

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2021-YL-021

Anoxybacillus kaynarcensis HBB180 LİPAZININ ÜRETİMİ
ÜZERİNE KÜLTÜR KOŞULLARININ ETKİSİ

Aslı ÇANAKÇI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı:
Prof.Dr. Kubilay METİN

AYDIN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince deneyim ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen ve çalışmanın her aşamasında büyük bir özveri ile katkılarını sunmaktan asla kaçınmayan danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Kubilay METİN'e saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli bilgileriyle çalışmaya katkılar sunan Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. H. Halil BIYIK'a saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın her aşamasında bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen Sayın hocam Arş. Gör. Zehra Burcu BAKIR'a ve özellikle istatistik değerlendirmelerindeki yardımlarından, tüm tez sürecindeki bilgi deneyimini benimle paylaştığı için doktora öğrencisi Sayın Sezgin KARAMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan ve varlıklarıyla bana güç veren, hayatımı her zaman kolaylaştıran, çalışmalarım boyunca hep destek olan sevgili annem Hacer KAYNARCA ve sevgili babam Abdullah KAYNARCA'ya sozsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım ve yaşantımda her zaman yanımda olan, beni her zaman yüreklendiren, desteğini hep hissettiğim sevgili hayat arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Selçuk Eren ÇANAKÇI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Varlıklarıyla hayatımı güzelleştiren, bana güç veren iyikilerim kızım Dilay ÇANAKÇI ve oğlum Eren ÇANAKÇI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Aslı ÇANAKÇI

İÇİNDEKİLER

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| KABUL VE ONAY | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | v |
| SİMGELER DİZİNİ..... | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| TABLolar DİZİNİ..... | xii |
| ÖZET | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Enzimler | 2 |
| 1.1.1. Enzimlerin Tarihçesi..... | 2 |
| 1.1.2. Enzimlerin Tanımı ve Özellikleri..... | 3 |
| 1.1.3. Enzimlerin İsimlendirmesi | 4 |
| 1.1.4. Enzim Kodlanması | 5 |
| 1.1.5. Enzimlerin Sınıflandırılması ("Enzyme Classification and Nomenclature," | 5 |
| 1.1.6. Enzimlerin Yapısal Özellikleri | 6 |
| 1.1.6.1. Aktif bölgeler..... | 6 |
| 1.1.6.2. Katalitik etkinlik..... | 7 |
| 1.1.6.3. Spesifiklik..... | 7 |
| 1.1.6.4. Enzim Aktivitesi | 7 |
| 1.1.6.5. Sıcaklık | 7 |
| 1.1.6.6. pH | 8 |
| 1.1.6.7. Enzim konsantrasyonu..... | 8 |
| 1.1.6.8. Substrat konsantrasyonu..... | 8 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.6.9. Zaman | 9 |
| 1.2. Lipazlar | 9 |
| 1.2.1. Tarihçe | 9 |
| 1.2.2. Lipazların Yapısı | 10 |
| 1.2.3. Lipazların Biyokimyasal Sınıflandırması | 11 |
| 1.2.3.1. Spesifik Özellğine Göre Lipazlar | 11 |
| 1.2.3.1.1. Substrat Seçiciliğine göre Lipazlar | 11 |
| 1.2.3.1.2. Pozisyon Seçiciliğine göre Lipazlar | 12 |
| 1.2.3.1.3. Enantiospesifikliğine göre lipazlar | 13 |
| 1.2.3.2. Kaynağına Göre Lipazlar | 14 |
| 1.2.3.2.1. Bitki kaynaklı lipazlar | 14 |
| 1.2.3.2.2. Hayvan ve Böcek kaynaklı lipazlar | 14 |
| 1.2.3.2.3. Mikrobiyal kaynaklı lipazlar | 15 |
| 1.2.4. Lipazların Ara yüzey Aktivasyonu | 16 |
| 1.2.5. Lipaz Aktivitesinin Belirlenme Yöntemleri | 16 |
| 1.2.6. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar | 16 |
| 1.2.6.1. Hidroliz | 17 |
| 1.2.6.2. Sentez | 17 |
| 1.2.7. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları | 19 |
| 1.2.7.1. Süt endüstrisinde lipaz | 20 |
| 1.2.7.2. Yağ endüstrisinde lipazlar | 21 |
| 1.2.7.3. Çay endüstrisinde kullanılan lipazlar | 21 |
| 1.2.7.4. Et ve balık endüstrisinde lipazlar | 21 |
| 1.2.7.5. Besinler | 22 |
| 1.2.7.6. Kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılan lipazlar | 22 |
| 1.2.7.7. Deterjan endüstrisinde lipazlar | 23 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.7.8. Atık su veya atık su arıtımında lipaz | 23 |
| 1.2.7.9. Biyodizel üretimi | 24 |
| 1.2.7.10. Medikal uygulamalar | 24 |
| 1.2.7.11. Kâğıt atıklarının boya giderimi | 25 |
| 1.3. <i>Anoxybacillus</i> Suşları | 28 |
| 1.3.1. <i>Anoxybacillus</i> İçin Uygun Yaşam Ortamı | 31 |
| 1.3.2. Sentetik Ortam | 31 |
| 1.4. Çalışmanın amacı | 31 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 32 |
| 2.1. Lipaz Üretimi | 32 |
| 2.2. Lipaz Üretimi Üzerine Ph ve Sıcaklığın Etkisi | 33 |
| 2.3. Karbon Kaynağının Etkisi | 35 |
| 2.4. Azot Kaynağının Etkisi | 36 |
| 2.5. Zeytin Atık Suyu | 39 |
| 2.6. Lipaz aktivitesi üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi | 39 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 41 |
| 3.1. Kimyasallar | 41 |
| 3.2. Mikroorganizma | 42 |
| 3.3. Kantitatif Lipaz Aktivite Tayini | 41 |
| 3.4. 16S rRNA Analizi ile HBB-180 İzolatının Tanınması | 44 |
| 3.4.1. İzolattan genomik DNA izolasyonu ve PCR | 44 |
| 3.4.2. Data Analizi | 45 |
| 3.5. Kültür Koşullarının <i>Anoxybacillus kaynarcensis</i> HBB 180 Lipaz Üretimi Üzerine etkisi | 45 |
| 3.5.1. Başlangıç pH'ının Lipaz üretimi üzerine etkisi | 45 |
| 3.5.2. İnkübasyon sıcaklığının Lipaz üretimi üzerine etkisi | 45 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5.3. Lipaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi | 46 |
| 3.5.4. Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi | 47 |
| 3.5.5. İnkübasyon Süresinin Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi | 48 |
| 3.5.6. Lipaz Üretimi Üzerine Lipazın Lokalizasyonu..... | 48 |
| 3.6. <i>Anoxybacillus kaynarcensis</i> HBB 180 Lipazının Karakterizasyonu | 49 |
| 3.6.1. Enzim aktivitesi üzerine pH' nın etkisi | 49 |
| 3.6.2. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi..... | 51 |
| 3.7. Verilerin değerlendirilmesi..... | 51 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 52 |
| 4.1. Data analizi | 53 |
| 4.2. Kültür Koşullarının <i>Anoxybacillus Kaynarcensis</i> Hbb 180 Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi | 55 |
| 4.2.1. Başlangıç pH'nın Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi..... | 55 |
| 4.2.2. İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi..... | 57 |
| 4.2.3. Karbon Kaynağının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi | 60 |
| 4.2.4. Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi | 68 |
| 4.2.5. HBB 180'nin zamana bağlı değişimi ve lipaz üretimi | 72 |
| 4.2.6. Lipaz üretimi üzerine lipazın lokalizasyonu..... | 76 |
| 4.3. <i>Anoxybacillus kaynarcensis</i> HBB 180 Lipazının Karakterizasyonu | 77 |
| 4.3.1. pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi..... | 77 |
| 4.3.2. İnkübasyon sıcaklığının Enzim aktivitesi üzerine etkisi | 80 |
| 5. SONUÇLAR..... | 83 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 86 |
| BİLİMSEL ETİK BEYANI..... | 102 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 103 |

SİMGELER 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 ivmesi |
| 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 |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| rRNA | : Ribozomal RNA |
| 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. | Triaçilgliserol lipaz adlandırılması | 5 |
| Şekil 2. | Lipazın 3 boyutlu yapısı | 10 |
| Şekil 3. | Lipazın katalizlediği reaksiyonlar | 12 |
| Şekil 4. | Bakteriyel lipazların katalizlediği reaksiyonlar..... | 18 |
| Şekil 5. | Bacillaceae ailesi şeması | 29 |
| Şekil 6. | HBB 180 izolatına ait filogenetik ağaç | 55 |
| Şekil 7. | Lipaz üretim ortamı üzerine pH'nın etkisi | 57 |
| Şekil 8. | Lipaz üretim ortamı üzerine sıcaklığın etkisi | 59 |
| Şekil 9. | Lipaz üretim ortamı üzerine karbon kaynaklarının etkisi | 65 |
| Şekil 10. | Lipaz üretim ortamı üzerine ticari yağların etkisi | 67 |
| Şekil 11. | Lipaz üretim ortamı üzerine azot kaynaklarının etkisi | 71 |
| Şekil 12. | Büyüme eğrisi başlangıçta | 74 |
| Şekil 13. | Büyüme eğrisi optimum koşullarda | 75 |
| Şekil 14. | Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi | 79 |
| Şekil 15. | Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi | 82 |

TABLolar DİZİNİ

| | | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1 | Bakteriyel lipazların katalizlediği reaksiyonlar..... | 18 |
| Tablo 2. | Günümüzde Mantar Kaynaklı Mikrobiyal Lipazlar ve Endüstriyel Uygulamaları | 25 |
| Tablo 3. | Günümüzde Bakteri Kaynaklı Mikrobiyal Lipazlar ve Endüstriyel Uygulamaları | 26 |
| Tablo 4. | Bacillaceae alt türleri | 29 |
| Tablo 5. | Anoxybacillus türlerinin genel özellikleri | 33 |
| Tablo 6. | LB agar ortam içeriği | 41 |
| Tablo 7. | Kantitatif lipaz tayininde reaksiyon bileşenleri | 42 |
| Tablo 8. | Optimum koşullar altında standart kantitatif lipaz tayininde reaksiyon bileşenleri | 43 |
| Tablo 9. | Enzim üretim üzerine karbon kaynaklarının etkisinin incelenmesi kantitatif besi yerleri | 47 |
| Tablo 10. | Enzim üretim üzerine azot kaynaklarının etkisinin incelenmesi kantitatif besi yerleri | 48 |
| Tablo 11. | pNP'ün farklı pH molar absorpsiyon katsayıları | 50 |
| Tablo 12. | Lipaz üretim ortamı üzerine başlangıç pH'nın etkisi | 56 |
| Tablo 13. | Bazı bakterilerde lipaz üretimi üzerine başlangıç pH'nın etkisi ... | 58 |
| Tablo 14. | Lipaz üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi..... | 59 |
| Tablo 15. | Lipaz üretimi üzerine çeşitli karbon kaynaklarının etkisi | 64 |
| Tablo 16. | Lipaz üretimi üzerine çeşitli ticari yağların etkisi | 66 |
| Tablo 17. | Lipaz üretimi üzerine çeşitli azot kaynaklarının etkisi | 70 |
| Tablo 18. | Büyüme eğrisi başlangıçta..... | 74 |
| Tablo 19. | Büyüme eğrisi optimum koşullarda..... | 75 |

| | | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 20. | Lipaz üretimi üzerine lipazın lokalizasyonu | 76 |
| Tablo 21. | Çeşitli bakteri türlerinde lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi | 78 |
| Tablo 22. | Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi | 79 |
| Tablo 23. | Çeşitli bakteri türlerinde lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi . | 81 |
| Tablo 23. | Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi..... | 82 |



ÖZET

Anoxybacillus kaynarcensis HBB 180 LİPAZININ ÜRETİMİ ÜZERİNE KÜLTÜR KOŞULLARININ ETKİSİ

Aslı ÇANAKÇI Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın 2021

Amaç: *Anoxybacillus* sp. HBB180 tarafından üretilen lipazın, üretim koşullarının optimizasyonu yapılarak en yüksek verimde enzim üretiminin sağlanması amaçlanmıştır.

