir. Bakteri stokları daha sonra steril koşullarda %20’lik skim milk çözeltilisi içeren cryotüplere aktarıldı. Sonraki denemelerde kullanmak için ADÜ Biyoloji Bölümü Biyokimya laboratuvarında -80 °C’de saklandı.

Tablo 6. Luria-BERTANİ Agar ortam içeriği.

Kimyasal madde	Miktarı
Tripton	%1
Yaest ekstrakt	%0,5
NaCl	%1
Agar	%1,5
15 dakika 121 °C’de steril edildi.	

3.3. Kantitatif Lipaz Aktivite Tayini

Kantitatif lipaz aktivite tayininde substrat olarak kullanılacak olan p-NPL (p-nitrofenil laurat) etanolde 10 mM konsantrasyonda hazırlandı. Reaksiyon karışımına final konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde eklendi. Optimum koşullar belirlenmeden önce ortam bilşenleri Tablo 7’de gösterildiği gibi hazırlandı. 30 dakika, 50 °C’de inkübasyona bırakıldı. Optimum koşullar belirlendikten sonra ise Tablo 8’deki reaksiyon bileşenleri hazırlandı. 30 dakika boyunca belirlenen optimum sıcaklık olan 55 °C’de inkübasyona bırakıldı. Her iki durumda da enzim aktivitesini durdurmak için 0,25 mL 0,1 M Na₂CO₃ kullanıldı. Ardından +4 °C’de 15 dk. boyunca 13.000 x g’de santrifüj (Heraeus-Biofuge pico, Germany) edildi. Sonrasında spektrofotometrik olarak kantitatif lipaz aktivite tayini yapıldı. Spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japan) ölçüm yapılırken 410nm’de absorbans ölçümü köre karşı yapıldı (Sigurgisladottir vd.,1993).

Tablo 7. Lipaz aktivite tayininde kullanılan ortamın bileşenleri.

Örnek	Kör
800 µL Glisin-NaOH (50 mM, pH 8,50)	800 µL Glisin-NaOH (50 mM, pH 8,50)
100 µL Enzim çözelti	100 µL LB Broth
100 µL pNPL (10 mM, etanolde)	100 µL pNPL (10 mM, etanolde)
55 °C' de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.	
Reaksiyonu durdurmak için 250 µL 0,1 M Na ₂ CO ₃ eklendi.	
13.000 x g' de 15 dk santrifüj edildi.	
410 nm' de spektrofotometrede ölçüldü.	

Tablo 8. Optimum koşullar belirlendikten sonra lipaz aktivite tayininde kullanılan ortamın bileşenleri

Örnek	Kör
800 µL Glisin-NaOH (50 mM, pH 9,00)	800 µL Glisin-NaOH (50 mM, pH 9,00)
100 µL Enzim çözelti	100 µL LB Broth
100 µL pNPL (1 mM, etanolde)	100 µL pNPL (1 mM, etanolde)
55 °C' de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.	
Reaksiyonu durdurmak için 250 µL 0,1 M Na ₂ CO ₃ eklendi.	
13.000 x g' de 15 dk santrifüj edildi.	
410 nm' de spektrofotometrede ölçüldü.	

Ünite: Reaksiyon koşulları altında 1 dakikada pNP-laurattan 1µmol p-nitrofenol oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak belirtilmiştir.

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra Volüm Aktivitenin hesaplanması için kullanılan formül aşağıdadır.

$$VA = \left(\frac{V}{l \cdot \epsilon \cdot v \cdot t} \cdot A \right) \cdot SF$$

$$SA = \frac{VA}{\text{mg protein/mL}}$$

- SA** : Spesifik Aktivite (U/mg)
VA : Volum Aktivite (U/mL)
V : Reaksiyon Hacmi (mL)
l : Işık Yolu (1cm)
 ϵ : Molar Absorbans Katsayısı (mM⁻¹ cm⁻¹)
v : Örnek Hacmi (mL)
t : İnkübasyon Zamanı (30 dk)
A : Absorbans
SF : Seyreltme Faktörü

3.4. Kültür Koşullarının *Anoxybacillus* sp. HBB229 Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

3.4.1. Başlangıç pH'nın Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

Fermantasyon parametrelinden biri olan pH'nın enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için pH 4,00-10,50 arasındaki pH'larda 1 birim kademeli olarak artırılarak enzim üretim ortamı ayarlandı. HBB229 suşunun stok kültüründen LB broth içeren tüpe inoküle edilerek bir gece inkübe edildi. Gecelik kültürün absorbansı 600 nm'de 0,1 olacak şekilde (yaklaşık olarak 8×10^7 hücre/mL) ayarlandı ve 50 mL enzim üretim ortamı içeren 250 mL'lik erlenlere %1 oranında inoküle edildi. Kültürler 50 °C sıcaklıkta, 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerde lipaz aktivitesi ve hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.4.2. İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

Fermantasyon parametrelinden biri olan sıcaklığın enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için 30-80 °C arasındaki sıcaklıklarda 5 birim kademeli olarak artırılarak önceden belirlenen optimum pH 8,00'de üretim ortamı hazırlandı. HBB229 suşunun stok kültüründen LB broth içeren tüpe inoküle edilerek bir gece inkübe edildi. Gecelik kültürün absorbansı 600

nm’de 0,1 olacak şekilde ayarlandı ve 50 mL enzim üretim ortamı içeren 250 mL’lik erlenlere %1 oranında inoküle edildi. Kültürler farklı sıcaklıklarda, 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerde lipaz aktivitesi ve hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.4.3. Lipaz Üretimi Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi

Enzim üretimi üzerine çeşitli karbon kaynaklarının etkisini saptamak için karbon kaynakları (galaktoz, nişasta, sukroz, glikoz, laktoz, maltoz), ticari olarak satılan bazı yağlar zeytin yağı (geleneksel üretim), ayçiçek yağı (ticari), pamuk yağı (ticari), mısır yağı (ticari), fındık yağı (ticari) ve analitik saflıktaki yağlar (mısır yağı, pamuk yağı, mısır yağı, soya yağı, triolein) kullanıldı. Denenen tüm karbon kaynakları için yağ içermeyen besi yerlerine LB broth yağ içerenlere ise %0,5 g gum arabic içeren LB broth ortamı kullanıldı (Tablo 9). %0,5 oranlarında denenen tüm karbon kaynaklarından besi ortamına eklendi. Yağ içeren final konsantrasyonları diğer ortamlardan farklı olarak karıştırıcının (WARING, Commercial Blender 8011ES, USA) maksimum hızında 3 dakika emülsifiye edildi. Denenen tüm karbon kaynakları otoklavda 121 °C’de 15 dakika boyunca sterilize edildi.

HBB229 suşunun stok kültüründen LB broth içeren tüpe inoküle edilerek 55 °C’deki etüvde (Incucell-MMM, Germany) bir gece inkübe edildi ve gecelik kültürün absorbansı 600 nm’de 0,1 olacak şekilde ayarlanıp 50 mL besi ortamı içeren 250 mL’lik erlenlere %1 oranında inoküle edildi. Kültürler 50 °C’deki inkübatörde (Newbrunswick Scientific Innova 43) 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerde lipaz aktivitesi ve hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Tablo 9. Yağ içeren karbon kaynakları denemelerinde kullanılan kontrol besiyeri.

Kimyasal madde	Miktarı
LB	%2
Arabic gum	%0,5
pH 8.00	
121 °C’de 15 dakika sterilizasyon	

3.4.4. Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

Çeşitli azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak için LB ortamındaki yeast ekstrakt ve tripton çıkarıldı. Yerine çeşitli organik azot kaynaklarından (sikimilk, casein hidrozoat, pepton, yeast extract, tripton) %1 oranında eklendi (Tablo 10). Böylece en iyi enzim üretimini sağlayan azot kaynağı belirlendi. %1 oranlarında denenen tüm azot kaynaklarından besi ortamına eklendi. LB broth içeren tüpe stok kültürden inoküle edildi ve bir gece inkübe edildi. Gecelik kültürün absorbansı 600 nm’de 0,1 olacak şekilde (yaklaşık olarak 8×10^7 hücre/mL) ayarlandı. İnkübasyon sonunda kültürlerde lipaz aktivitesi ve hücre yoğunluğu (OD_{600}) spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Tablo 10. Azot kaynağı denemelerinde kullanılan besi ortamı.

Kimyasal madde	Miktarı
Azot kaynağı	%1
Maltoz	%0,5
NaCl	%0,5
pH 8.00	
121 °C’de 15 dakika sterilizasyon	

Fermentasyon koşullarının optimum olduğu karbon ve azot kaynakları oranları ile belirlenir. Bundan sonra yapılan tüm denemelerde maksimum enzim üretimi elde etmek için bu ortam kullanılmıştır.

3.4.5. İnkübasyon Süresinin Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

İnkübasyon süresinin enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla HBB229 suşu belirlenen optimum koşullarda (pH 8,00 ve 50 °C) 150 rpm hızda çalkalamalı olarak bir gün boyunca geliştirildi. Her 3 saatte bir kültürden örnek alındı. Spektrofotometri cihazı ile enzim aktivitesi ölçüldü ardından volüm aktivitesi hesaplandı ve grafiği çizildi.

3.5. *Anoxybacillus* sp. HBB229 Lipazının Karakterizasyonu

3.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 50°C deki sıcak su banyosunda (Poly science 911, USA) pH 4,00-10,00 arasındaki değerlerde 0.5 birim aralıklarla tampon çözeltiler hazırlandı. McIlvaine (sitrik asit- Na_2HPO_4) tamponunu pH 4,00-7,00 için, Tris-HCl tamponunu pH 7,50-8,50 için ve Glisin-NaOH tamponunu ise pH 9,00-10,00 arasında yapılacak denemeler için hazırlandı. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. pNPL nin farklı pH'lardaki molar absorpsiyon katsayıları kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

3.5.2 Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için pH 8,50'da hazırlanan Tris-HCl tamponları, 10-75 °C arasındaki sıcaklıklarda ayarlanarak kullanıldı. Enzim aktivitesi, standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak tek değişkenin sıcaklık parametresi olduğu denemeler ile tayin edildi.

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

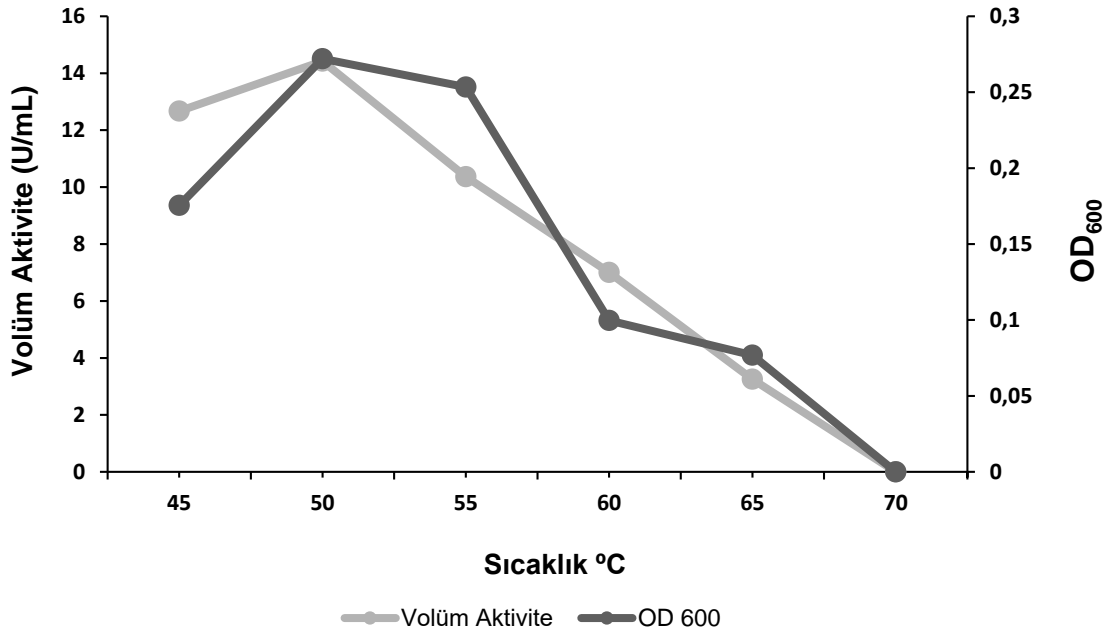
Tüm denemeler üç tekrarlı olarak yapıldı. Gruplar arasındaki farkı anlamak ve bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirleyebilmek için ANOVA Post hoc testlerinden Tukey ve Duncan Testi yapıldı (IBM SPSS sürüm 25).

4. BULGULAR

4.1. Besi Ortamının *Anoxybacillus* sp. HBB229'un Lipaz Üretimine Etkisi

4.1.1. Besiyeri Sıcaklığı

Lipaz enzim üretimi üzerine sıcaklığın etkisine bakmak için 30-80 °C arasındaki değerlerde *Anoxybacillus* sp. HBB229 suşu 24 saat inkübasyona bırakıldı. OD₆₀₀ ve enzim aktiviteleri ölçüldü. 45 °C'nin altında, 70 °C ve üzerinde üreme gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçülememiştir. OD₆₀₀ (0,27 absorbans) ve volüm aktivite ölçümlerine (14,42 U/mL) göre optimum sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiştir. 50 °C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir (Tablo 11, Şekil 2).



Şekil 2. Besiyeri sıcaklığının *Anoxybacillus* sp. HBB229 bakterisi üremesi ve lipaz üretimine etkisi.

Tablo 11. Besiyeri sıcaklığının *Anoxybacillus* sp. HBB229 bakteri üremesi ve lipaz üretimine etkisi.

Besiyeri sıcaklığı	OD ₆₀₀ (ORT. ± S.H.)	X	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X
45	0,17 ± 0,02	b	14,42 ± 0,10	a
50	0,27 ± 0,03	a	14,42 ± 0,10	a
55	0,26 ± 0,01	a	11,95 ± 3,15	b
60	0,10 ± 0,02	c	7,00 ± 1,54	c
65	0,13 ± 0,05	c	3,25 ± 0,32	d
70	-	-	-	-
	Pooled StDev = 0,03		Pooled StDev = 1,58	

ORT.: her veri üç tekrarın ortalamasıdır.
S.H.: Standart hata.
X: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile en iyi aktivite gösteren arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. (p<0,05)

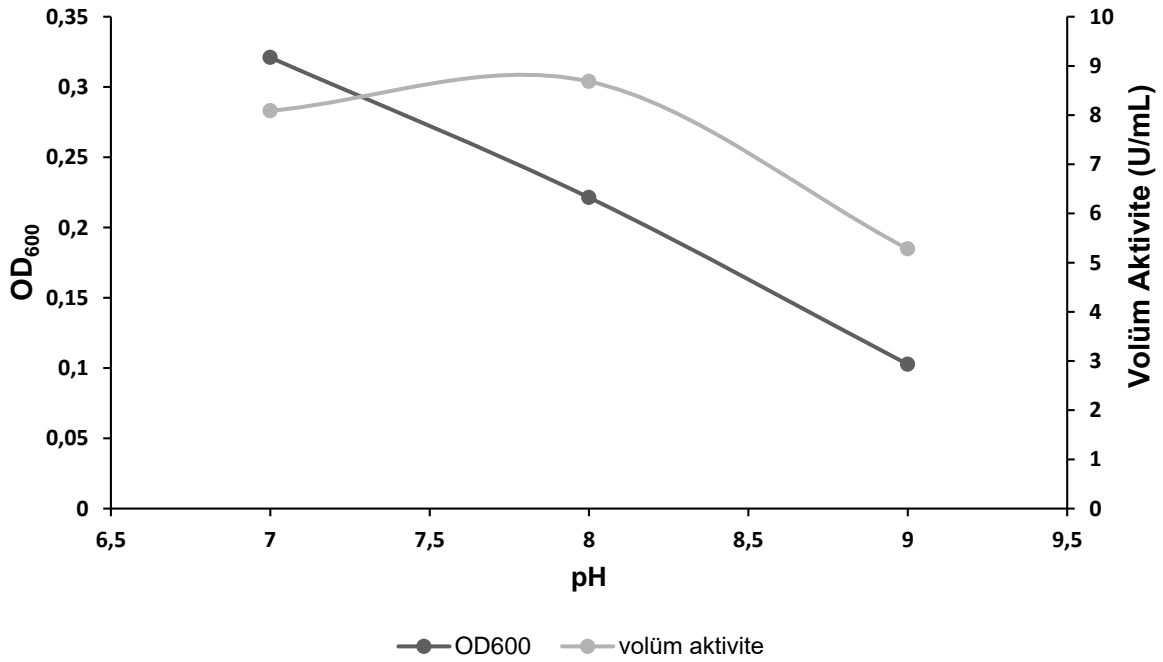
4.1.2. Besi Yeri Başlangıç pH'sı

Başlangıç pH'sının lipaz enzim üretimi üzerine etkisini saptamak için *Anoxybacillus* sp. HBB229 başlangıç pH'sı 5,00-11,00 olan besiyerlerine ekildi. Her bir denemede pH birer birim artırıldı. Besiyeri pH'sı 5,00, 6,00, 10,00 ve 11,00 olan denemelerde bakteriyel üreme görülmedi. Bakteriyel üreme pH 7,00, 8,00 ve 9,00 olan besiyerlerinde gözlenmiştir. En yüksek OD₆₀₀ değeri ise pH 8,00'de ölçülmüştür. Bunun yanında pH 7,00, 8,00 ve 9,00 olan besiyerlerinin bakteriyel üreme OD₆₀₀ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. pH 7,00, 8,00 ve 9,00 olan besiyerlerinde lipaz aktivite değerleri incelendiğinde pH 8,00'de (8,68 U/mL) maksimum aktivite tespit edilmiştir (Tablo 12 ve Şekil 3).

Tablo 12. Başlangıç pH'sının *Anoxybacillus* sp. HBB229'un lipaz enzimi üretimine etkisi

Başlangıç pH	OD ₆₀₀ (ORT. ± S.H.)	X	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X
7	0,32 ± 0,26	a	8,09 ± 0,17	b
8	0,22 ± 0,01	a	8,68 ± 0,19	a
9	0,10 ± 0,01	a	5,28 ± 0,11	c
	Pooled StDev = 0,15		Pooled StDev = 0,16	

ORT.: her veri üç tekrarın ortalamasıdır.
S.H.: Standart hata.
X: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile en iyi aktivite gösteren arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. (p<0,05)



Şekil 3. Başlangıç pH'sının *Anoxybacillus* sp. HBB229'nin lipaz enzimi üretimine etkisi.

4.1.3. Karbon Kaynaklarının Bakteriyel Üreme ve Lipaz Aktivite Üzerine Etkileri

Çeşitli karbon kaynaklarının bakteriyel üreme ve lipaz enzim üretimine etkisinin saptanması için şeker ve yağ olmak üzere iki çeşit karbon kaynağı besi ortamına eklenerek denemeler yapıldı. Bu denemeler 50 °C sıcaklıkta ve pH 8,00 ortam koşullarında gerçekleştirilmiştir.