Materyal Yötem: 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 Stok'larında kayıtlı bulunan HBB180 izolatu kullandı. Lipolitik aktivite gösterdiği daha önceden bilinen HBB180 izolatu; termofilik, Gram-pozitif, endospor oluşturan, çubuk şeklinde ve hareketli bir bakteridir. HBB180 suşunun 16S rRNA dizi analizi sonucunda (%95.07) ile *Anoxybacillus kaynarcensis* türü ile benzerlik gösterdi. HBB180 suşu en iyi enzim üretimi için kültür koşulları optimize edildiğinde; karbon kaynağı olarak %0,5'lik zeytin yağı, azot kaynağı olarak %0,5'lik pepton içeren, pH 6,50 ve 55°C'de saptandı. HBB180 izolatu optimum koşullarda geliştirildiğinde enzim üretimi logaritmik fazın başlarında başladı ve durgunluk fazında (12.saat) maksimuma ulaştı. Enzimin hücre içinde olduğu saptandı. *A. kaynarcensis* HBB180 lipazının pH 8,50'de ve 55 °C optimum aktivite gösterdiği belirlendi.

Sonuç: *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB 180 bakterisinden elde edilen lipazın, endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda termostabil lipaz uygulamalarında kullanım potansiyeli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *Anoxybacillus*, Üretim optimizasyonu, Termofilik, Enzim karakterizasyonu

ABSTRACT

THE EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON LIPASE PRODUCTION BY *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB180

Aslı ÇANAKÇI Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Biology Program, Master Thesis, Aydın, 2021

Objective: It is aimed to ensure the enzyme production with the highest efficiency by optimizing the production conditions of the lipase produced by *Anoxybacillus* HBB180.

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

Results: In this study, HBB180 that was isolated from natural hot springs in Aydın and registered in Adnan Menderes University Department of Biology culture stocks were used. Previously known to show lipolytic activity HBB180 isolate, thermophilic, Gram-positive, endospore-forming, rod-shaped, motile and active bacteria. According to 16S rRNA sequences, it was found that the isolate showed maximum similarity (%99) with *Anoxybacillus kaynarcensis* strain. The best enzyme production from HBB180 was determined in medium including %0,5 olive oil as carbon source and %0,5 pepton as nitrogen source, pH 6,50 and 55 °C. When the HBB180 isolate was developed under optimum conditions, enzyme production started early in the logarithmic phase and reached its maximum in the stagnation phase (12th hour). It was determined that most of the enzyme activity was intracellular. Intracellular Lipase enzyme of *Anoxybacillus kaynarcensis* showed maximum activity at pH 8,50 and 55 °C.

Conclusion: We think that lipase obtained from *Anoxybacillus Kaynarcensis* HBB 180 bacterium has a potential to be used in thermostable lipase applications in industrial and biotechnological fields.

Key Words: Lipase, *Anoxybacillus*, Lipase production, Thermostable Enzyme, Characterization

1. GİRİŞ

Bugün yaklaşık 2500 enzim türü bilinmektedir ve bu enzimlerin 200 civarı ticari olarak kullanımdadır. Endüstriyel enzimlerin ana kaynağı mikroorganizmalardır. Hidrolitik enzimler, endüstriyel enzimlerin %75'lik kısmını oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların enzim üretiminde kullanılması bazı önemli avantajlara sahiptir. Bitki ve hayvan enzimleri ile karşılaştırıldığında, mikrobiyal enzimler aşırı koşullar altında daha yüksek stabilite gösterebilir ve daha yüksek miktarlarda üretilir. Ayrıca, mikrobiyal enzimlerin üretimi organik atıklar kullanılarak düşük maliyetle gerçekleştirilebilir. Öte yandan, enzim üreticisi mikroorganizmalar kolay ve hızlı bir şekilde taranabilir ve enzim üretimini arttırmak için gerekli olan genetik modifikasyonlar mikrobiyal hücreler üzerinde daha kolay yapılabilir. Endüstriyel olarak önemli enzimler arasındaki lipazlar, toplam satışlarda üçüncü büyük grup olarak kabul edilmektedir. Lipazlar esterleşme, hidroliz ve alkaliz gibi çok spesifik kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirebilir. Yüksek substrat spesifitesi, aktivitesi ve seçiciliği nedeniyle, lipazlar gıda, yakıt, kâğıt, deterjan, süt, deri, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde çeşitli uygulamalar bulurlar (Tuysuz vd.,2019; Kıran vd. 2006).

Termofilik mikroorganizmalar özellikle endüstriyel öneme sahip önemli lipaz kaynağı olarak kabul edilir. Termofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen lipazlar, organik çözücülerdeki yüksek sıcaklıklarda oldukça stabil bir yapı sergiler ve yüksek aktivite gösterir. Ayrıca, bu lipazlar kimyasal denatürasyona karşı yüksek direnç gösterirler ve alkalik pH'larda yüksek aktiviteye sahip olabilirler. Alkali pH'larda ve yüksek sıcaklıklarda yüksek aktiviteleri ve stabiliteleri nedeniyle, termofilik lipazlar esas olarak deterjan endüstrisinde kullanılır (Bakir vd., 2016; Ugras, 2017).

Şimdiye kadar, *Bacillus*, *Geobacillus* ve *Thermomonas* gibi bakterilerin türlerinin umut verici termofilik lipaz kaynakları olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Mohammad, 2017). Bununla birlikte, termofilik enzimlerin endüstriyel ve biyoteknolojik önemi nedeniyle, bu enzimleri üretebilecek yeni mikroorganizmaların keşfi ile ilgili çalışmalar sürekli artmaktadır. Artan taleplere cevap verebilmek için enzimlerin yüksek miktarlarda üretilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, ortalama maliyet önemli bir sorun olarak kabul edilir. Bu sorunu çözmek için, tarımsal atıklar veya yan ürünler mikroorganizmalar için ucuz enzim üretim substratı olarak kullanılır. Örneğin; hindistancevizi, limon kabuğu, kahve kabuğu ve soya kalıntıları gibi atık maddeler mikrobiyal lipazların üretimi için ucuz substratlar olarak

kullanılmıştır (Parihar,2012; Venkatesagowda,2015). Benzer şekilde, araştırmacılar atık kıztartma yağının mikrobiyal lipaz üretiminde ucuz substratlar olarak da kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Christopher,2015; Ferreira vd.,2017). Diğer taraftan, karbon ve azot kaynakları, mineraller, pH, sıcaklık, yüzey aktif cisimleri, inokulasyon miktarı ve inkübasyon süresinin lipaz üretimini etkileyebileceği belgelenmiştir (Bakir vd. 2016).

1.1. Enzimler

1.1.1. Enzimlerin Tarihçesi

W. Künhe, terim olarak ilk enzim kelimesini mayalanmayı (ferment=fermantasyon) kast etmek amacı ile kullanılmıştır (Aehle, 2007). İnsanlık, tarih boyunca mikroorganizmaları ve enzimleri bilmeden enzimatik reaksiyonlarda kullanmışlardır. Günlük yaşamda kullanılan enzimler daha çok; ekmek, maya, kırmız, boza gibi besinlerde kullanılmaktadır. Fermentasyon, oksidatif fosforilasyon olmadığı zaman, glikozdan enerji elde edilmesini sağlayan olaydır. Bu olay canlı hücrelerce sahip olunan enzimler tarafından gerçekleşmektedir (Hammamchi, 2014).

Payen ve Persoz ilk defa 1833 yılında presipitasyon yolu ile alkol kullanıp malt ekstresinden, nişastayı sindiren enzimi tespit etmiştir. Bu enzimi diyastaz enzimi olarak adlandırmışlardır. Schwan 1836 yılında midesuyunda pepsin enzimini ayırt etmiştir. Summer, 1926 yılında üreazı tespit etmiştir, üreaz enzimi kristal yapıda bulunan ilk enzim olmuştur. Pepsin, Tripsin gibi kristalize enzimler 1930-1936 yıllarında tespit edilmişlerdir. İsveçli kimyager S.S. Berzelius tamamen izole bir enzim için ilk çalışmayı 1835 yılında gerçekleştirmiş ve katalizör kavramını ortaya koymuştur. Gagnrard ve Schav 1838'de çalışmalarında fermentasyonunu incelemiş, mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirildiğini ve bu mikroorganizmaların maya olduğunu bildirmiştir (Mercan, 2018; Punekar,2018). Louis Pasteur 1850'li yıllarda şekerin mayayla alkolü fermentasyonun fermentlerle katalizlendiğini ortaya koymuştur. W. Kuhne, 1879 yılında canlı mikroorganizmalardaki katalizörleri ayırmak için enzim terimini kullanmıştır. Blumenthol 1885 yılında peynir yapımı için, rennin özütünü üretmeyi başarmıştır. Rahm izole edilen lipaz ve proteaz enzimlerini deterjanlara eklemiş ve etkili temizleyici madde olarak belirlenmiştir. Enzimlerin tanınma aşamalarında 1930 yıllarında 80 farklı enzim bilinmekteyken, günümüzde ise 2500 civarı enzimin bilinmektedir. Bugün bilinen, tespit edilmiş enzimlerin birçoğu izole edilmiş ve 200'den fazlası kristalize edilmiştir. Enzimler üzerine genetik çalışmalar devam etmektedir henüz tespit edilmemiş

birçok enzimin olduğu düşünölmektedir (Punekar, 2018).

1.1.2. Enzimlerin Tanımı ve Özellikleri

İnsanlar, enzimlerin önemini binlerce yıl önce fark emişlerdir; şarapların ve biranın arıtılması ve filtrasyonu endüstriyel enzimlerin uygulamasının en eski örneklerindedir. Enzimlere yapılan en eski yazılı referanslardan biri, Homeros'un M.Ö. 800'lü yıllara dayanan epik şiirlerinde bulunur ve burada enzimlerin peynir üretiminde kullanıldığını bahsedilir.

Enzimler, hücre içinde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden, RNA enzimleri (ribozimler) hariç protein yapıda olup, kimyasal reaksiyonları hızlandıran, gerekli olmadıkça yan ürün vermeyen %100 verimle görevini gerçekleştiren, yapısı bozulmadan reaksiyondan çıkan moleküllerdir. Tüm canlı organizmalar, belirli bir bileşici (substrat olarak) daha yüksek reaksiyon hızında ürünlere dönüştürme kapasitesine sahip olan biyolojik katalizör olarak adlandırılan bu enzimler tarafından oluşturulur ve korunur. Kataliz terimi, yunanca reaksiyonu hızlandıran kolaylaştıran anlamındadır. Kimyasal katalizör gibi enzimler de aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artırır. Böylece ürünler daa hızlı oluşur ve reaksiyonlar daha hızlı denge durumuna gelir. Çoğu enzimatik reaksiyonun hızı, katalize edilmemiş reaksiyonlarından milyonlarca kat hızlıdır. Aksi takdirde yüzyıllarca sürebilecek dönüşümleri dakikalar hatta saniyeler içinde gerçekleştirebilirler. Enzimlerin canlılarda yaklaşık 4000 biyokimyasal reaksiyonu katalize ettiği bilinmektedir. Enzimler diğer protein yapılar gibi DNA denetiminde sentezlenir. DNA yapısında gelişen hata enzimlerin yanlış sentezlenmesine neden olmaktadır. Hatalı sentezlenmiş olan enzimler katalitik etkinlik göstermezler. Enzimlerin spesifikliği, katalize ettikleri belirli reaksiyonlar ile ilgili özellikleridir. Protein yapılı olan enzimlerin en küçük yapıtaşı, diğer proteinler gibi aminoasitlerdir. Proteinler ile enzimlerin arasındaki en önemli farklılık, enzimlerin biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilme yetenekleridir. Enzimler düşük aktivasyon enerjisi gerektirir. Metabolizmada birçok reaksiyon vücut sıcaklığı ve basıncında olabilmektedir. Enzimler ılıman sıcaklık, pH ve hücre basıncı koşullarında reaksiyonların hızlı bir şekilde ilerlemesine izin veren katalizörlerdir. Enzimler pH, sıcaklığın ve basıncın optimum koşullardaki çözeltilerde etkindir. Biyolojik olmayan katalizörler ise, çoğunlukla bu özelliklere sahip değillerdir.

Bazı enzimler doğaları gereği daha basit moleküllerden karmaşık moleküller oluşturmak için tasarlanmışken, diğerleri karmaşık molekülleri daha basit olanlara ayırmak,

ayrıca birkaç molekülü modifiye etmek için tasarlanmıştır. Enzimler çevre açısından güvenli ve doğaldır. Gıda ve hatta ilaç endüstrisinde çok güvenli bir kullanılırlar.

Farklı uygulama sektörlerine göre endüstriyel enzimler şu şekilde sınıflandırılabilir:

- 1) Gıda endüstrisindeki enzimler,
- 2) İşlem yardımcıları için enzimler,
- 3) Endüstriyel biyokatalizör olarak enzimler,
- 4) Genetik mühendisliğinde enzimler,
- 5) Kozmetiklerdeki enzimler.