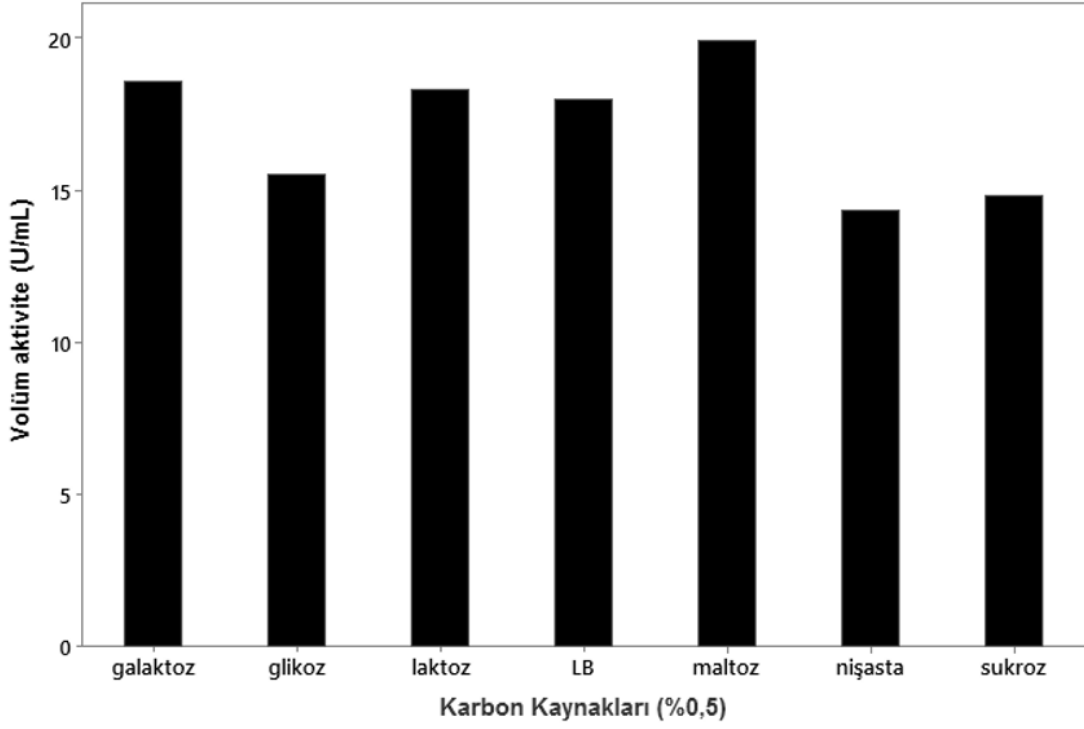
4.1.3.1. Şekerler

Karbon kaynağı olarak şekerlerle yapılan çalışmada, OD₆₀₀ ölçümünde galaktozun 0,24 abzorban ile maksimum bakteriyel üreme gösterdiği ve maltozunda 19,95 U/mL ile maksimum volüm aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, kontrol olarak kullanılan LB ile galaktozun OD₆₀₀ değerlerinde istatikselsel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Galaktoz, glikoz, laktoz ve LB besiyerleri arasında üreme farklılıkları olmasına rağmen enzim aktivitelerinde istatikselsel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo13, Şekil 4, ve Şekil 5).

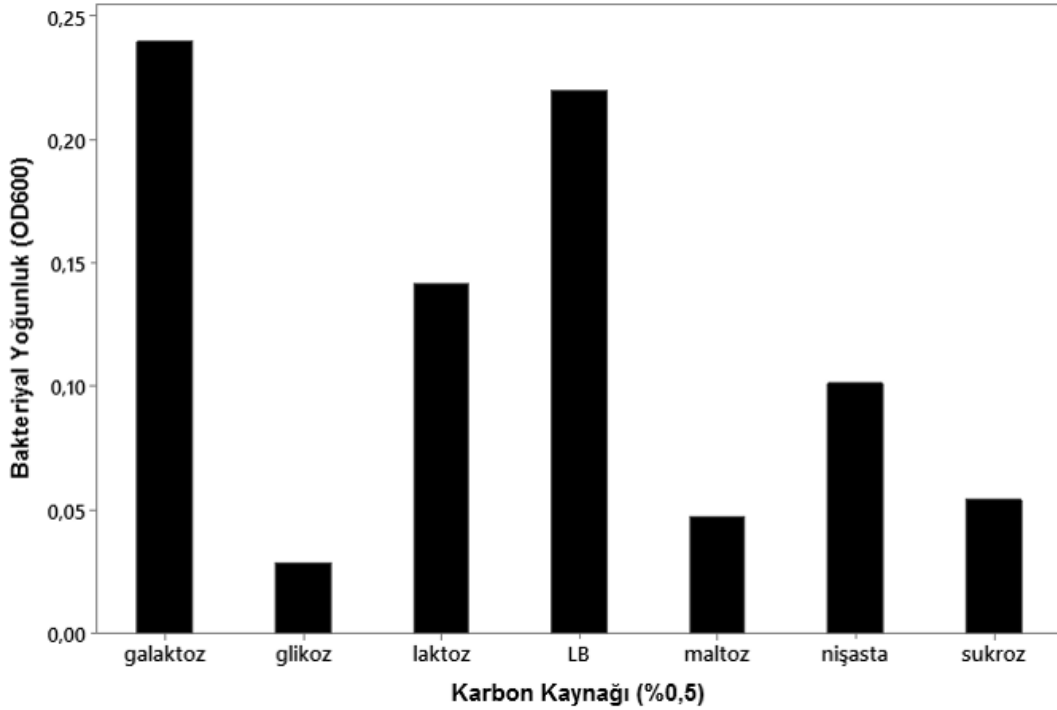
Tablo 13. Karbon kaynaklarının bakteriyel üreme ve lipaz aktivite üzerine etkileri.

Karbon Kaynağı	OD600 (ORT. ± S.H.)	X	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X
Galaktoz	0,24 ± 0,01	a	16,57 ± 6,18	ab
Glikoz	0,03 ± 0,01	d	15,52 ± 2,64	ab
Laktoz	0,14 ± 0,01	b	18,33 ± 2,70	ab
LB	0,22 ± 0,02	a	18,00 ± 0,82	ab
Maltoz	0,05 ± 0,02	d	19,95 ± 1,28	a
Nişasta	0,10 ± 0,04	c	14,33 ± 3,66	b
Sukroz	0,05 ± 0,03	d	14,86 ± 3,00	b
	Pooled StDev = 0,02		Pooled StDev = 3,32	

ORT.: her veri üç tekrarın ortalamasıdır.
S.H.: Standart hata.
X: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile en iyi aktivite gösteren arasındaki fark istatikselsel olarak önemlidir. (p<0,05)



Şekil 4. Karbon kaynaklarının termofilik lipaz aktivite üzerine etkileri



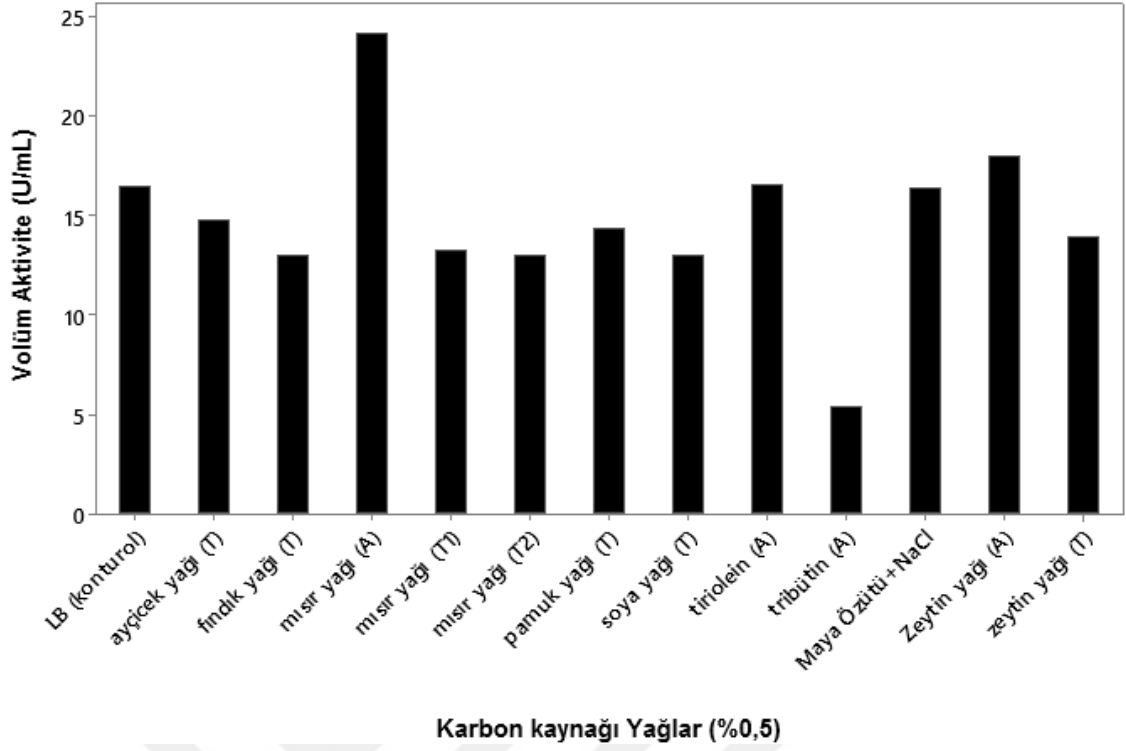
Şekil 5. Karbon kaynaklarının bakteriyel üreme üzerine etkileri

4.1.3.2. Yağlar

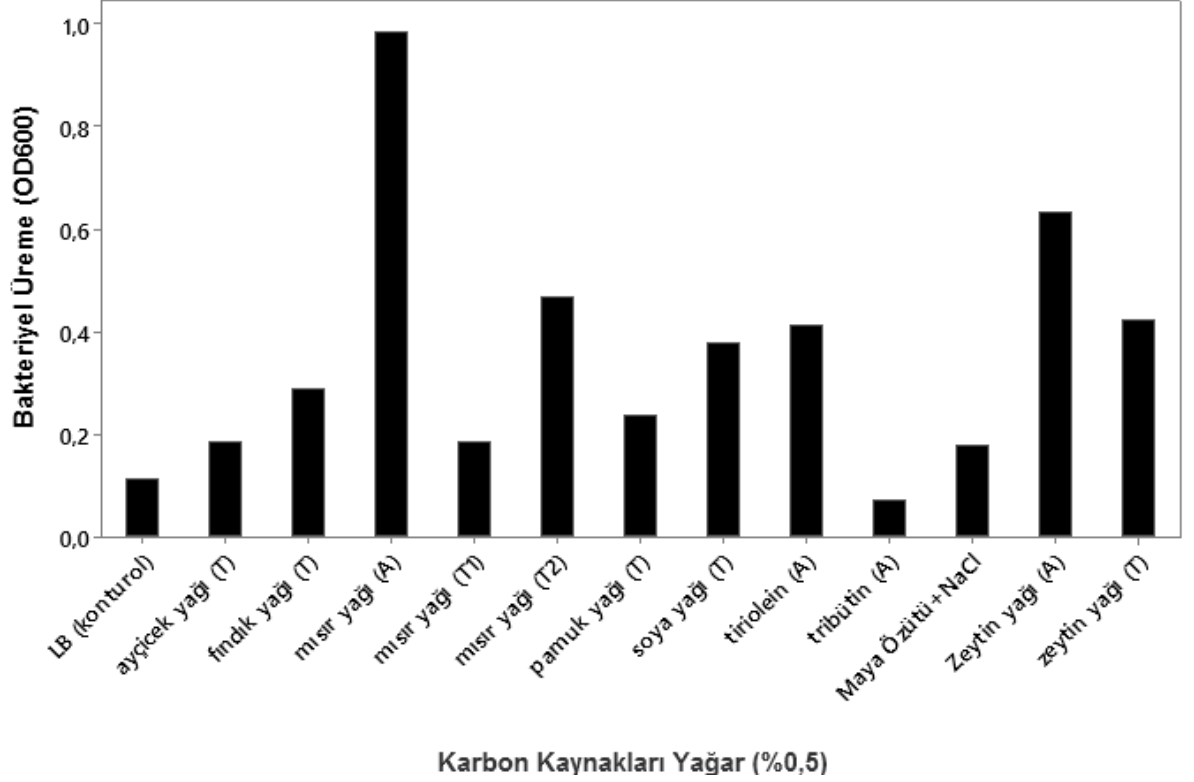
Karbon kaynağı olarak yağlarla yapılan çalışmada, OD₆₀₀ ve volüm aktivite ölçümlerinde en yüksek değerleri analitik saflıktaki mısır yağı vermiştir. Kontrol olarak kullanılan LB besiyerinden daha az üreme tespit edilen tek besiyeri 0,07 absorbans ile tribütin içeren besiyeri olmuştur. Yağ çeşitleri arasında en düşük seviyede enzim aktivitesi 5,36 U/mL ile tribütin içeren besi yerinde gözlenmiştir. (Tablo 14, Şekil 6, Şekil 7)

Tablo 14. Karbon kaynağı olarak yağlar. ((T) ticari ürün, (A) analitik saflıktaki ürün olarak belirtilmiştir.)

Besiyeri	OD ₆₀₀ (ORT. ± S.H.)	X	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X
Ayçiçek (T)	0,18 ± 0,01	efg	14,78 ± 0,65	bc
Fındık yağı (T)	0,29 ± 0,02	cdef	13,99 ± 1,63	c
LB	0,11± 0,0333	fg	16,49 ± 0,79	bc
Maya Özü+NaCl	0,18 ± 0,04	efg	16,37 ± 0,85	bc
Mısır yağı (A)	0,99 ± 0,13	a	24,22 ± 2,86	a
Mısır Yağı (T1)	0,18 ± 0,03	efg	13,26 ± 1,61	c
Mısır Yağı (T2)	0,47 ± 0,03	bc	12,99 ± 2,26	c
Pamuk yağı (T)	0,24 ± 0,03	defg	14,36 ± 2,22	bc
Soya yağı (T)	0,38 ± 0,16	cde	12,98 ± 2,96	c
Tiriölein (A)	0,41 ± 0,11	cd	16,60 ± 1,59	bc
Tribütin (A)	0,07 ± 0,03	g	5,36 ± 2,49	d
Zeytin Yağı (A)	0,63 ± 0,34	b	18,00 ± 6,65	b
Zeytin yağı (T)	0,42 ± 0,07	cd	13,90 ± 3,22	bc
Pooled StDev = 0,12		Pooled StDev = 2,85		
ORT.: her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. X: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile en iyi aktivite gösteren arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. (p<0,05)				



Şekil 6. Karbon kaynağı olarak yağların bakteriyel üreme üzerine etkileri



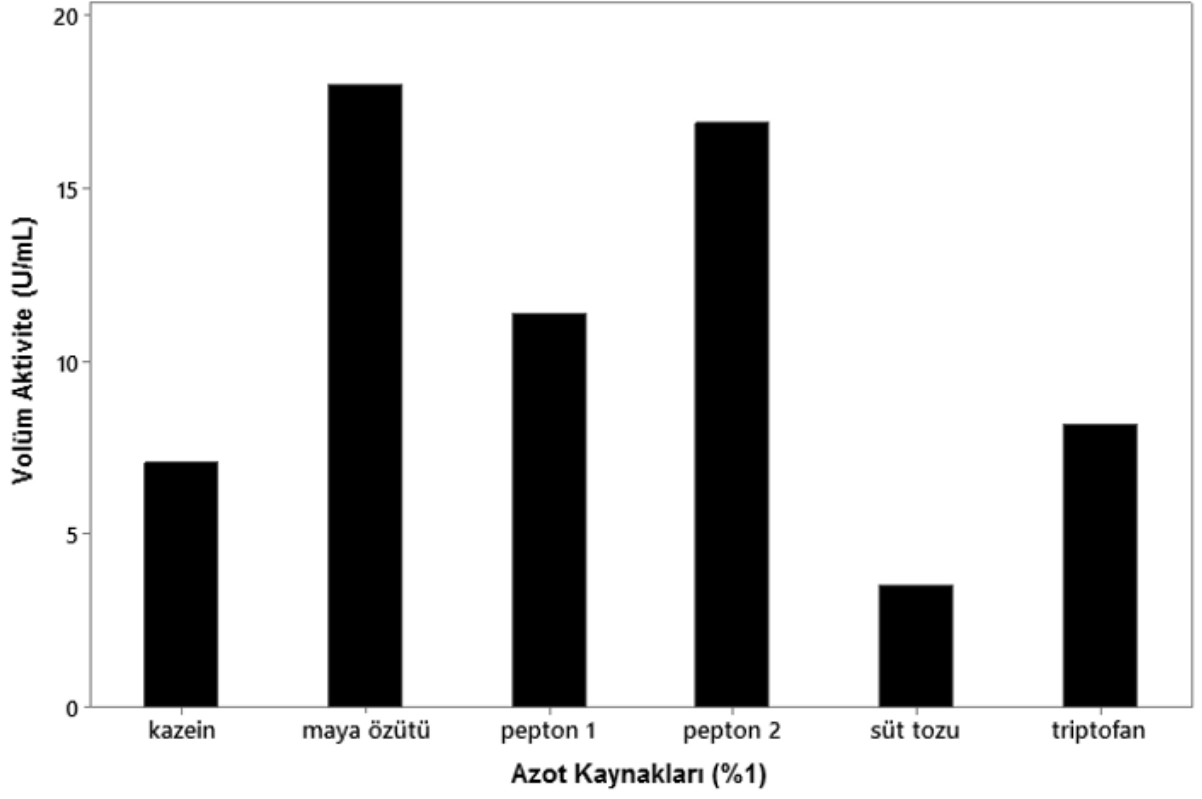
Şekil 7. Karbon kaynağı olarak yağların lipaz volüm aktivite üzerine etkileri

4.1.4. Azot Kaynaklarının Bakteriyel Üreme ve Lipaz Aktivite Üzerine Etkileri

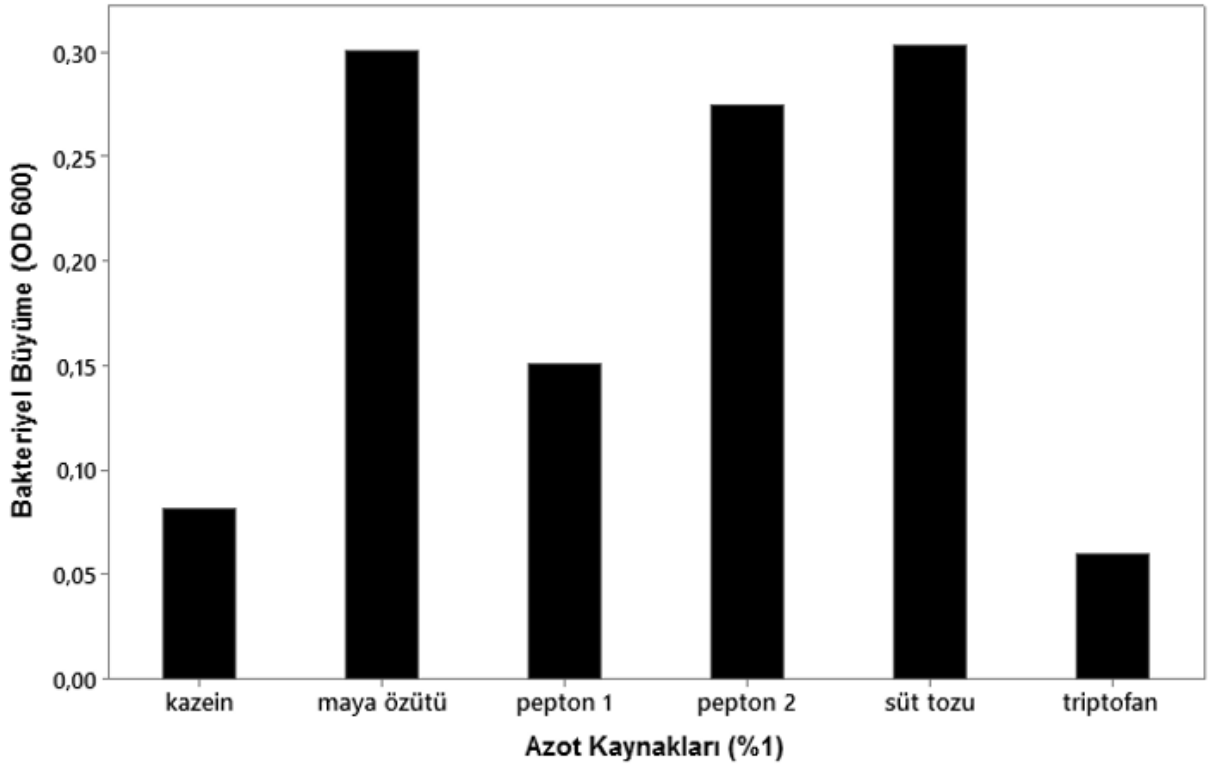
Besiyeri içeriğindeki azot kaynağının bakteri üremesi ve enzim üretimine olan etkisini belirlemek amacıyla farklı azot kaynakları %1 oranında besiyerine eklenerek denenmiştir. Bu denemeler 50 °C sıcaklıkta ve pH 8,00 ortam koşullarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, maya özütü içeren besiyerinde lipaz enziminin en yüksek seviyede volüm aktivite değeri 18,01 U/mL olarak saptanmıştır. Süt tozu içeren besiyerinde ise en yüksek seviyede bakteriyel üreme göstermiş ve OD₆₀₀ değeri 0,30 absorbans vermiştir. İki ayrı firmaya ait kullanılan peptonların; Pepton-1 ve Pepton-2 hem bakteriyel üreme değerleri hem de lipaz enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir (Tablo 15, Şekil 8, ve Şekil 9).