Endüstriyel uygulamaları ile birlikte enzimlerin üretimine dahil olan mikroorganizmaların listesini göstermektedir (Association,2001; Blanco A. ve Blanco G. 2017; Gündüz vd.,2011; Mercan vd.,2018; Nelson vd.,2005; Lehninger, 2001; Wolfson vd. 2008; Patel vd.,2017).

1.1.3. Enzimlerin İsimlendirilmesi

a) Geleneksel isimlendirme

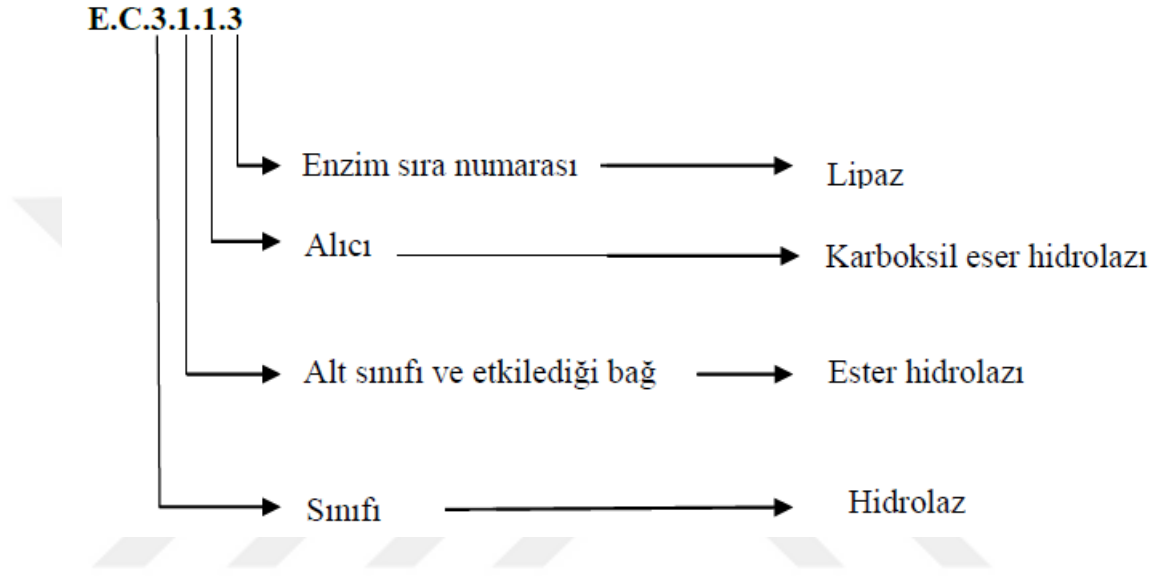
Enzimler için önceleri genel bir tanıma uymayan pepsin, rennin, tripsin gibi isimlendirilme kullanılmıştır. Daha sonra enzimin substrat ismine –az eki getirilir ya da substratın ardından katalizlediği reaksiyon tipiyle ilgili kelime eklenerek isimlendirilir.

b) Sistematik isimlendirme

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

1.1.4. Enzim Kodlanması

Sistemik adlandırmada enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre yedi gruba ayrılmışlardır. Her enzime ait kod numarası vardır. Kod numarasının dışında bir de sistemik ad verilmiştir. X. Y. Z. V şeklinde 4 rakamdan oluşur. e, X; 7 büyük sınıftan birini, Y; birinci alt sınıf, Z; ikinci alt sınıf ve V; ise enzim numarasını işaret eden semboller olarak kullanılırlar. (Şekil 1).



Şekil 1. Triaçilgliserol lipaz adlandırılması (E. C.; Enzyme Commission)

1.1.5. Enzimlerin Sınıflandırılması ("Enzyme Classification and Nomenclature,"

Enzimler, organizmaların yaşam aktiviteleri için önemli bir role sahiptir. Enzimler metabolizma, beslenme, enerji ve diğer birçok kimyasal reaksiyonları yönetiyorlar. Enzim komisyonunu enzimlerin klasik ismine ek olarak sistemik bir isim vermiştir. Bu sistemik isim, substratın adını ya da bütün substratların adını içerir -az ekiyle biten kelime, katalizlenen tepkimenin işlevini gösterir. Bu kelime, enzimlerin 7 ana sınıfından biri ya da alt sınıflarından birini ifade etmektedir. Tepkime iki tür değişim içeriyor ise, ikinci fonksiyonu parantez içinde gösterilir.

1. Oksidoredüktazlar: Redüksiyon ve oksidasyon bu enzimlerin tepkimeleridir. Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının katalizlendiği enzim gruplarıdır

2. Tranferazlar: Alıcı ve verici molekül arasında hidrojen haricinde atomların transfer edildiği enzimlerdir.

3. Hidrolazlar: Tepkime sonucunda bir mol su katılması ile bağları hidrolize eden enzimlere denir.

4. Liyazlar: Bileşiklerden su molekülü çıkmadan substrat gruplarının uzaklaştırılması, çift bağların oluşturulması reaksiyonlarının gerçekleştirildiği enzimlerdir.

5. İzomerazlar: Moleküllerde değişiklik yapan ve dizilişini değiştiren enzimlere denmektedir.

6. Ligazlar: ATP veya GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının parçalanması sonucu açığa çıkan enerji ile bileşiklerin bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

7. Translokazlar: İyonların veya moleküllerin membranlar arasındaki hareketini veya bunların membranlar içindeki ayrılmasını katalize etmektedirler.

1.1.6. Enzimlerin Yapısal Özellikleri

Ribozimler hariç bilinen tüm enzimler proteinlerden oluşurlar ve proteinlere ait tüm yapısal özelliklere sahiptirler. Enzimlerin yapıları ve görevleri bakımında apoenzim ve kofaktör olarak iki yapı taşı vardır (Dharmstithi vd., 1998).

Apoenzim; protein yapısında olması nedeni ile kolayca denatüre olabilir. Apoenzim, enzimlerin reaksiyonları katalizlenmesini sağlar. Enzimler aktive olabilmek için aminoasit kalıntılara ihtiyaç duyarlar. Bazı enzimlerde sadece amino asit kalıntıları değil aynı zamanda, kofaktör iyonlara ya da organik koenzim bağlanarak aktive olmaktadır. Koenzim veya kofaktör yapıları ancak bir apoenzimle bağlandığında enzim yapısında aktif olmaktadır (Adam, 2012; Pandey vd., 2006).

1.1.6.1. Aktif bölgeler

Enzimlerin substata bağlanarak onu katalitik olarak değişikliğe uğrattığı bölgeye aktif bölge olarak adlandırılmaktadır. Enzim reaksiyonları aktif bölge de gerçekleşmektedir. Aktif bölgeye bağlanmış moleküle substrat denilmektedir. (Adam, 2012; Kingsley vd., 2015).

1.1.6.2. Katalitik etkinlik

Diğer tüm katalizörler gibi enzimler de iki temel özellik ile karakterize edilir. İlk olarak, reaksiyon tarafından tüketilmeden veya kalıcı olarak değiştirilmeden kimyasal reaksiyonların hızını arttırlar. İkincisi, reaktanlar ve ürünler arasındaki kimyasal dengeyi değiştirmeden reaksiyon hızlarını arttırlar. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, reaksiyonun hızının tespitiyle hesaplanmaktadır. Bir mol aktif enzimin dakikada son ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına Turnover sayısı denilmektedir. Enzimlerin aktivitesi bu sayı ile ifade edilir. Turnover sayısının diğer adı enzim birimi veya ünitesi olarak da adlandırılır. Enzim birimi ise, dakikada bir mikromol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak ifade edilir (Cooper, 2000; Z. Zhao vd., 2016).

1.1.6.3. Spesifikklik

Enzimler benzer substratları kolaylıkla ayırabilen özel ve özgün moleküllerdir. Enzimleri ayıran önemli özelliklerinden biri bu spesifiktir. Enzim spesifikkliği her enzimin aktif alanının benzersiz olması nedeniyledir (Nelson vd.,2005).

1.1.6.4. Enzim Aktivitesi

Bir enzimatik tepkimenin hızı, enzimin etkinliği veya enzimin aktivitesi ile ilişkilidir. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik tepkimenin hızının, enzim etkisiyle optimum koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekölünü ürün haline dönüştürür.

1.1.6.5. Sıcaklık

Sıcaklık artışıyla tepkime hızı artış gösterir. Bu durum moleküllerin kinetik enerjilerindeki artışa bağlıdır. Bu kinetik enerjideki artış, enzimin yapısında bulunmakta olan zayıf olan hidrojen ve hidrofobik bağların kopmasını sağlamakta olan enerjiyi aşar. Yüksek sıcaklıkta proteinlerin yapısında bozulma olur ve katalitik etkinliği yok olur. Sıcak su kaynaklarında ya da okyanus tabanındaki hipertermal akıntılarda bulunan

mikroorganizmalarda bulunan enzimler 100 °C ve üstü sıcaklıklarda bozulmadan kalabilmektedirler. Bu neden ile canlı dokulardan saflaştırılan enzimler, soğuk ortamda korunmalı ve sıcaklığa maruz bırakılmamalıdır (Murray, 2004; Steinweg vd., 2012).

Enzimler, bazı sıcaklık değerlerinde tam verim ile çalışır. Bu sıcaklık değeri her enzim için farklılık gösterir. Enzimlerin tam verimle çalıştığı sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Optimum sıcaklık değerleri genelde bitkilerde, hayvanlara göre daha yüksektir. Enzimler optimum değeri derecesini geçen ortamda bulunduğu protein yapıları bozulur. Bu neden ile enzim için optimum sıcaklıkta aktivite en yüksek seviyede iken bu derece geçildiğinde enzim yapısı bozulmaya başlar (Eed, 2012; Murray, 2004).

1.1.6.6. pH

Enzimlerin substrat, koenzim molekülleri asit ya da baz yan gruplar içerir. Enzim substrat komplekslerinin stabil olarak oluşması, hızının maksimum seviyede olması için, bu grupların belirli bir seviyede iyonlaşmaya sahip olması gereklidir. Her enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu pH değeri vardır, bu değere enzimin optimal pH'ı denilmektedir. Bu değerlerin altı ve üstünde pH aktivite hızını yavaşlatır. Enzimlerin optimum pH seviyesi normal hücre içi pH seviyesiyle aynı değildir. Canlı hücrelerde ortam pH seviyesi nötre yakındır. Enzimlerin pH 3-8 arasında bir optimum pH seviyesi olduğu bilinmekle birlikte. Birçok enzimin optimum pH seviyesi nötre yakındır. Enzimler ile yapılan laboratuvar çalışmalarında reaksiyon ortamının pH'ı bilinmesi gerekir, çünkü fazla asidik ya da bazik ortam enzim molekülünün yapısını bozacağından dolayı reaksiyon hızı düşer (Eed, 2012; Murray, 2004).

1.1.6.7. Enzim konsantrasyonu

Enzim miktarı ortamda arttıkça enzimatik reaksiyon hızı da enzim miktarı ile doğru oranda artar (Grahame vd., 2015).

1.1.6.8. Substrat konsantrasyonu

Substrat miktarı yoğunluğu arttıkça, reaksiyonun hızı da artar. Reaksiyon hızı maksimum seviyeye ulaştıktan sonra sabit bir seviyede devam eder. Ortamda yoğun miktarda

substrat olması halinde, substrat bitene kadar enzim sürekli çalışır. Optimum substrat düzeyinin üstündeki substrat miktarı, enzim reaksiyonun hızını, belirli bir seviyeden sonra artırmaz. Bu durum reaksiyon kinetiğinin iki fazlı olduğunu göstermektedir (Grahame vd., 2015; Scopes, 2001).

1.1.6.9. Zaman

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar devam ederken hızları zamanla azalır. Bu durum oluşan ürünlerin birleşip ters yönde tepkime oluşturması, enzimin inaktif olması, ortamda substrat kalmaması gibi sebepler ile gerçekleşebilir (Eed, 2012; Scopes, 2001).