Tablo 15. Farklı azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisi

Azot Kaynakları	OD600 (ORT. ± S.H.)	X	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X
Kazein	0,08 ± 0,06	b	7,09 ± 4,90	cd
Pepton-1	0,15 ± 0,10	b	11,41 ± 8,17	bc
Pepton-2	0,27 ± 0,04	a	16,90 ± 1,08	ab
Süt tozu	0,30 ± 0,05	a	3,52 ± 2,29	d
Triptofan	0,06 ± 0,01	b	8,21 ± 1,88	cd
Maya Özütü	0,30 ± 0,10	a	18,01 ± 0,76	a
	Pooled StDev = 0,07		Pooled StDev = 4,11	
ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. X: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile en iyi aktivite gösteren arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. (p<0,05)				



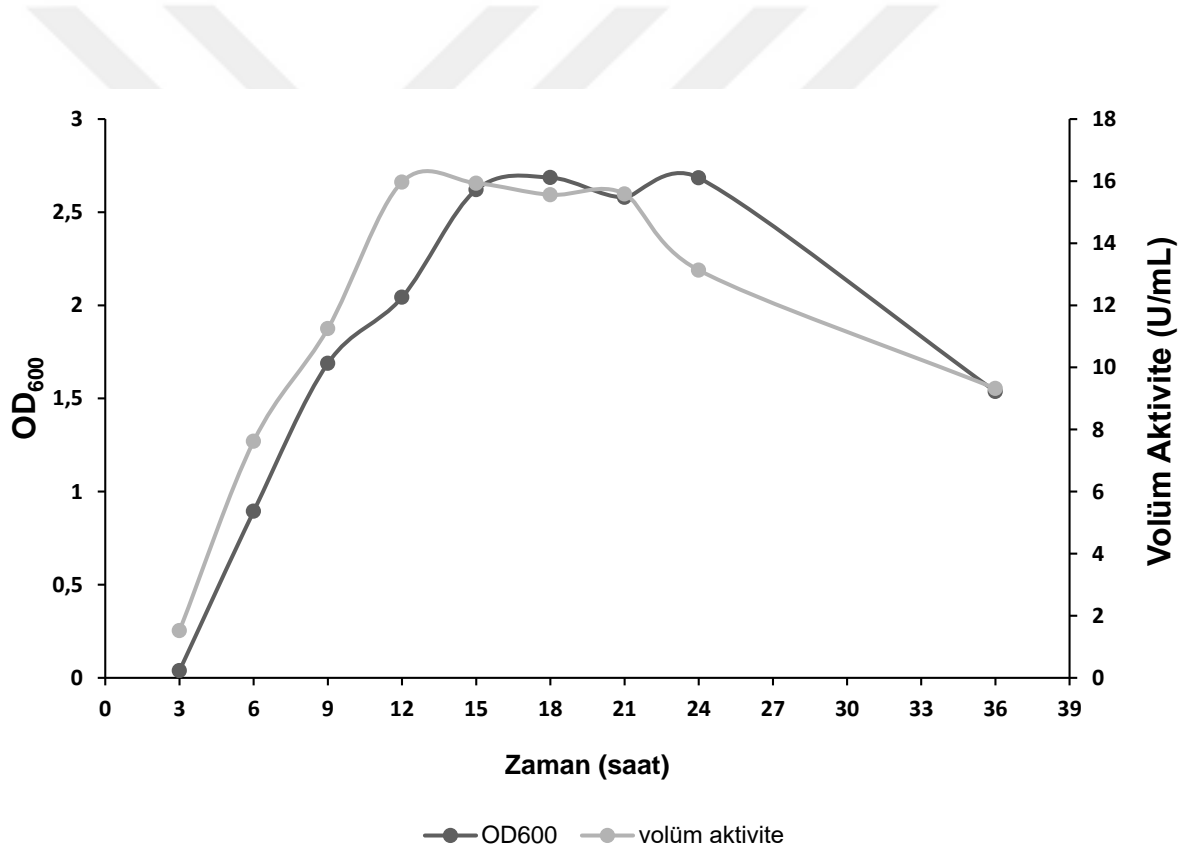
Şekil 8. Farklı azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisi



Şekil 9. Farklı azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisi ortalama OD₆₀₀

4.2. Zamana Bağlı Üreme ve Lipaz Enzimi Üretimi

Anoxybacillus sp. HBB229 suşunun besiyerine ekildikten sonra hangi zaman aralığında maksimum enzim üretimi gerçekleştirdiğini saptamak için ilk 24 saat içerisinde 3'er saat ara ile besi yerinden örnekler alınarak hücre yoğunluğu (OD_{600}) ve lipaz aktivitesi ölçüldü. 3. saatten 15 saate kadar bakterilerin log fazında olduğu, 15 ve 27 saatleri arasında bakterilerin durağan fazda oldukları ve 27 saatten itibaren üremede düşüş olduğu gözlenmiştir. Enzim aktivitesinde ise 3 ile 12 saat arasında doğrusal bir artış gözlenirken 12 ile 21 arası aktivitede anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. 21 saat inkübasyon ve sonrasında enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. Lipaz enziminin en yüksek seviyede volüm aktivite değeri 12 saate 15,97 U/mL olarak saptanmıştır (Tablo16, Şekil 10).



Şekil 10. Zamana bağlı bakteriyel yoğunluk ve lipaz enzimi üretimi.

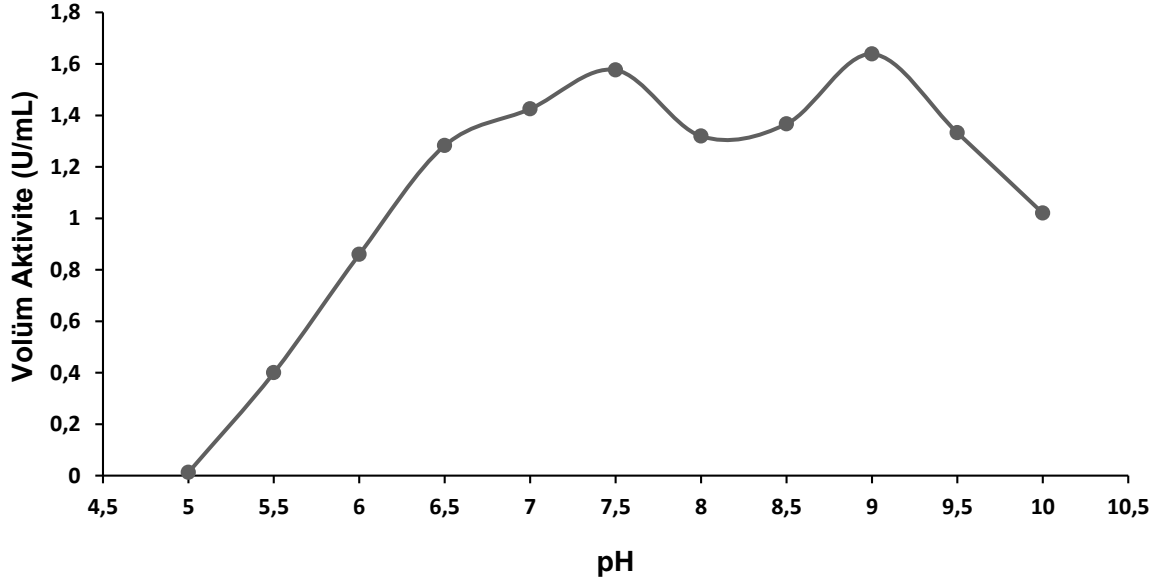
Tablo 16. Zamana bağı bakteriyel yoğunluk ve lipaz enzimi üretimi

Saat	OD600 (ORT. ± S.H.)	x	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x
3	0,04 ± 0,01	e	1,52 ± 0,47	e
6	0,90 ± 0,01	d	7,62 ± 0,28	d
9	1,69 ± 0,12	c	11,25 ± 0,38	bc
12	2,04 ± 0,06	b	15,97 ± 0,35	a
15	2,62 ± 0,17	a	15,93 ± 0,08	a
18	2,69 ± 0,12	a	15,56 ± 1,34	a
21	2,58 ± 0,01	a	15,59 ± 1,24	a
24	2,68 ± 0,01	a	13,13 ± 0,65	b
36	1,54 ± 0,14	c	9,32 ± 1,06	cd
Pooled StDev = 0,09		Pooled StDev = 0,86		
ORT.: her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata. X: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile en iyi aktivite gösteren arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. (p<0,05)				

4.3. *Anoxybacillus* sp. HBB229 Lipazinin Kantitatif Enzim Aktivite Tayini

4.3.1. HBB229 Lipaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Lipaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisine bakmak için 5,00-10,00 arasındaki değerlerde pH 0,50 birim arttırılarak ölçüldü. Volüm aktivite sonuçların göre *Anoxybacillus* sp. HBB229 lipazı pH 5,50'ten (0,40 U/mL) 7,5'e (1,58 U/mL) kadar doğrusal bir artış göstermiştir. pH 8,00 ve pH 8,50'ta ise enzimin volüm aktivitesi pH 7,50'e göre sırasıyla %16 ve %13 azalmıştır (Tablo 17, Şekil 11). *Anoxybacillus* sp. HBB229 lipazının maksimum aktivite gösterdiği değer pH 9,00 olarak (1,64 U/mL) gözlenmiştir. pH 9,50 ve 10,00 da ise pH 9,00'a göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 11. *Anoxybacillus* sp. HBB229 lipaz enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.

Tablo 17. pH'ın *Anoxybacillus* sp. HBB229 lipaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.

pH	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	X
5,0	0,013 ± 0,02	f
5,5	0,40 ± 0,06	e
6,0	0,86 ± 0,01	d
6,5	1,28 ± 0,03	c
7,0	1,42 ± 0,10	abc
7,5	1,58 ± 0,04	ab
8,0	1,32 ± 0,03	c
8,5	1,37 ± 0,11	bc
9,0	1,64 ± 0,05	a
9,5	1,33 ± 0,14	c
10,0	1,02 ± 0,08	d
	Pooled StDev = 0,07	

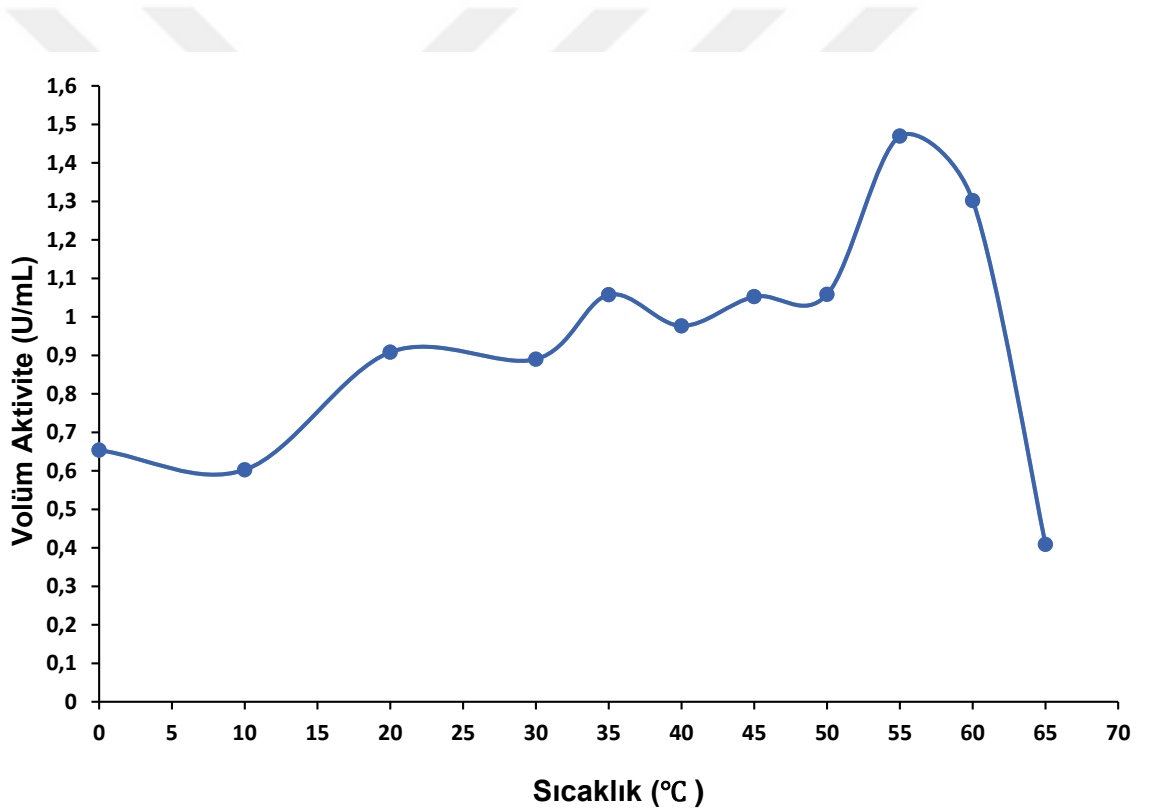
ORT.: her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

X: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile en iyi aktivite gösteren arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. ($p < 0,05$)

4.3.2. HBB 229 Lipaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Lipaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini saptamak için 0-30 °C arası 10'ar birim, 30-65 °C arası ise 0,5 birim arttırılarak enzimatik ölçümler yapıldı (Tablo 18, Şekil 3). Başlangıçta 20 °C sıcaklıkta (0,91 U/mL) 10 dereceye (0,60 U/mL) göre lipaz enzim aktivitesinde 1,5 kat kadar bir anlamlı bir artış görünmüştür. Daha sonra, 35 °C ve 45 °C sıcaklıklarda ise istatistiksel olarak benzer seviyelerde (sırasıyla 1,06 ve 1,05 U/mL) enzim aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Şekil 12'de görüldüğü gibi *Anoxybacillus* sp. HBB229 lipazı 55 derecede 1,47 U/mL volüm aktivite ile diğer sıcaklıklara göre en yüksek seviyede artışı göstermiştir.



Şekil 12. Sıcaklığın *Anoxybacillus* sp. HBB229'un enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Tablo 18. *Anoxybacillus* sp. HBB229'un lipaz enzimi üzerine sıcaklığının etkisi.

Sıcaklık	Volüm Aktivite (U/mL) (ORT.±S.H.)	X
0	0,65 ± 0,07	de
10	0,60 ± 0,03	de
20	0,90 ± 0,01	cd
30	0,89 ± 0,05	cd
35	1,05 ± 0,06	bc
40	0,98 ± 0,02	c
45	1,05 ± 0,01	bc
50	1,06 ± 0,14	bc
55	1,47 ± 0,08	a
60	1,30 ± 0,20	ab
65	0,41 ± 0,02	e
Pooled StDev = 0,08		
ORT.: Her üç tekrarın ortalamasıdır.		
S.H.: Standart Hata		
X. Aynı sütunda farklı harler taşıyn ortalamalar ile en iyi aktiviteyi gösteren arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir. (p<0,05)		

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında *Anoxybacillus* sp. HBB229'un lipaz üretimi üzerine sıcaklık, pH ve değişen besiyeri kaynaklarının etkileri ve bu termofilik lipaz aktivitesi üzerine optimum çalışma koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Yıllar içinde gelişen teknoloji ve endüstrideki ilerlemeler çok çeşitli ürünlerin eldesini zorunlu kılmıştır. Bu geniş skaladaki endüstriyel ürünleri uygun ortam koşullarında ve yüksek verimlilikte elde etmek amacıyla birçok farklı kimyasal reaksiyonlar kullanılmaktadır. Ancak, bu gereklilik beraberinde çevreye ve insan sağlığına zararlı yan ürün ve kirleticilerin artmasına sebebiyet verebilmektedir. Bu zararlı atık ve kirleticilerin zararlarını azaltmak için çeşitli çalışmalar günümüzde hızla sürdürülmektedir. Birçok endüstriyel tesis için hammadde kaynağı olarak kullanılan yağların hidrolizi önemli bir kimyasal işlemdir. Yağ asitleri, yenilenebilir kaynaklardan üretilen yağların hidrolizi ile sentezlenir. Buna ek olarak, son yıllarda hayvansal ve bitkisel yağlara alternatif olarak mikroalglerden elde edilen yağların hammadde kaynağı olarak kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Kutluk, 2021).

Lipazlar farmasötik, gıda ve kimya endüstrileri gibi farklı endüstriyel sektörlerde sayısız uygulamaya sahip verimli biyokatalizörlerdir. Lipazların endüstrideki uygulamaları enzim immobilizasyonu, stabilite, seçicilik ve yarı ömrünü artırarak daha da genişletilmiştir (Remonatto vd., 2022). Bu nedenle, sıcaklığa dayanıklı ve çözücülere toleranslı lipazların tanımlanması endüstriyel uygulamalar için gerekli ve ideal hale gelmiştir. Sıcaklığa dayanıklı ve çözücüye toleranslı lipazlar, biyodizel, deterjan, gıda, ilaç, organik sentez, biyolojide, kâğıt hamuru, kâğıt, tekstil, hayvan yemi, kozmetik ve deri endüstrisi dahil olmak üzere birçok büyük ölçekli uygulama alanlarında yer almıştır (Ismail vd., 2021). Diğer yandan, endüstriyel alanda enzimlerin kullanımının çevre ve insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinin olduğuna dair çalışmalar literatürde mevcuttur.

Mikroorganizmaların bitkiler ve hayvanlarla karşılaştırıldığında daha yüksek verimde lipaz ürettiği bilinmektedir (Andualema ve Gessesse, 2012). *Anoxybacillus* cinsinin gram pozitif bakterileri, jeotermal kaplıcalar ve gübre gibi çeşitli termofilik habitatlardan izole edilebilmektedir (Saw vd., 2008). *Anoxybacillus* cinsinin gram pozitif bakterileri başlangıçta zorunlu olarak anaerobik spor oluşturan basiller olarak tanımlanmıştır. İzole edilen *Anoxybacillus* suşlarının, uzun süredir zorunlu veya fakültatif aerob olduğuna inanılan *Bacillaceae* familyasının üyeleri olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, *Bacillus subtilis* ve

diğer birkaç basilin anaerobik büyüme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Nakano vd., 1997).

Enzimlerin çalışma prensiplerine etki eden en önemli iki parametre pH ve sıcaklıktır. Daha önce lipaz enzimi ile yapılan çalışmalara bakıldığında, *Anoxybacillus* sp. PDF1 karboksilesteraz enziminin pH 8,00-8,50'te %94 optimum pH aktivite gösterdiğini (Ay vd., 2011), *G. kaustophilus* HTA426 karboksilesterazın pH 8,00 (Montoro-García vd., 2009), *Bacillus thermoleovorans* CCR11 ve *B. thermoleovorans* ID1 suşlarından elde edilen lipaz enzimlerinin pH 9,00'da sahip olduğunu gösterilmiştir (Lee vd., 2001). Bu tez çalışmasında ise *Anoxybacillus* sp. HBB229 suşunun lipaz enzimi benzer şekilde pH 9,00'da optimum aktivite göstermiştir (Tablo17 ve Şekil 11). *Bacillus thermoleovorans* CCR11 lipazı (Nawani vd., 1998), *Bacillus* sp. A30-1 lipazı (Wang vd., 1995) ve *Bacillus thermoleovorans* ID-1 lipazı (Lee, vd., 2001) için 60–65 °C sıcaklık aralıklarında maksimum aktivite verdikleri gösterilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan spektrofotometrik testlere göre HBB229 suşunun lipaz enzim aktivitesi için 55 °C optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir (Tablo18 ve Şekil 12).