1.2. Lipazlar

1.2.1. Tarihçe

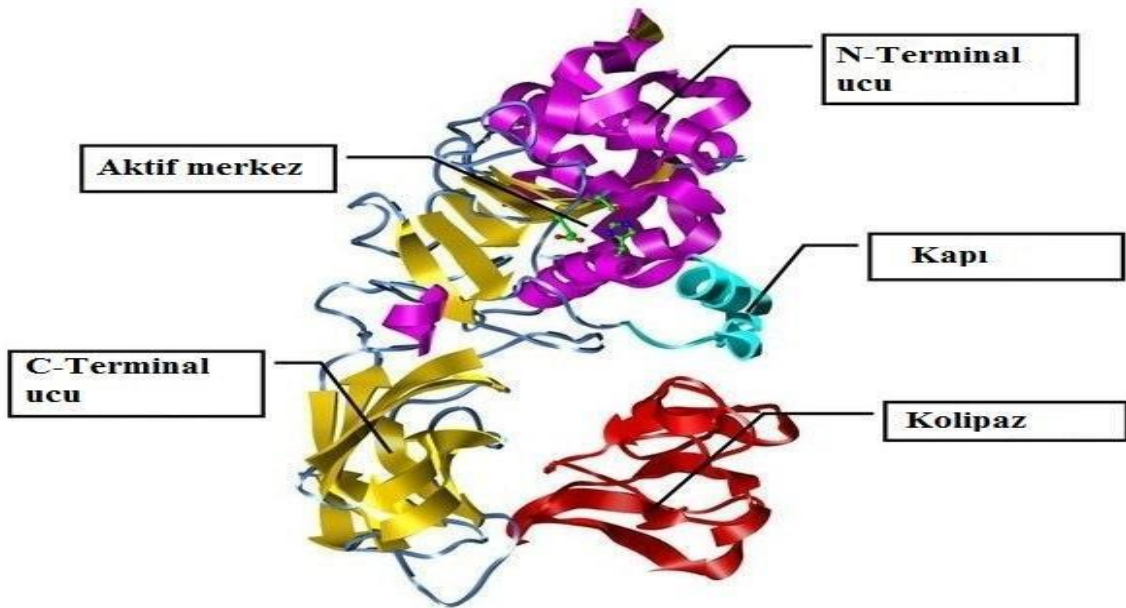
Lipitler; dünyadaki biomasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Lipolitik enzimler ise suda çözünmeyen bileşiklerin dönüşümünde önemli rol oynar. Lipolitik enzimler, lipazlar (EC 3.1.1.3) ve esterazlar (EC 3.1.1.1), kısa ve uzun zincirli karboksilik asit esterlerini hidrolize etme yetenekleri ile karakterizedir. Lipazlar doğada bol bulunan bir enzim grubudur. Lipazlar üzerine çalışma yapılan en eski enzim grubudur. Lipaz ilk olarak pankreas suyunda 1856'da Claude Bernard tarafından bir enzim olarak keşfedildi, bu da çözünmeyen yağ damlacıklarını hidrolize ederek onları çözünür ürünlere dönüştürdü. Bitkisel tohumlarda lipazın varlığı ise 1871 yılında kanıtlanmıştır. 1901 yılında *Bacillus prodigiosus*, *B. Pyocyaneus* ve *B. fluorescens* bakterilerinde lipaz üretimi gözlemlenmiştir. Büyük ölçekte lipaz üretimi için *Serratia marcescens*, *Pseudomonasa aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterileri türlerinde tespit edilmiştir. Lipolaz, *Thermomycesl anugiwnosus* mantarından sanayileşen ilk ticari rekombinant lipazdı ve 1994'te *Aspergillus oryzae*'de eksprese edildi. Geleneksel olarak lipaz, hayvan pankreasından elde edilmiştir ve ham veya saflaştırılmış kalitede sindirim takviyeleri olarak uygulanabilir hale getirilmiştir. Birkaç yeni kimyasal bileşiğin sentezi için biyokatalitik prosedürler olarak yaygın şekilde kullanılmıştır (Ay vd., 2011; Hasan vd., 2006, Sharma vd., 2017; Chandra vd.,2020, Sarmah vd.,2017; Sindhu vd., 2021).

1.2.2. Lipazların Yapısı

Doğal olarak, lipaz enzimleri yaşayan her organizmada bulunur. Doğada birbirinden genetik olarak farklı birçok lipaz enzimi bulunur, ancak üç boyutlu yapıları birbirlerine benzerdir. Lipazların α heliks ve β iplik yapısından oluşan protein yapılarından oluşmaktadır (Şekil 2) (Guncheva vd., 2011).

Lipazlar, en popüler biyokatalizörlerdir. Lipazlar veya triaçilgliserol asil hidrolazlar, trigliseritlerin hidrolizine yardımcı olan ve karboksilik ester bağları üzerinde etkili olan bir hidrolaz enzimleri sınıfıdır. Lipazlar normalde tek mideli insanlarda ve hayvanlarda ortaya çıkar. Lipaz enzimleri genellikle yağların ve lipitlerin sindirimine yardımcı oldukları pankreas ve midede üretilir. (Sindhu vd.,2021)

Enantioselektiflik, bölge seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi spesifik özellikler nedeniyle, lipaz tüm enzimler arasında daha fazla ilgi görmektedir (Sharma vd.,2017). Lipazlar triaçilgliserolleri yağ asitleri ve gliserole hidrolize eder. Lipazlar monotrigriseritleri, ditrigriseritleri ve trigliseritleri hidrolizleyen enzimleridir. Lipazlar; mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkiler tarafından üretilebilirler. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen lipazlar fungus ve bakterilerden elde edilmektedir. Lipazlar, suda çözünen enzimlerdir ve suda çözünmeyen substratlar üzerine etki ederler. (Akoh vd., 1998; Jaeger vd., 2002; Mercan, 2018; Öztürk, 2002).



Şekil 2. Lipazın üç boyutlu yapısı

1.2.3. Lipazların Biyokimyasal Sınıflandırması

Bu bölüm, spesifiklik temelinde lipaz sınıflandırmasını kapsar. Lipazlar geniş bir reaksiyon dizisini katalize eder ve aynı zamanda her yerde bulunurlar. Genel olarak lipazlar kaynaklarına göre sınıflandırmanın dışında spesifiklik özelliklerine göre de sınıflandırılabilirler (Şekil 3). Spesifiklik, lipazların endüstriyel uygulamalarını tasvir etmede önemli bir özelliktir ve bunlara dayalı olarak üç ana kategoriye ayrılabilir: (i) substrata özgü, (ii) bölgesel seçici ve (iii) enantiyoselektif. Reaksiyon türleri, ilgili enzim-substrat sistemleri ve bunların uygulama alanlarını içeren ek ayrıntılar da tablo1’de özetlenmiştir. Lipazın spesifiklik özelliği enzimin moleküler özelliklerine, substratın yapısına ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörlere bağlıdır. Lipazların yağ asidi seçiciliği, tıbbi gıdalar için yağ üretimi ve yağın besin değerini arttırmak için kullanılmaktadır (Sarmah vd.,2017, Sinduh vd.,2021).

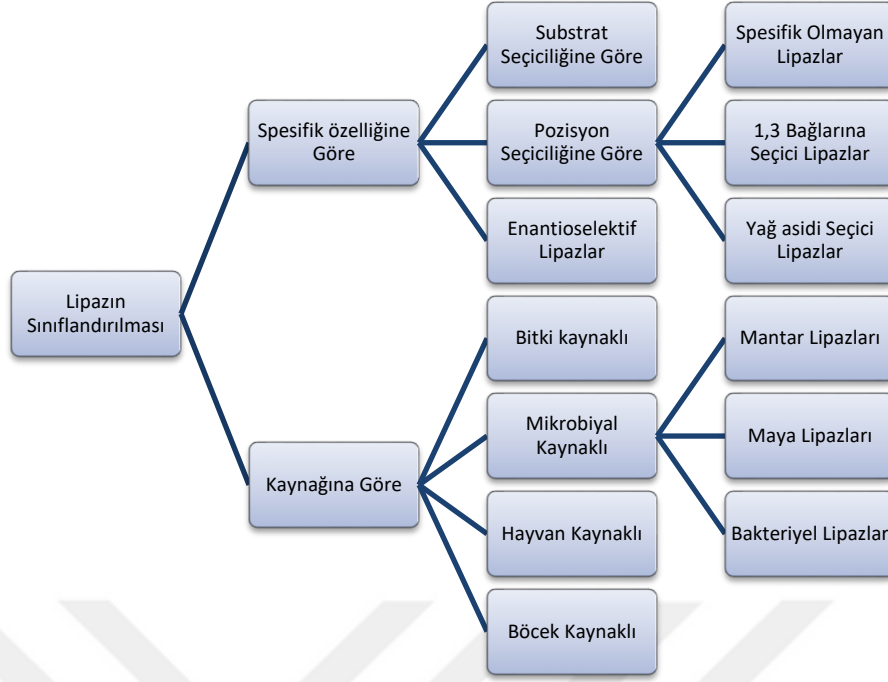
Enzimleri kimyasal reaksiyonlardan ayıran en önemli özellikleri spesifik olmalarıdır. Proteinlerin yapılarıyla ilgili bilgilerin, gelişen teknoloji ile artması, proteinleri üç boyutlu yapılarına göre sınıflandırma fikrini geliştirmiştir. Hidrolazlar sekonder katlanmış yapılar gösterirler. Ollis arkadaşları (Ollis, 1992) 1999 yılında tanımladığı α/β -hidrolaz, aktiviteleri genellikle serin, histidin ve aspartat amino asitlerinin oluşturduğu katalitik üçlüye bağlı olan çeşitli enzimlerden oluşmaktadır. Lipazlar ve esterazların çoğu bu kıvrım yapısını gösterirler (Fojan vd., 2000; Sharma vd., 2001)

1.2.3.1. Spesifik Özelliğine Göre Lipazlar

1.2.3.1.1. Substrat Seçiciliğine göre Lipazlar

Substrata özgü lipazlar, ham hammaddelerin bir karışımı içinde belirli bir substrat üzerinde seçici olarak etki ettikleri reaksiyonlarda etkili bir şekilde kullanılabilir, biyodizel üretiminde ve yüksek saflıkta diaçilgliserollerin üretiminde lipaz kullanımının gösterdiği gibi, istenen ürün sentezinde kolaylaştırdıkları ve belirli bir substrat üzerinde seçici olarak etki ederler (Sarmah vd.,2017)

Genel olarak, substrata özgü lipazlar tarafından etki edilebilen substratlar arasında yağ asitleri ve alkol bulunur. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, endüstriyel olarak ilgili çeşitli işlemlerde lipazlardan yararlanmak için enzim stabilitesiyle birlikte substrat spesifikliğinin önemini bildirmektedir (Sarmah vd.,2017)



Şekil 3. Lipazın kaynaklarına ve spesifiklik özelliklerine göre sınıflandırılması

1.2.3.1.2. Pozisyon Seçiciliğine göre Lipazlar

Pozisyon seçici lipazlar, reaksiyonu diğer yan reaksiyonlara göre daha uygun bir yönde yönlendirme eğilimindedir. Lipazların bu özelliği, kimya ve ilaç endüstrileri için, özellikle yalnızca belirli konfigürasyon altında optimum işlev gösteren izomerik bileşiklerin üretiminde büyük önem taşımaktadır. Pozisyon seçici lipazlar ile son dönemlerde yapılan çalışmalara örnek olarak *Rhizopus (R.) oryzae*, *C. rugosa*, *C. Antarctica*, *Burkholderia cepacia* lipazları ile verilebilir. (Kumar vd.,2016; Sarmah vd.,2017)

a) Spesifik Olmayan Lipazlar

Bu sınıf lipazlar çok sağlamdır ve birden fazla alt tabaka üzerinde hareket etme kabiliyetine sahiptir. *Mucor (M.) meihei* lipazları da buna örnek olarak verilebilir, kozmetik endüstrisinden biyodizel üretimine kadar çok çeşitli reaksiyonları katalize edebilir. Genellikle triaçilgilin hidrolizini katalize ederler. Ortam çalışma koşullarına bağlı sıcaklığa daha dayanıklı olmaları nedeniyle daha avantajlı olduğu bulunmuştur. (Sarmah vd.,2017)

b) 1,3 bağlarına spesifik lipazlar

Yağ asitleri, 2-monoaçilgliseroller ve 1,3 veya 2,3 diaçilgliserol üreten C1 ve C3 pozisyonlarında triasilgliserollerin hidrolizini katalize ederler. Son iki bileşiğin kararsızlığı nedeniyle, diaçilgliserol ve monoaçilgliserol oluşur. Diaçilgliserollerin oluşumu, triaçilgliserollerden elde edilen monoaçilgliserollerle karşılaştırıldığında çok daha hızlıdır (Sarmah vd.,2017).

Bu gruba giren lipazlar sadece sn-1, 3 pozisyonundaki yani dıştaki ester bağlarını parçalar. *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Carica papaya*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar* ve *Mucor miehei* türlerinden elde edilen lipazlar buna örnek olarak verilebilir. Bu lipazlar, yağ iç esterleşmesinde kullanıldığından elde edilen triaçilgliserollerin karışımı kimyasal iç esterleşme sonucunda elde edilen triaçilgliserollerin karışımından çok farklıdır. Çünkü açıl göçü 1 ve 3 pozisyonlarında sınırlandırılmıştır. İç esterleşme reaksiyonları organik fazda gerçekleştiğinden izomerleşme olmayacağından dolayı triaçilgliserollerin 2- pozisyonundaki açıl grubu değişmez ve böylece iç esterleşme olayını kısmen kontrol altında tutma imkânı doğar (Sarmah vd.,2017).

c) Yağ asidinie spesifik lipazlar

Bu grup lipazlar, C-9 üzerinde çift bağlı uzun zincirli yağ asitlerine sahip esterleri hidrolize eder. Farklı karbon zinciri uzunlukları, doyumluk derecesi ve farklı yan zincirlere sahip farklı substratlara yönelik yağ asidi spesifikliği gösteren birkaç lipazın tanımlanmasını içeren, yağ asidine özgü lipazlar hakkında ayrıntılı bir çalışma bildirilmiştir. *Geotrichum candidum* lipazı cis-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine seçicidir (Sarmah vd.,2017).

1.2.3.1.3. Enantiospesifikliğine göre lipazlar

Lipaz enzimlerinin enantiospesifikliğı, özellikle ilaç sanayinde son yıllarda büyük gelişmelere olanak sağlamıştır. Enantiospesifiklik, lipaz enziminin rasemik karışımlarda, karışımda bulunan molekül formülleri birbirine eşit, fakat atomların üç boyutlu yerleşimi birbirlerinin ayna aksi olan izomerlerden birine ilgi göstermesi ve onunla reaksiyona girebilmesidir. İlaç sanayinde, günümüzde 500'den fazla ilaç formülünde, rasemik karışımlar kullanılmaktadır. Enantioizomerlerin farmasötik aktiviteleri ve yan etkileri birbirlerinden

farklı olup, kullanılan tüm rasem karışımları için bu özellikler tam olarak saptanmış değildir. İlaç endüstrisinin ve ABD Gıda ve İlaç Yönetiminin en çok ilgi duyduğu konulardan biri kiral ilaçların, yani bir rasemat yerine tek bir enantiomer içeren ilaçların, üretim ve satışlarıdır. Bazı ilaçlar, yalnızca bir enantiomer etkin madde olmasına rağmen yıllardan beri rasemat olarak pazarlanmaktadır. İltihap giderici bir madde olan ibuprofen (Advil, Motrin, Nuprin) böyle bir örnektir. İbuprofenin yalnızca (S) izomeri etkindir. (R) izomeri vücutta yavaş bir şekilde (S) izomerine dönüşmesine rağmen iltihap önleyici bir etkiye sahip değildir; yalnızca (S) izomerlerinden oluşmuş 27 bir ilaç rasemata göre çok daha hızlı bir etki gösterir. Yüksek tansiyona karşı kullanılan bir ilaç olan metildopa (Aldomet) da bu etkisini yalnızca (S) izomeriyle gösterir. En çarpıcı örnek ise penisilamindir. Penisilaminin (S) izomeri primer kronik eklem iltihapları için etkili tedavi edici bir madde olmasına rağmen, bileşiğin (R) izomerinin herhangi bir tedavi edici etkisi yoktur, üstelik son derece zehirlidir (Sarmah vd.,2018).

1.2.3.2. Kaynağına Göre Lipazlar

1.2.3.2.1. Bitki kaynaklı lipazlar

Lipazlar, bir bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilebilir. Bitki lipazlarının çoğu tohum kaynaklı elde edilir. Tohumlarda lipaz aktivitesi, diğer kaynaklardan daha fazla görülür. Yüksek konsantrasyonda triasilgliserol içerirler ve bu nedenle bitkilerin büyümesi için enerji kaynağı olarak hizmet ederler. Lipaz aktivitesi bitki tohumlarında triaçil olarak çimlenme sırasında artar. Gliserollerin etkisi ile çözünür şekerlere dönüştürülür. Bitki lipazları, düşük maliyetleri nedeniyle çok ilgi görmektedir (Sarmah vd.,2017).

1.2.3.2.2. Hayvan ve Böcek kaynaklı lipazlar

Hayvan hücreleri sindirimi sağlayan lipazları sentezler. Bununla birlikte, hayvan lipazları daha sık ticari üretimden ziyade klinik tanıda kullanılır. Bitki ve mikrobiyal lipazlara kıyasla, bu lipazlar çok daha az araştırılmıştır. Lipazların böcek dokularından da elde edilebileceği ve özellikle larva gelişiminde rol oynadığı saptanmıştır (Sarmah vd.,2017).

1.2.3.2.3. Mikrobiyal kaynaklı lipazlar

Mikrobiyal lipazlar arasında mantar, maya ve bakteri lipazları bulunur. Mikrobiyal lipazların çok yönlülüğü, üretim ve kullanım kolaylığı nedeniyle endüstriyel uygulamalar için dikkat çekmektedir.⁷³ Mikrobiyal lipazın olağanüstü spesifikliği, biyoteknolojik uygulamalar için güçlü ve ayrıntılı bir araçtır. Mikrobiyal lipazların çoğu bakteri ve mantar türlerinden elde edilen hücre dışı lipazlarıdır. Üretimleri, ortam bileşenlerinden büyük ölçüde etkilenir. Sıcaklık, pH gibi fizikokimyasal faktörlerin yanı sıra ve çözülmüş oksijen gibi faktörlerden etkilenmektedirler (Sarmah vd.,2017).

a) Fungal Lipazlar

Tüm mikrobiyal lipazlar arasında mantar lipazları, benzersiz olmaları nedeniyle yaygın olarak kullanılan lipazlardır. Sıcaklık ve pH stabilitesi, substrat özgüllüğü gibi özellikler, düşük maliyet ve organik çözücüdeki verimli aktiviteleri tercih edilmektedirler. 6 fungal lipazlar hem hücre dışı hem de hücre içi karbon ve nitrojen bileşimine bağlı olarak bu lipazlar, çok çeşitli reaksiyonları katalize edebilirler. Tablo 2’de ayrıntılı olarak fungal lipazlara örnekler verilmiştir (Sarmah vd.,2017).

b) Maya Lipazlar

Maya lipazları, benzersiz niteliklerine ek olarak kültür kolaylıkları sayesinde ilaç, kimya ve biyodisel endüstriyel uygulamaları açısından tercih edilirler (Sarmah vd.,2017).

c) Bakteriyel Lipazlar

Bakteriyel lipazlar hücre dışı, hücre içi veya zara bağlı olabilirler. Lipazların çoğu glikoprotein yapısındadır ancak bazı hücre dışı bakteri lipazları, lipoprotein yapısındadır. Bakteriyel lipazların bol miktarda bulunmasının yanı sıra spesifik olmayan substrat ve termotabil özellikleriyle ön plandadır. 51,77 Bakteri kaynaklı lipazlara ait örnekler Tablo 3’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Yakın zamanda bildirilen çalışmalardan, termofilik gibi bakteriyel lipazların çoğunun bakterisi, *B. licheniformis* lipazlar, 167 *B. pumilus* lipaz (Sarmah vd.,2017).

1.2.4. Lipazların Ara yüzey Aktivasyonu

Holverda 1936 da ara yüzey aktivasyonunu incelemiştir. Su içeren ortamda yağ asitlerinin monomerlerin en yüksek konsantrasyona çıkmasına doygunluk denilmektedir. Doygunluk noktası triaçilgliserollerin emülsiyon formunun başladığı noktadır. Lipoliz, su ve yağ ara yüzünün oluşumu ile oluşur. Esteraz enzimi, lipaz enzimi gibi ester bağlarını yıkmasına rağmen, substratlara doygunluk noktasına ulaşmadan etki etmeye başlar, ancak lipaz enzimi etki etmesi için doygunluk noktası gereklidir (Mercan, 2018; Reis vd., 2009).

1.2.5. Lipaz Aktivitesinin Belirlenme Yöntemleri

Lipazların aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin çoğu azalan substratın veya oluşan ürünün ölçülmesi yöntemine dayanmaktadır. Enzim aktivitesinin belirlenmesi aslında enzimatik reaksiyonun hızının belirlenmesidir. Bu nedenle aktivite için kullanılan yöntemler, enzim hızı içinde kullanılabilirler. Aktivite belirlenmesi azalan substrat miktarı veya oluşan ürüne bakarak belirlenebilmektedir. Lipazlar trigliseritleri hidrolize ederler ve serbest yağ asitlerinin oluşmasını sağlarlar. Bu enzimler için analiz yöntemleri genellikle serbest yağ asitlerinin oluşumunun analiz edilmesi üzerine şekillenmiştir (Beisson vd.,2000). bu yöntemlerden titrimetrik yöntem; substratları suda iyi çözünmeyen hidrolazların aktivitelerinin belirlenmesi için uygulanan bir titrasyon yöntemidir (Beisson vd., 2000, (Jaeger vd., 2002; Lesuisse vd., 1993; Saxena vd., 2003). Kolorimetrik yöntem ise serbest yağ asitlerinin organik bir çözücüde bir metalle kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır. Organiz fazdaki metal spektrofotometrik olarak ölçülür (Thomson vd.,1999). Bir diğer spektrofotometrik yöntem ise sentetik substratın lipazla hidrolizi sonucu oluşan sonuca p-nitrofenol'un spektrofotometre ile ölçümü ile olur (Sigurgísladóttir vd.,1993; Pereira-Meirelles vd.,1997). Florimetrik yöntem; Umbelliferone ile esterleşmiş yağ asitlerinin spektroflurimetrik olarak görüntülediği yöntemdir (Thomson vd., 1999). Spektrofotometrik yöntemlerdenTurbidimetrik yöntem ise azalan substrat miktarının ölçülmesi esasına dayanır (Thomson vd., 1999). Lipaz aktivitesinin belirlenmesinde kromatografik yöntemler, ara yüzey geriliminin ölçülmesi, test kitleri, immuno uygulamalar, iletkenlik yöntemi gibi başka yöntemler kullanılabilir.

1.2.6. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

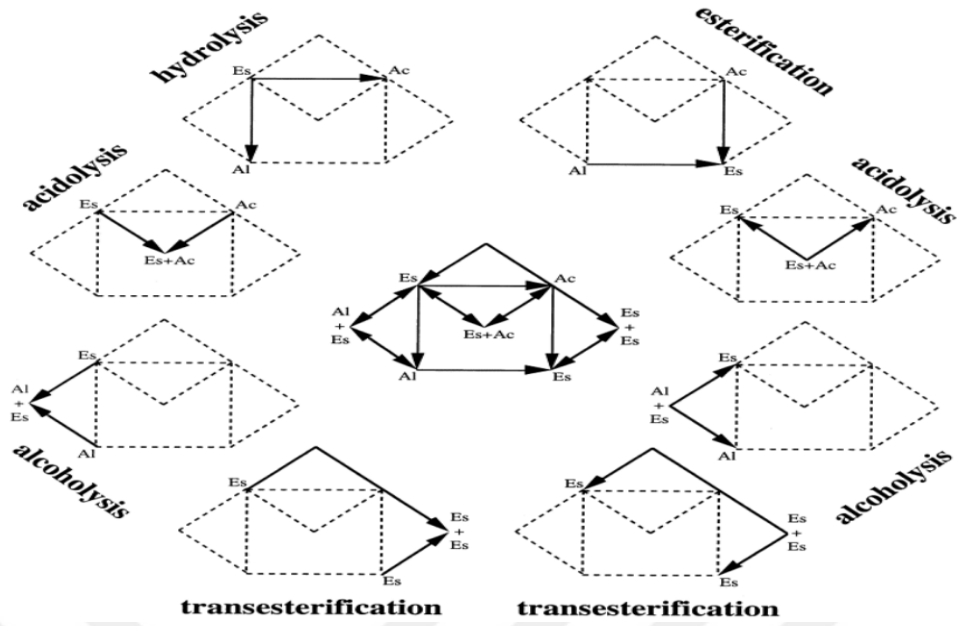
Lipazlar triaçilgliserollerin hidrolizinden sorumlu enzimlerdir. Bunun yanında lipazların sentez reaksiyonlarını geri dönüşümlü olarak katalizleyebilme özellikleri vardır. Lipazların katalizledikleri reaksiyonlar (Şekil 4) iki temel kategoride sınıflandırılabilir. Lipazlar, esterlerin özellikle triaçilgliserollerin serbest yağ asitleri ve diaçilgliserol, monoaçilgliserol ve gliserole dönüştürmek suretiyle hidrolizini katalizlemektir. Lipazlar, susuz organik çözücülerde, bifazik sistemlerde ve kiral spesifiteli misel oluşturan çözeltilerde esterifikasyon, transesterifikasyon (asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz), aminoliz, oksimoliz ve tiyotransesterifikasyon gibi tersinir reaksiyonları da katalizleme yeteneğine sahiptir. Hidroliz ve sentez reaksiyonları arasındaki denge, reaksiyon karışımının su aktivitesi ile kontrol edilir. Bakteriyel lipazların katalizlediği reaksiyonlara örnekler Tablo 1’de verilmiştir.