Enzim üretimine etki eden en önemli koşullardan bir diğeri de bakteriyel yoğunluktur. Bakteriyel yoğunluğa etki eden başlıca faktörler zaman ve besi ortamı içerikleridir. Zaman bakterinin bölünmesi için geçen süre olarak tanımlanabilir. Besi ortamı ise bakterinin bölünüp gelişebilmesi için gerekli besin kaynaklarını sağlayan ortam olarak tanımlanabilir. Besiyeri sıcaklığı, besiyeri başlangıç pH'sı, karbon ve azot kaynakları bir bakteri için ne kadar uygunsa bakteri yoğunluğu o kadar artmaktadır. Böylelikle, bakteriyel konsantrasyona bağlı enzim üretiminde de artış gözlenmesi olası hale gelir. Kevbrin vd. (2005) ve Namsaraev vd. (2011) çalışmalarında, *Anoxybacillus kamchatkensis* DSM 14988 ve *Anoxybacillus mongoliensis* DSM 19169 suşlarının bakteriyel büyüme üzerine karbon kaynağı olarak glukoz, galaktoz, sakaroz, maltoz, arabinoz, ksiloz, azot kaynağı olarak ise maya özütü, pepton, tripton ve amino asitlerin etkili olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, *Anoxybacillus* sp. HBB229 suşunun besi ortamı optimizasyonu için farklı azot kaynakları denenmiştir. Bu termofilik bakteride büyüme seviyesi ve lipaz enzim aktivitesini destekleyen optimum azot kaynağının %1'lik maya özütü olduğu saptanmıştır (Tablo 8 ve Şekil 15). Karbon kaynağı optimizasyon denemelerine göre HBB299 bakteriyel büyüme yoğunluğu galaktoz ve kontrol (LB) gruplarında (sırasıyla 0,24 ve 0,22 abzorban) istatistiksel olarak benzer ve yüksek seviyede artmıştır (Tablo 13 ve Şekil 4). Glikoz, maltoz ve sukroz içeren besiyerlerinde ise diğer karbon kaynaklarına göre en düşük seviyelerde bakteriyel üreme yoğunluğu tespit edilmiştir. Karbon kaynakları bakteriyel üreme

üzerinde anlamlı farklılıklar göstermesine rağmen, lipaz enziminin volüm aktivite seviyeleri galaktoz, glikoz, laktoz ve kontrol (LB) grupları arasında anlamlı bir fark sergilememiştir. Dahası, bu gruplar arasında lipaz enzim aktivitesini en çok arttıran karbon grubu 19,95 U/mL ile maltoz olmuştur. Farklı marka, cins ve saflıkta yağlar ile yaptığımız denemelerde en yüksek enzim aktivitesi ve bakteriyel üreme değeri sırasıyla, 24,22 U/mL ve 0,99 absorbans ile mısır yağında (analitik saflıkta) gözlenmiştir (Tablo 14 ve Şekil 7). Analitik saflıktaki mısır yağının ticari olarak satılan mısır yağından daha fazla aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Hücre içindeki biyokimyasal reaksiyonlar biyokatalizörler tarafından her ne kadar hızlı gerçekleştiriliyor olsalar da hücreler büyüme, gelişme ve üremeleri için zamana ihtiyaç duyarlar. Aynı zamanda, bakterilerde bazı metabolitleri salgılamak için hücre yoğunluklarının uygun bir seviyeye gelmesi gerektiği bilinmektedir. Ilesanmi vd. (2020) topraktan izole edilen lipaz üreten bir bakteri örneğini 24 saat inkübe etmişler ve 12. saatte maksimum aktivite verdiğini bildirmişlerdir (Ilesanmi vd., 2020). Çanakı (2021)'nın *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB180 izolatu üzerinde yaptığı çalışmada benzer bir şekilde 12. saatte lipaz enzimi maksimum aktivite göstermiştir (Çanakı, 2021)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kullanılan mikroorganizma *Anoxybacillus* sp. HBB229 izolatı Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, mikrobiyoloji laboratuvarında daha önceden izole edilmiş stok kültürden elde edilmiştir. *Anoxybacillus* sp. HBB229 izolatının lipaz enzim üretimini artmasını sağlamak amacıyla başlangıç pH'sı, inkübasyon süresi, sıcaklığı, azot ve karbon kaynağı, gibi farklı fermantasyon parametreleri optimize edilmiştir. Kantitatif lipaz aktivite tayini p-NPL (p-nitrofenil laurat) substratı ile spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir. Yapılan deneylerle *Anoxybacillus* sp. HBB229 lipazının optimizasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili veriler ilk defa bu çalışma ile elde edilmiştir. Besi ortamı pH denemelerinde enzim üretimi için başlangıç pH'sı 8,00 olarak belirlenmiştir. Lipaz enziminin volüm aktivitesi üzerine ise maksimum seviyede aktivite (8,68 U/mL) pH 9,00'de tespit edilmiştir. *Anoxybacillus* sp. HBB229'un bakteriyel büyüme yoğunluğu en yüksek seviyede optimum sıcaklık 50 °C 'de elde edilmiştir. Aynı zamanda besi ortamının değişen sıcaklıklarda ölçülen lipaz aktivite tayinlerine göre en yüksek seviyede enzim aktivitesi optimum sıcaklık 55 °C'de (14,42 U/mL) elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, *Anoxybacillus* sp. HBB229 izolatının termofilik bir bakteri olduğunu ispatlanmıştır. Besi ortamı optimizasyonu için önemli bir faktör olan karbon kaynakları denemelerinde en yüksek enzim aktivitesi maltoz (19,95 U/mL) grubunda elde edilmiştir. Yağlar ile yapılan denemelerde ise en yüksek lipaz aktivitesi diğer yağ örneklerine göre mısır yağı (analitik saflıkta) içeren besi ortamında (24,22 U/mL) tespit edilmiştir.

Azot kaynağı araştırmalarında ise hem enzim üretimini hemde lipaz volüm aktivitesini en çok arttıran azot kaynağı %1 oranında maya özütü (18,01 U/mL) içeren besiyerinde saptanmıştır. *Anoxybacillus* sp. HBB229'un optimum besi ortamı koşullarının belirlenmesinin ardından zamana bağlı hücre yoğunluğu ve lipaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre 3 ile 36 saatlik inkübasyon süreleri arasında maksimum lipaz aktivitesi 12. saatte (15,97 U/mL) tespit edilmiştir. 12 ile 21 saat inkübasyon periyodu boyunca ölçülen lipaz enzim aktiviteleri istatistiksel olarak benzer sonuçlar vermiştir. *Anoxybacillus* sp. enzim aktivite ölçümü sırasında gerçekleşen reaksiyon ortam koşulları da karakterize edilmiştir. HBB229 lipazının maksimum aktivite gösterdiği (1,64 U/mL) optimum pH değeri pH 9,00 olarak gözlenmiştir. Bu sonuca göre, termofilik HBB229 lipaz enziminin alkali ortamda asidik ortama oranla daha

iyi aktivite gösterdiği ve bu enzimin alkali enzim karakteristik özelliği sergilediği belirlenmiştir. Enzim aktivite reaksiyonunun 0-75 °C arası sıcaklıklardaki denemelerine göre 55 °C’de maksimum seviyede lipaz aktivitesi (1,09 U/ml) tespit edilmiştir. 55 °C’den sonra lipaz enzim aktivitesinde 65°C’e kadar düşüş gözlenirken 70 ve 75 °C sıcaklıklarda ise artış saptanmıştır. Bu beklenmedik artışın substratın sıcaklığa bağlı olarak parçalanmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *Anoxybacillus* sp. HBB229 bakterisinin kültür koşulları incelendiğinde lipaz üretimi en yüksek seviyede %0,5 mısır yağı (analitik saflıkta), %1 maya özütü, %0,5 gum arabic ve %0,5 NaCl içeren besi ortamında elde edilmiştir. Buna ek olarak, *Anoxybacillus* sp. HBB229’de lipaz üretimi bu optimum besi ortamında başlangıç pH’sı 8,00 ve 50 °C sıcaklıktaki ortam koşullarında 12 saat inkübasyon sonrasında en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Lipaz aktivitesi reaksiyon ortamı incelendiğinde, maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü pH ve sıcaklık sırasıyla 9,00 ve 55 °C olarak saptanmıştır. Bu tez çalışmasının sonucunda elde edilen verilere göre besiyeri kaynak bileşenleri ve inkübasyon koşullarının karakterize edilmesi ile *Anoxybacillus* sp. HBB229 izolatında lipaz üretim miktarı arttığı gibi optimum enzim çalışma koşulları sağlandığında ise lipaz aktivitesinde artış olduğunu gözlenmiştir.

Kültür koşulları optimize edildiğinde *Anoxybacillus* sp. HBB229 bakterisinin üremesi için optimal koşullar;

- ❖ Karbon kaynağı olarak %0,5’lik mısır yağı,
- ❖ Azot kaynağı olarak %1’lik maya özütü,
- ❖ Optimum pH 8,00,
- ❖ İnkübasyon sıcaklığı 50 °C,
- ❖ İnkübasyon süresi 12 saat olarak saptanmıştır.

Anoxybacillus sp. HBB229 lipaz aktivite ortamı;

- ❖ 50 mM konsantrasyonda glisin sodyum hidroksit tamponu (pH 9,00),
- ❖ 1 mM pNPL (etanolde) substrat konsantrasyonu,
- ❖ 50 °C’ de 30 dakika inkübasyon,
- ❖ Reaksiyonu durdurmak için 250 µL’lik 0,1 M Na₂CO₃
- ❖ 410 nm’de spektrofotometrik ölçüm olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında *Anoxybacillus* sp. HBB229 lipaz üretim optimizasyonu yapılmış olmasına rağmen, enzim saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları eksik kalmıştır. Bu çalışmalar yapıldığında bu enzimin endüstride kullanımı ile ilgili bilgiler elde edilecektir.