1.2.6.1. Hidroliz

Lipoliz, yağ veya esterin, lipaz varlığında karşılık gelen yağ asitlerine ve gliserol veya alkole parçalanmasını içeren bir hidroliz reaksiyonudur. Lipazlar için hidroliz, yağ ya da esterin su varlığında asit ve gliserol veya alkole ayrılmasını ifade etmektedir. Bağların kimyasal yöntemlerle parçalanması yüksek sıcaklık ve basınç gerektirir. Enzimatik yöntem ile kimyasal yöntem karşılaştırıldığında enzimatik yöntemin maliyetin düşük olduğu ve oluşan ürünlerin daha iyi koku ve renge sahip olduğu görülür. Enzimatik metotlarda reaksiyon koşulları daha kolay, çalışma riski daha azdır, enerji tüketimi daha düşüktür, ayrıca istenmeyen yan reaksiyonlar ve ürünler oluşmaz (Malcata vd., 1992; Paiva vd., 2000).

1.2.6.2. Sentez

Esterleştirme, alkoller ve karboksilik asitler arasındaki çift yer değiştirme reaksiyonudur. Esterlerin geniş bir kullanım alanına sahip olması nedeniyle esterifikasyona büyük önem verilmektedir. Lipaz katalizli esterifikasyon, organik ester üretimi alanında, tek yan ürün olarak ortaya çıkan su açısından cazip olması ve geleneksel kimyasal sentez işlemlerinin aksine herhangi bir tehlikeli çözücü kullanılmaması nedeniyle büyük önem kazanmaktadır. Ek olarak, esterleştirme işlemi sırasında suyun yerinde çıkarılmasıyla tam dönüşümler sağlanabilir (Sarmah vd.,2018).



Şekil 4. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

Tablo 1. Bakteriyel lipazların katalizlediği reaksiyonlar (Sarmah vd.,2017)

| Reaksiyon tipi | Bakteriyel kaynak | Endüstriyel Uygulamalar | Substrat |
|----------------|--------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------|
| Hidroliz | <i>B. pumilus</i> | Biyooorganik sentez, gıda ve deterjan endüstrileri | Uzun triaçilgliseroller |
| | <i>B. licheniformis</i> | Yağ ve yağ endüstrisi | Trimyristin |
| | <i>B. thermolevorans</i> | Yağ ve yağ endüstrisi | Yağlar ve trigliseritler |
| | <i>Propionibacterium acnes</i> | Gıda endüstrisi | Triolein |
| | <i>P. aeruginosa</i> | Katı atık arıtma | Forbol 12-miristat 13-asetat |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | Tıp ve Sağlık hizmetleri | Trilinolein |
| | <i>S. haemolyticus</i> | Gıda endüstrisi | p-nitrofenil kaprilat |
| | <i>S. epidermis</i> | Gıda endüstrisi | Mısır yağı |
| | <i>S. hyicus</i> | Gıda endüstrisi | Tribütirin |
| | <i>S. pasturi</i> | Atık arıtma | Balık yağı |
| | | Atık arıtma | Atık Soya fasulyesi yağı |
| | <i>S. hyicus</i> | Gıda endüstrisi | Nötr lipidler |
| | <i>S. pasturi</i> | Atık arıtma | Hindistan cevizi yağı |
| | <i>Serratia marcescens</i> | Yağ ve yağ endüstrisi | Gingily yağı |
| | <i>Thermobifida fusca</i> | Deterjan üretimi | Yağ lekeleri |

Tablo 1. Bakteriye lipazların katalizlediği reaksiyonlar (Sarmah vd., 2017) (devamı)

| Reaksiyon tipi | Bakteriyel kaynak | Endüstriyel Uygulamalar | Substrat |
|---------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Esterifikasyon | <i>Acinetobacter radioresistens</i> | Kimyasal endüstri | 4-nitrofenil kaprilat |
| | <i>B.coagulans</i> | Gıda işleme endüstrisi | Oleik asit ve etanol |
| | <i>B. lichensformis</i> | Tıp ve sağlık hizmetleri | Coumaric asit |
| | <i>Staphylococcus epidermis</i> | Lezzet endüstrisi | Yağ asitleri ve alkoller |
| Transesterifikasyon | <i>B. Subtilis</i> | Biyodizel | Atık yemeklik yağ |
| | <i>Burkholderia cepacia</i> | Biyodizel, jet yakıtı Hafif hidrokarbon yağı | Jatrofa yağı |
| | <i>Chromobacterium viscosum</i> | Biyodizel, jet yakıtı Hafif hidrokarbon yağı | Jatrofa yağı |
| | <i>Enterobacter aerogenes</i> | Biyodizel, jet yakıtı Hafif hidrokarbon yağı | Jatrofa yağı |
| | <i>Geobacillus</i> | Biyodizel üretimi | Sebze yağı |
| | <i>Pseudomonas</i> sps. <i>P. cepacia</i> | Biyodizel Akaryakıt, tıbbi tedaviler, Laboratuvar kimyasalları, Endüstri kimyasalları, | Soya fasulyesi yağı 2-hidroksimetil 1,4-benzodioksan |
| | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Biyodizel üretimi | Zeytinyağı ve metanol |
| | <i>B. stearothermophilus</i> | Farklı yağ asitlerinin dahil edilmesi | Tripalmitin |
| Alkoliz | <i>P. fluorescens</i> | Gıda endüstrisi, Kozmetik | Siyah Frenk üzümü yağı |
| | <i>Pseudomonas</i> sps. | Biyodizel üretimi | Trigliseritler |
| Enantioselektif hidroliz | <i>Serratia marcescens</i> | Tıp ve sağlık hizmetleri | (6)-trans-3- (4-mrtoksifinil) glisidik asit metilester |

1.2.7. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

Enzimler birçok endüstriyel alanlarda kullanılmaktadırlar. Endüstriyel uygulamalar sürekli bir değişime gelişim içinde olduğu için, yeni özelliklere sahip enzimler her zaman talep görmektedir. Bu talebin karşılanması için enzim üretimi günümüzde bir endüstri alanına dönüşmüştür (Konarzycka-Bessler vd., 2006). Birçok enzim gibi lipazlar da endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Mikrobiyal lipazlar, toplam satış ve üretimlerine göre proteazlar ve karbohidrazlardan sonra üçüncüdür. Ticari enzimlerin proteazlar %59'unu, karbohidrazlar %28'ini, lipazlar %3'ünü oluşturur. Lipazların enzimatik özellikleri, substrat spesifiteleri bakımından çeşitlilik gösterir. Bu durum endüstriyel alan uygulamalarında önemli olmalarını sağlar. Lipazlar ayrıca fırıncılık ve süt ürünleri endüstrilerinde aromayı arttırmak için kullanılır. Ayrıca emülsiyonda da yardımcı olurlar. Lipazlar ayrıca çeşitli fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde kullanılır. Lipazların reaksiyon çeşitliliğinden önümüzdeki yıllarda giderek artan şekilde daha çok yararlanılması, özellikle deterjan, gıda ve kozmetikte daha fazla kullanılması beklenmektedir. Mikrobiyal lipazlardan mantar kaynaklı lipazların (Tablo 2.) ve bakteriyel lipazların (Tablo 3.) endüstriyel uygulamalarına ait örnekler verilmiştir (Fadıloğlu vd., 2004; Hasan vd., 2006; Kıran vd., 2006; Chandra vd.,2020; Sindhu vd.,2021)

Mikrobiyal lipaz pazarının kullanımının 2018 yılından itibaren %6,8'lik bir YBBO'da büyüyerek 2023 yılına kadar 590,2 Milyon ABD Dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, Hindistan, Çin ve Brezilya gibi gelişmekte olan pazarlarda yükselen beklentilerin, tahmin dönemi boyunca lipazların pazar kapsamını genişletmesi bekleniyor (<http://www.marketsandmarkets.com>, 2020).

Mikrobiyal lipazlar, mevcut katalitik aktivitelerin çeşitliliği, yüksek verim üretimi ve genetik manipülasyonun basitliği, mevsimsel dalgalanmaların olmaması, düzenli tedarik, daha stabil daha güvenli ve daha uygun ve büyüme oranı nedeniyle bitkilerden veya hayvanlardan elde edilmek için daha değerlidir (Chandra vd.,2020).

1.2.7.1. Süt endüstrisinde lipaz

Süt yağının hidrolizi için, yağ asidinin zincir uzunlukları değiştirmek için ve peynirlerin lezzetini artırmak için lipazlar, süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Şu anda peynirin olgunlaşmasının hızlandırılmasında ve tereyağı ve kremanın lipolizinde

kullanılmaktadır. Lipazların süt yağı üzerindeki etkisiyle özellikle de serbest yağ asitleri ile, aroma ve lezzete sahip yumuşak peynirler üretilen çeşitli ürünlerdendir. edar, provolon ve ras peynirleri gibi çeşitli peynir türlerinde olgunlaşmayı ve lezzetin gelişmesini hızlandırmak için mide lipazları uygulanır. Aroma gelişimini de hızlandıran lipaz ilavesinden sonra yağ asidi salınım hızı artar. Yağ asitlerinin serbestleşmesi, buzağı lipazının eklenmesi ile önemli lde artmıştır ve olgunlaşma sıcaklığını (7 ° C'den 53 ° C'ye) yükseltmektedir. Lipazlar mikrobiyal ve hayvansal kaynaklı birçok enzim şirketinde kullanılmaktadır. Hayvanlardan elde edilen lipazlar kuzu ve buzağılardan işlenir, ancak mikrobiyal lipaz üretimi esas olarak bakteriler ve fungal sp. *Rhizomucor meihei*. Hem hayvansal hem de mikrobiyal lipazlar çeşitli etki mekanizmalarına sahiptir ve gıda şirketleri her ikisini de gerekli peynir aromasına göre kullanır. Lipazlar, proteazlar ve laktaz enzimleri, aroma parçalarının ve / veya aroma ana çerçevelerinin seviyesini yükseltmek için sırasıyla lipidleri, proteinleri ve laktozu hidrolize eder. Benzer şekilde okolata ve kakao sanayisinde de yaygın kullanımları bulunmaktadır. Ayrıca krema, şekerleme gibi benzer içerikli ürünlerde de lipazlar kullanılmaktadır. (Chandra vd.,2020; Sindhu vd.,2021)

Süt endüstrisinde, sütteki yağları hidrolize etmek ve peynirlere hoş tatlar vermek için lipazlar uygulanır. Karakteristik lezzet, süt hidrolizi sırasında salınan serbest yağdan üretilen yağ asitlerinin bir sonucudur (Jooyandeh vd.2009)

1.2.7.2. Yağ endüstrisinde lipazlar

Yağ sanayisinde lipazların kullanımı, yağ üretimi ve işlenmesindeki enerjinin tüketimini azaltır. Yağ asidi zincirlerinin lipazlarının yerini değiştirmek, gliseridlerdeki lipidlerin varlıklarını değiştirmemize ve bunlardan birini veya diğerini yenisiyle değiştirmemize izin verir. Yağ endüstrisinde kullanılan lipazlar alkolizis, asidolizis, hidroliz ve esterifikasyon işlemleri süresince sıcaklığın korunması için kullanılır. Yağ ve yağ ürünlerinin sıcaklıktaki yapı bozulmalarını azaltır. Son derece selektif mikrobiyal fosfolipazlar, bitkisel yağlardaki fosfolipitlerin giderilmesi için yakın zamanda sanayileşmiş evre dostu bir prosedürdür (Sharma vd., 2001, Chandra vd.,2020).

1.2.7.3. ay endüstrisinde kullanılan lipazlar

ay, dünyadaki en popüler içecektir ve *Camellia sinensis L.*'den üretilmiştir. Ancak

her biri için üretim süreci farklıdır, örneğin fermente edilmemiş yeşil çay, yarı fermente edilmiş çay, iyi fermente edilmiş çay siyah çay olarak bilinir. Ticari olarak temin edilebilen çay, bitkinin tomurcuğundan ve *Camellia sinensis'in* apikal iki yaprağından hazırlanır. (L). Çayı tamamlamak, taze çay yaprağının yenilenmesinde yeşil yaprakta endojen olarak bulunan oksidatif ve hidrolitik enzimlerin etkisine bağlıdır. Membran lipidlerinin enzimatik parçalanması, belirli aroma özelliklerine sahip siyah çayın üretimi sırasında uçucu ürünlerin gelişimini başlatır, lezzet geliştirmede lipidin önemini vurgular. Siyah çayın kalitesi, çay yapraklarının maruz kaldığı kuruluğa, mekanik kırılmaya ve enzimatik fermantasyona bağlıdır (Chandra vd.,2020).

1.2.7.4. Et ve balık endüstrisinde lipazlar

Yağsız et üretmek için et üretimi ve balık endüstrisindeki fazla yağı gidermek için lipaz da kullanılır. Aynı zamanda et ürünlerinin fermantasyonu için lezzetini arttırmak ve fermente edilmiş sosislerin üstünlüğünü genişletmek için kullanılır. Balık yağının hidrolizi ve doymamış yağ asidi (n-3 PUFA) için mikrobiyal lipazlar da kullanılır (Chandra vd.,2020).

1.2.7.5. Besinler

Lipazlar, lipoliz fonksiyonları bayatlamayı geciktirmek için kullanılır. Bunun için ekmek hamuruna lipazların eklenir ve trigliseritlerin kısmi hidrolizi sonucu monogliserit içeriği artar. Lipazlar köpek mamalarının da lezzetinin artırılmasında kullanılmaktadırlar. Lipazlar, süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Süt yağının hidrolizi için süt endüstrisi kullanır. Yağ asidi zincir uzunluklarını değiştirmek için lipazlar, çeşitli peynirlerin lezzetlerini artırır. Güncel uygulamalar ayrıca peynirin hızlandırılmasını da içerir olgunlaşma ve tereyağı, yağ ve kremanın lioplizi (Aravindan vd., 2007; Chandra vd.,2020 , Sindhu vd.,2021).

1.2.7.6. Kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılan lipazlar

Saç bakımı, cilt bakımı, parfüm, kişisel hijyen ve ağız ürünleri ile ilgili olarak kozmetik pazarının küresel payı 2024 yılına kadar 680 milyar doları aşabilir. Çünkü gelişmiş

kozmetik ürünler endüstrinin büyümesini sağlayabilir. Güneş-bronzluk kremleri, banyo yağları gibi bakım ürünleri başta olmak üzere palyatif olarak uygulama için izopropil miristat, izopropil palmitat ve 2-etilheksilpalmitat üretimi Parfüm endüstrisindeki önemli bir koku bileşeni, 3, 7-dimetil-4, 7-oktadien-1-ol'un lipazları ve Transesterifikasyonu ile çeşitli mikrobiyal kaynaklardan formüle edilen gül oksittir (Chandra vd.,2020).

1.2.7.7. Deterjan endüstrisinde lipazlar

Deterjanların kimyasal bileşenleri ekolojik kirlenmeye neden olduğu, fauna ve flora için tehlikeli olduğu için lipazlar bu güvenli olmayan bileşenlerin yerine kullanılabilirler. Deterjanlarda kullanılan enzimler kirleri daha basit formlara dönüştürür ve temizlenmesi kolaylaşır Dolayısıyla, şu anda enzimatik bazlı deterjan üreten endüstrilerin çoğu. *Pseudomonas* ADT3'ün ürettiği lipaz, deterjanda değerli bulunmuştur. Yılda yaklaşık 1000 ton lipaz, 13 milyon ton deterjan üretiminde katkı maddesi olarak lipazlar kullanılmaktadır. Mısır yağı lekelerinin boyanmamış pamuklu kumaştan çıkarılması, lipazın deterjanla karıştırılması ve *Bacillus sonorensis'ten* ekstrakte edilmesi ile gerçekleşir. Çamaşırları çamaşırlarda yıkamak için düşük sıcaklıkta soğuk aktif lipazlar, deterjan preparatlarında ve kiral araçların organik karışımlarında katkı maddesi olarak faydalıdır. *Pseudomonas aeruginosa* suşu BUP2, deterjan endüstrisinde yüksek spesifik aktivite ile verimli bir şekilde kullanılan alkali ve ısıya dayanıklı bir lipaz ürettiği saptanmıştır. Deterjanlarda yaygın olarak kullanılan lipaz üreten mikroorganizmalar *Bacillus flexus* XJU -1, *Bacillus licheniformis* *Bacillus licheniformis* VSG1, *Bacillus pumilus* SG2, *Bacillus subtilis* JPBW-9, *Geobacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* sanai ve *Serratia marcescens* DEPTK2. *P. mendocina* (Lumafast) ve *Pseudomonas glumae* bakterileri, ticari deterjan formülasyonları için yüksek sıcaklık optimasına sahip lipazlar ürettiği saptanmıştır. Genencor International, AU-KBC Araştırma Merkezi (Hindistan) tarafından *P. mendocina* ve *Pseudomonas alcaligenes*'den Lumafast ve Lipomax olarak bilinen lipazlar üretmişler (<http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.htm>). *P. alcaligenes* M-1 bakterisinden çamaşır makinesinde kullanılan yağlı lekeleri çıkarma kabiliyetin sahip alkalın lipaz üretmişler. *Pseudomonas plantarii'den* ekstrakte edilen lipaz Solvay Enzyme Products, Inc. 1992-01-29 / 1990-07-25, bir Avrupa Patent Ofisi'nde (EPO) patentli noniyonik ve/veya anyonik bir deterjan formülasyonunda kullanılmıştır. Novo Nordisk tarafından 1994 yılında piyasaya sürülen lipolaz, *Trichoderma lanuginosus'tan* ekstrakte edilen ve *A. oryzae'de* eksprese edilen ilk ticari lipazdır. Lipo Prime

® yine kendi ürettikleri lipaz içeren bir deterjandır. *Trichosporon asahii* MSR 54, tarafından üretilen alkalın lipazı kullanarak ortam sıcaklığında yağ lekelerinin çıkarılması için uygulanabilen bir ön ıslatma formülasyonu geliştirmişlerdir (Brant vd., 2004; Hasan vd., 2006; Kıran vd., 2006; Chandra vd.,2020)

1.2.7.8. Atık su veya atık su arıtımında lipaz

Atık su arıtımında hem aerobik hem de anaerobik lipazlar kullanılmaktadır. Aktif çamur prosesi olarak bilinen en önemli aerobik arıtma cihazlarından biri, oksijen taşınmasına izin vermek için havalandırılma tanklarının yüzeyinden ince yağ tabakalarını sürekli olarak uzaklaştırır, biyokütlenin korunmasını içerir. *C. rugosa*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* vs.'den kullanılan lipazlar, yağsız yağdan zengin safsızlıkları kolaylıkla sindirilebilir. Lipazlar, gıda atıkları, süt ürünleri atıkları ve yünden gelen yağlar, gübre ve anaerobik işlemler kullanan yağ fabrikalarından gelen atık su gibi endüstriyel atık su arıtımında yaygın olarak faydalıdır. Atık su arıtma tesislerinde, yağların enzimatik yaklaşımlar kullanılarak işlenmesi, esas olarak trigliseritler, % 90'a kadar pislik hidrolize edilebilir ve immobilize edici lipaz sentezleyen bakteriler kullanılarak daha da iyileştirilebilir (Chandra vd.,2020).

1.2.7.9. Biyodizel üretimi

Biyodizel yakıt bitkisel yağların esterifikasyonu ile elde edilir. Metanol ve etanol ile yağların lipaz katalizli alkolizisi sonucu metil ve etil esterler oluşur ve bunlar dizel yakıtların yerini alan önemli bileşenlerdir. Bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır (Noureddini vd.,2005; Ray, 2012).

1.2.7.10. Medikal uygulamalar

Kiral bileşik eldesinde, kimyasal yollarla elde edilemeyen ilaçların sentezinde lipaz enzimleri kullanılırdan yararlanılır (Kierkels vd.,1990).

1.2.7.11. Kâğıt atıklarının boya giderimi

Ağaçtan elde edilen kereste ve odunlardan kâğıt hamuru ve kâğıt üretiminde, ziftin hamurdan uzaklaştırılması amacı ile lipaz enzimi kullanılmaktadır. Japonya’da kâğıt üretiminde odunlardaki triaçilgliserollerin hidrolize edilmesi amacı ile ilk defa lipaz kullanılmış günümüzde kullanımı devam etmektedir. Lipazlar kâğıt endüstrisinde kâğıt ürünlerinde beyazlaşmayı artırır, ayrıca kimyasal madde kullanım oranını ve üretimdeki işlem süresini azaltmaktadır (Hasan vd., 2006; Jaeger vd., 2020).

Tablo 2. Günümüzde Mantar Kaynaklı Mikrobiyal Lipazlar ve Endüstriyel Uygulamaları (Jaeger vd., 2020).

| Mikrobiyal kaynaklar | Kullanım alanları |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Fusarium solani</i> NFCCL 4084 | Biyodizel üretimi için halofilik lipaz |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | Doymuş yağ asitleri sentezlenir, daha hızlı peynir olgunlaşması sağlanır, tada özel peynir oluşur |
| <i>Rhizomucor javanicus (meih)</i> | Hidrojene olmayan katı yağlar |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | Kakao yağı eşdeğerleri |
| <i>Geotrichum candidum</i> ve <i>C. antarctica</i> | Alzheimer hastalığının tedavisi için kötü kolesterolün ortadan kaldırılmasıyla ilgili farmasötik bileşikler sentezleyen kiral ara maddelerin biyokatalitik süreçlerle hazırlanması |
| <i>Candida rugosa</i> | İnsan Süt yağının eşdeğeri |
| <i>Candida lipolytica</i> | Peynir olgunlaşması, Yağ asidi üretimi |
| <i>Penicillium camembertii</i> | Gliserolglisidlipid üretimi |
| | Doymuş triasil gliseridlerin sentezi |
| <i>Trichoderma lanuginosus</i> | Deterjan 'LipoPrime ' içeren bir lipaz üretti |
| <i>Penicillium roquefortii</i> | Süt ürünlerinde peynirin karakteristik lezzetinin üretimi |
| <i>Aspergillus niger</i> | Daha hızlı peynir olgunlaşması, tada özel peynir, hamur stabilitesi ve kıvamlandırma |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | Peynir altı suyu kullanarak yem lipazı |
| <i>A. niger</i> GZUF36 | Fonksiyonel yağların sentezinde enzimin potansiyeli |
| <i>Aspergillus flavus</i> | Yağ lekeli giderme; İlaçların, polimerlerin, biyodizellerin, biyo yüzey aktif maddelerin sentezi |
| <i>Candida antarktika</i> | Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde adım kontrolü, Polikondensasyon, laktonların halka açma polimerizasyonu, polimerde karbonatlar |

Tablo 2. Günümüzde Mantar Kaynaklı Mikrobiyal Lipazlar ve Endüstriyel Uygulamaları (Jaeger vd., 2020) devamı

| | |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Rhizomucor meihei</i> | Cilt ve güneş kremleri, banyo yağları vb. Kişisel bakım ürünlerinde biyokatalizör olarak |
| <i>Rhizomucor meihei</i> | Fırıncılık endüstrisi için yüzey aktif maddeler, süt ürünleri, Erişte Zenginleştirilmiş yağlar ve katı yağlar, kakao yağı ikameleri, biyoaktif moleküllerin sentezi |
| <i>Candida tropicalis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> | Ham petrol hidrokarbonlarının bozunması |
| <i>Penicillium abeanum</i> | Ton balığı yağının dokosaheksaenoik asitle zenginleştirilmesi için kullanılır |
| <i>Rhizopus nodosus</i> | Deri işleme ve tüy alma ve yağ giderme |
| <i>Candida rugosa</i> | Aktif çamur arıtma, aerobik atık arıtma |
| <i>P. chrysogenum</i> | Gıda endüstrisi atık arıtma |
| <i>Rhizomucor meihei</i> | Fırıncılık endüstrisi için yüzey aktif maddeler, Süt ürünleri, Erişte |
| <i>P. chrysogenum</i> | Gıda endüstrisi atık arıtma |
| <i>Thermomyces lanuginose</i> | Hidrojene olmayan katı yağlar |
| <i>M. miehei</i> | Yiyecek, içecek ve ilaç endüstrisinde aroma ve koku olarak kullanılır |
| <i>C. parapsilosis</i> | Hidroksamik asitler (gıda katkı maddesi) |
| <i>M. miehei</i> , <i>C. antarctica</i> | Solventsiz ortamda kısa zincirli lezzet tio ester sentezi |
| <i>M. miehei</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> | Lezzet esteri üretimi |

Tablo 3. Bakteri kaynaklı mikrobiyal lipazlar ve endüstriyel uygulamaları (Jaeger vd., 2020).

| Mikrobiyal kaynaklar | Kullanım alanları |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Achromobacter</i> sp. HEGN 014, <i>Virgibacillus pantothenicus</i> HEGN 114 | Yağlı atık su arıtımı |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> | Bulaşık yıkama / çamaşır yıkama |
| <i>Acinetobacter radioresistens</i> ; <i>Bacillus</i> sp. FH5 | Deterjan endüstrisinde kullanılır |
| <i>Staphylococcus pasturi</i> | Yağ bozunmasında kullanmak |
| <i>P. fluorescens</i> | S-2852 böcek ilacının bir bileşeni olan rasemat (<i>R</i> , <i>S</i>)-4-metil-1-heptin-4-en-3- ol'un enantiyoselektif tansesterifikasyonu |
| <i>Staphylococcus warneri</i> ve <i>S. xylosus</i> | Lezzet esterlerinin üretimi |

Tablo 3. Bakteri kaynaklı mikrobiyal lipazlar ve endüstriyel uygulamaları (Jaeger vd., 2020).