KAYNAKÇA

- Abdel-Fattah, Y. R. and Gaballa, A. A. (2008). Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*. *Microbiological research*, 163(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.02.004>
- Aehle, W. (Ed.). (2007). *Enzymes in industry: production and applications*. John Wiley ve Sons.
- Akkaya, S. E. ve Kıvanç, M. (2008). Termofil Bakteriler Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gr (+) Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8 (2) , 61-70 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/akufemubid/issue/1608/20083>
- Andualema, B., ve Gessesse, A. (2012). *Microbial lipases and their industrial applications*. *Biotechnology*, 11(3), 100. <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.100.118>
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., ve Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource technology*, 280, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Atasağungil, M. (1965). Enzimler. *Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınlarından*, (8).
- Ay, F., Karaoglu, H., Inan, K., Canakci, S., ve Belduz, A. O. (2011). Cloning, purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from *Anoxybacillus* sp. PDF1. *Protein expression and purification*, 80(1), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.019>
- Akhshullayevich, T. B., ve Shaxina, S. (2022). Classification of Enzymes. *European Journal Of Business Startups And Open Society*, 2(5), 37-39. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0005276094900086>
- Bakir, Z. B., ve Metin, K. (2015). Screening for industrially important enzymes from thermophilic bacteria; selection of lipase-producing microorganisms and optimization of culture conditions. *Eur. J. Biotechnol. Biosci*, 3, 43-48.
- Bakir, Z. B., ve Metin, K. (2016). Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(6), 1087-1097. <https://doi.org/10.4014/jmb.1512.12056>
- Baltacı, M. Ö., Tuysuz, E., Ozkan, H., Taskın, M., ve Adıguzel, A. (2019). Lipase production from thermophilic bacteria using waste frying oil as substrate. *Teknik Bilimler Dergisi*, 9(3), 23-27. <https://doi.org/10.35354/tbed.510140>

- Brock, T. D. (1967). Life at High Temperatures: Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. *Science*, 158(3804), 1012-1019.
- Burcu Bakir, Z., ve Metin, K. (2017). Production and characterization of an alkaline lipase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. HBB16. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 31(3), 303-312. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2016.990>
- Chiş, L., Hriscu, M., Bica, A., Toşa, M., Nagy, G., Róna, G., ... ve Irimie, F. D. (2013). Molecular cloning and characterization of a thermostable esterase/lipase produced by a novel *Anoxybacillus flavithermus* strain. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59(2), 119-134. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.119>
- Çanakı, A. (2021). *Anoxybacillus kaynarcensis HBB180 Lipazının Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi Yüksek Lisans Tezi*, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Eren, K. (2002). *Ankara koşullarında bazı aspir (Carthamus tinctorius L.) çeşitlerinin kışlık ve yazlık olarak yetiştirilmesinin verim ve verim öğeleri ile kalite üzerine etkileri* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme research*, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/862537>
- Gricajeva, A., Bendikienė, V., ve Kalėdienė, L. (2016). Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: Cloning, expression and characterization. *International journal of biological macromolecules*, 92, 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.015>
- Gupta, N., Sahai, V., ve Gupta, R. (2007). Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 42(4), 518-526. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.006>
- Gupta, R., Gupta, N., ve Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), 763-781. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- Gürel, Z. (2001). *Katalizörlerin hazırlanması ve endüstrideki kullanılışları*. <http://localhost:6060/xmlui/handle/1/5029>
- Heinen, W., Lauwers, A. M., ve Mulders, J. W. M. (1982). *Bacillus flavothermus*, a newly isolated facultative thermophile. *Antonie van Leeuwenhoek*, 48(3), 265-272. <https://doi.org/10.1007/BF00400386>
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., ve Ogunkanmi, A. L. (2020). Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*, 8, e00279. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00279>

- Inan, K., Canakci, S., ve Beldüz, A. O. (2011). Isolation and characterization of xylanolytic new strains of Anoxybacillus from some hot springs in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 35(5), 529-542. <https://doi.org/10.3906/biy-1003-75>
- Ismail, A. R., Kashtoh, H., ve Baek, K. H. (2021). Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: Biotechnological approaches and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 127-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.101>
- Janssen, P. H., Monk, C. R., ve Morgan, H. W. (1994). A thermophilic, lipolytic Bacillus sp., and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 120(1-2), 195-200. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07030.x>
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... ve Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>
- Kevbrin, V. V., Zengler, K., Lysenko, A. M., ve Wiegel, J. (2005). Anoxybacillus kamchatkensis sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka. *Extremophiles*, 9(5), 391-398. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0479-7>
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., Ve Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Kutluk, T. (2021). Mikroalg yağının lipaz katalizli hidroliz tepkimesine etki eden proses parametrelerinin istatistiksel yöntemle optimizasyonu. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(1), 111-125. <https://doi.org/10.17714/gumusfenbil.715085>
- Lee, D. W., Kim, H. W., Lee, K. W., Kim, B. C., Choe, E. A., Lee, H. S., ... ve Pyun, Y. R. (2001). Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium Bacillus thermoleovorans ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6-7), 363-371. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00408-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00408-2)
- Leow, T. C., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., ve Salleh, A. B. (2007). A thermoalkaliphilic lipase of Geobacillus sp. T1. *Extremophiles*, 11(3), 527-535. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0069-y>
- Louhasakul, Y., ve Cheirsilp, B. (2022). Potential use of industrial by-products as promising feedstock for microbial lipid and lipase production and direct transesterification of wet yeast into biodiesel by lipase and acid catalysts. *Bioresource Technology*, 348, 126742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126742>
- McAuliffe, J. C., Aehle, W., Whited, G. M., ve Ward, D. E. (2007). Industrial enzymes and biocatalysis. In *Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology* (pp. 1375-1420). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-27843-8_31

- Montoro-García, S., Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Takami, H., García-Carmona, F., ve Sánchez-Ferrer, A. (2009). Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family. *Journal of bacteriology*, 191(9), 3076-3085. <https://doi.org/10.1128/JB.01060-08>
- Nakano, MM, Dailly, YP, Zuber, P. ve Clark, DP (1997). *Bacillus subtilis*'in anaerobik fermentatif büyümesinin karakterizasyonu: fermentasyon son ürünlerinin ve büyüme için gerekli genlerin tanımlanması. *Bakteriyoloji Dergisi*, 179 (21), 6749-6755. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6749-6755.1997>
- Namsaraev, Z. B., Babasanova, O. B., Dunaevsky, Y. E., Akimov, V. N., Barkhutova, D. D., Gorlenko, V. M., ve Namsaraev, B. B. (2010). *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, central Mongolia. *Microbiology*, 79(4), 491-499. <https://doi.org/10.1134/S0026261710040119>
- Nawani, N., Dosanjh, N. S., ve Kaur, J. (1998). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, 20(10), 997-1000. <https://doi.org/10.1023/A:1005414428737>
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., ve Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 711-729. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051456>
- Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3(3), 597-611. <https://doi.org/10.3390/biom3030597>
- Ramakrishnan, V., Goveas, L. C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P. M., ve Narayan, B. (2016). Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 6, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.005>
- Ramani, K., Kennedy, L. J., Ramakrishnan, M., ve Sekaran, G. (2010). Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochemistry*, 45(10), 1683-1691. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.023>
- Remonato, D., Júnior, R. H. M., Monti, R., Bassan, J. C., ve de Paula, A. V. (2022). Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>
- Sahoo, R. K., Das, A., Gaur, M., Sahu, A., Sahoo, S., Dey, S., ... ve Subudhi, E. (2020). Parameter optimization for thermostable lipase production and performance evaluation as prospective detergent additive. *Preparative Biochemistry ve Biotechnology*, 50(6), 578-584. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1719513>
- Saw, J. H., Mountain, B. W., Feng, L., Omelchenko, M. V., Hou, S., Saito, J. A., ... ve Alam, M. (2008). Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic

bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. *Genome biology*, 9(11), 1-16.
<https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-11-r161>

Shahinyan, G., Margaryan, A., Panosyan, H., ve Trchounian, A. (2017). Identification and sequence analyses of novel lipase encoding novel thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. *BMC microbiology*, 17(1), 1-11.
<https://doi.org/10.1186/s12866-017-1016-4>

Sigurðisladóttir, S., Konráðsdóttir, M., Jónsson, Á., Kristjánsson, J. K., ve Matthiasson, E. (1993). Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. *Biotechnology Letters*, 15(4), 361-366. <https://doi.org/10.1007/BF00128277>

Silva, A. G., ve Guidini, C. Z. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(18), 7399-7423.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10027-6>

Singh, A. K., ve Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(2), 486-520. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3>

Thomas, S. M., DiCosimo, R., ve Nagarajan, V. (2002). Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *TRENDS in Biotechnology*, 20(6), 238-242.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01935-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01935-2)

Topal, Ş. (1985). Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'nin Yeri. *Gıda*, 10(1). <https://dergipark.org.tr/en/pub/gida/issue/6924/92480>

Vieille, C., ve Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>

Voget, S., Steele, H. L., ve Streit, W. R. (2006). Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *Journal of biotechnology*, 126(1), 26-36.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.011>

Wang, B., Wang, A., Cao, Z., ve Zhu, G. (2016). Characterization of a novel highly thermostable esterase from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans* TK64. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(3), 334-343.
<https://doi.org/10.1002/bab.1465>

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). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(5), 433-438. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)91257-6](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)91257-6)

Xin, L., Hui-Ying, Y., ve Yi-Feng, L. (2012). Purification and characterization of an extracellular esterase from a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus* sp. strain LY5. *African Journal of Biotechnology*, 11(23), 6327-6334.

- Yadav, P., Korpole, S., Prasad, G. S., Sahni, G., Maharjan, J., Sreerama, L., ve Bhattarai, T. (2018). Morphological, enzymatic screening, and phylogenetic analysis of thermophilic bacilli isolated from five hot springs of Myagdi, Nepal. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6(3), 1-Notice. <https://doi.org/10.7324/JABB.2018.60301>
- Yusoff, D. F., Raja Abd Rahman, R. N. Z., Masomian, M., Ali, M. S. M., ve Leow, T. C. (2020). Newly isolated alkane hydroxylase and lipase producing *Geobacillus* and *Anoxybacillus* species involved in crude oil degradation. *Catalysts*, 10(8), 851. <https://doi.org/10.3390/catal10080851>
- Zeikus, J. G. (1979). Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 1(4), 243-252. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(79\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(79)90043-7)
- Zhang, Y., An, J., Yang, G., Zhang, X., Xie, Y., Chen, L., ve Feng, Y. (2016). Structure features of GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii*: implication for its thermophilic adaption and substrate binding preference. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(10), 948-957. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw086>

BİLİMSEL ETİK BEYAN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİLİMSEL ETİK BEYANI

“*Anoxybacillus* sp. HBB229’UN LİPAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE KÜLTÜR KOŞULLARININ ETKİSİ” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Goncagül ÖZGER

29/07 /2022

ÖZ GEÇMİŞ

SOYADI, ADI

: ÖZGER Goncagül

EĞİTİM

DERECE	KURUM	MEZUNİYET TARİHİ
LİSE	Borsa İstanbul Şehit Ömer Halisdemir Anadolu Lisesi (İzmir- Selçuk)	12.06.2015
ÖN LİSANS	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi/Aydın Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Diyaliz	10.06.2019
LİSANS	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi- Biyoloji	04.07.2019