(Devamı)

| Mikrobiyal kaynaklar | Kullanım alanları |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. | Deri işlemede kullanılır |
| <i>Brevundimonas</i> sp. QPT-2 | AOPP herbisitlerinin enantiyoselektif bozunmasında rol oynar |
| <i>Micrococcus</i> sp. | Yaygın olarak kullanılan deterjanlar, çeşitli kumaş türlerinden yağlı lekelerin çıkarılmasını sağlar. |
| <i>Bacillus cereus</i> HSS | Atık su arıtma |
| <i>Marinobacter lipolyticus</i> | Organik Çözücüye Toleranslı Lipolitik enzim |
| <i>Haloarcula</i> sp. G41 | Biyodizel üretimi için organik çözücüye toleranslı lipaz |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Ekmeke yapımı için fırıncılık endüstrisi |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | Metanolde geliştirilmiş stabilite |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HFE733 | Petrol ve organiklerin biyolojik olarak parçalanması (kimyasal oksijen talebi (COD) olarak belirlenmesi, restoranlardan gelen gıda atık sularının biyolojik olarak parçalanması |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | Gıda işleme ve yağ üretimi |
| <i>Natronococcus</i> sp. | Biyokatalizde uygulama |
| <i>P. alcaligenes</i> M-1 | Çamaşır makinesinde kullanıldığında yağlı lekeleri çıkarabilen alkali lipazlar |
| <i>Pseudomonas plantarii</i> | Solvay Enzim Ürünleri, Noniyonik ve / veya anyonik bir deterjan formülasyonu için geçerlidir. |
| <i>Chromobacterium viscosum</i> | Çamaşır deterjanı “Top” da kullanılan alkali lipaz içeren deterjan formülasyonları |
| <i>Acinetobacter</i> sp. | Atık su yönetiminde yağlı materyalin% 60-65'ini bozmak |
| <i>Bacillus thermocatenulatus</i> | Tıp endüstrisinde kullanılır |
| <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ve <i>Lactobacillus plantarum</i> . | Lezzeti iyileştirmek için peynir endüstrisi |
| <i>Penicillium roquefortii</i> | Peynir olgunlaşması için Peynir Endüstrisi |
| <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>S. xylosus</i> | Lezzet esteri üretimi |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> | Biyodizel yakıt üretimi |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | İlaç endüstrisinde antitümör antibiyotik ve immünsüpresif ajan olarak (-) - 15-deoxyspergualin 23) oluşumu |

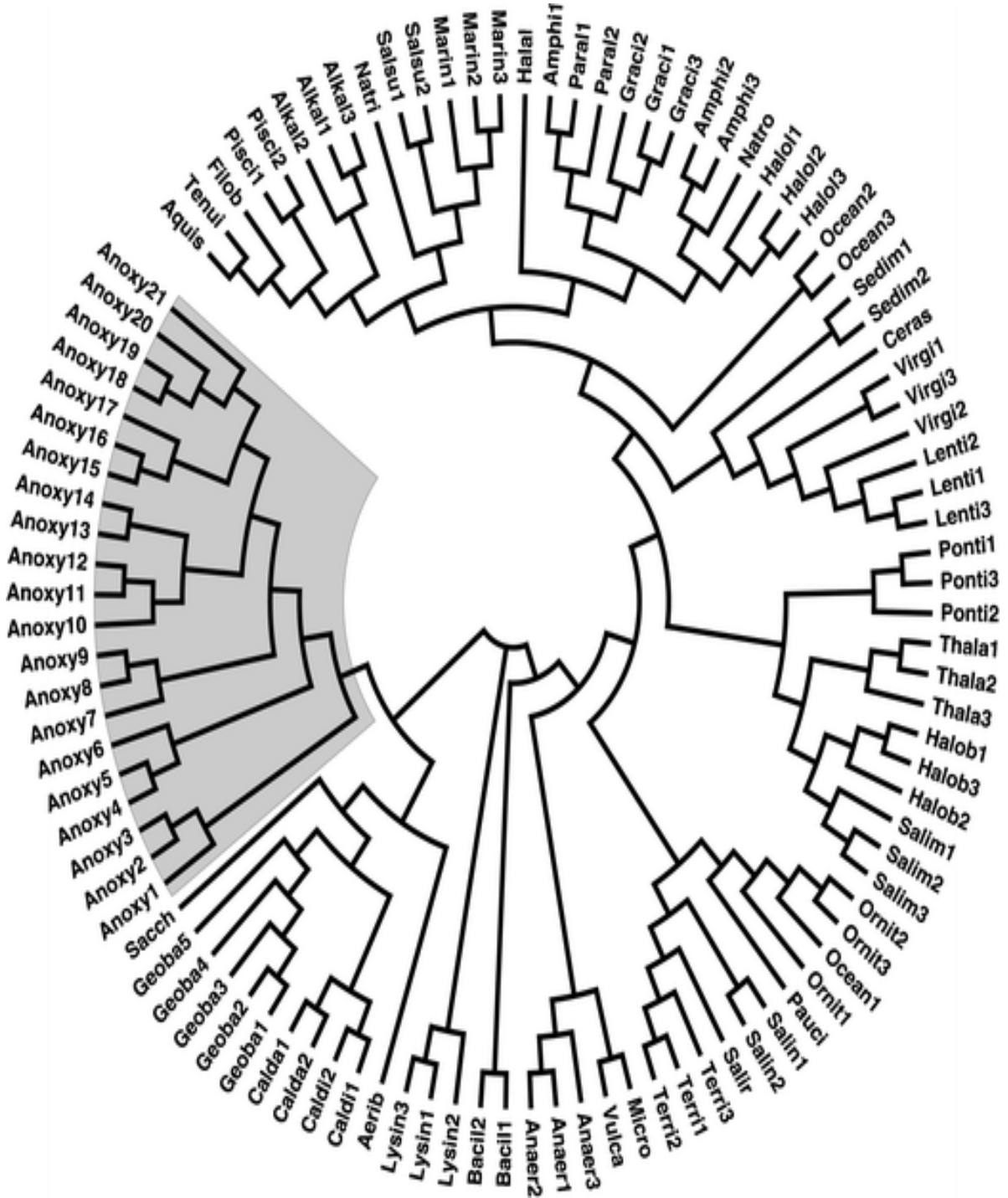
1.3. *Anoxybacillus* Suşları

Bacillaceae ailesindeki tüm türler Gram pozitifdir, çubuk veya kok şeklindedir. 20.000'den fazla suş *Bacillaceae* olarak sınıflandırılmıştır. Türe ait genomik bilgi bazı alt türlere yoğunlaşmıştır Ulusal Biyoinformatik Bilgi Merkezi (NCBI) veri tabanındaki bilgileri içinde *Bacillus* ve *Geobacillus* türleri için genom dizileme projeleri, *Bacillaceae* ailesi için toplam dizilenmiş genomların %99'undan fazlasını temsil eder (Şekil 5, Tablo 4) (Goh vd., 2013).

Bacillaceae familyası üyeleri, tüm hücreleri veya enzimleri içeren biyoişlem ve biyotransformasyon için iyi bir bakteri kaynağıdır. *Bacillus* ve *Geobacillus*'un aksine, *Anoxybacillus*, 2000 yılında önerilen nispeten yeni bir cinstir. Bu bakteriler alkali toleranslı termofiller olduğundan, birçok endüstriyel uygulama için uygundur. *Anoxybacillus*'un ilk raporundan on yıldan fazla bir süre sonra, temel ve uygulamalı çalışmalardan elde edilen bilgiler, bu cinsin nişasta ve lignoselülozik biyokütleler, çevresel atık arıtma, enzim teknolojisi ve muhtemelen biyoenerji üretimi ile ilgili birçok uygulamada iyi bir alternatif olarak hizmet edebileceğini göstermektedir.

Anoxybacillus flavothermus 2000 yılından önce *Bacillus flavothermus* olarak adlandırılmaktaydı. Yeni Zelanda kaplıcalarında keşfedilen ve 30–70 °C aralığında yaşayan sarı pigmentli bir fakültatif anaerobik olarak karakterize edilmiştir. Daha sonra, *B. flavothermus* suşları ile yakın sekans özdeşliğine sahip çeşitli suşlar Yellowstone Milli Parkı'nda ve Avustralya Büyük Artezyen Havzasında bulundu. 2000 yılından önce *B. flavothermus* üzerine çalışmalar sınırlıdır. Pikuta ve arkadaşları 2000 yılında yeni anaerobik soy K1 T'yi hayvan gübresinden izole etti ve *Anoxybacillus* yeni bir tür olarak önerdi. K1 T suşuna *Anoxybacillus pushchinensis* adı verildi. Daha önce *B. flavothermus* olarak adlandırılan suş *Anoxybacillus flavothermus* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Cihan vd.,2014; Deep vd., 2013; Pikuta vd., 2000; X. Q. Zhang vd., 2013). 2003 yılında, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC) kimlik doğrulaması analizi sırasında, *A. pushchinensis* anaerob yerine bir aerotolerans anaerob olduğu bildirilmiştir (Pikuta vd., 2003). Aerob, fakültatif anaerob veya fakültatif aeroblar olabilirler. Kesin anaerob olmamalarına rağmen cins adı *Anoxybacillus* olarak kaldı (Vos vd., 2011). Bugüne kadar dünyanın dört bir yanında, toplam 22 tür ve geçerli yayınlanmış isimlere sahip iki *Anoxybacillus* alt türü bildirilmiştir. Türlerden ikisi, yani *Anoxybacillus caldiproteolysis* ve *Anoxybacillus tepidamans*, daha önce

sırasıyla *Geobacillus caldiproteolysis* ve *Geobacillus tepidamans* olarak sınıflandırılmıştı (Coorevits vd., 2012; Goh vd., 2014). En son keşfedilen tür 2012 yılında tespit edilen *Anoxybacillus kaynarcensis*'tir (Inan vd.,2013). *Anoxybacillus* spp. arasında *A. flavithermus* WK1 (PRJNA59135) genomu tamamen dizilenmiş tek genomdur (Goh vd., 2014).



Şekil 5. *Bacillaceae* ailesi şeması (Tamura vd., 2011)

Tablo 4. *Bacillaceae* familyasına ait genus listesi (**Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**)

Family I. Bacillaceae

Genus I. Bacillus

Genus II. Alkalibacillus

Genus III. Amphibacillus

Genus IV. Anoxybacillus

Genus V. Cerasibacillus

Genus VI. Filobacillus

Genus VII. Geobacillus

Genus VIII. Gracilibacillus

Genus IX. Halobacillus

Genus X. Halolactibacillus

Genus XI. Lentibacillus

Genus XII. Marinococcus

Genus XIII. Oceanobacillus

Genus XIV. Paraliobacillus

Genus XV. Pontibacillus

Genus XVI. Saccharococcus

Genus XVII. Tenuibacillus

Genus XVIII. Thalassobacillus

Genus XIX. Virgibacillus

1.3.1. *Anoxybacillus* İçin Uygun Yaşam Ortamı

Anoxybacillus türlerinin kolayca izole edildiğini ve korunduğunu ve çoğaltılması için spesifik bir ortama ihtiyaç duymadığını düşündüren çeşitli kültür ortamları kullanılmıştır (Inan vd., 2013).

Çoğu *Anoxybacillus* türleri, 37 °C'de uygun şekilde yaşar (TSB-6 suşu hariç), 50-65 °C sıcaklık aralığında optimum yaşama sahiptir (Chowdhury Paul vd., 2012). *Anoxybacillus*, bazı kaplıcalar gibi sıcak ortamlarda baskın türdür (Narayan vd.,2008). *Anoxybacillus* hücreleri alkalifilik veya alkali toleranslıdır ve türlerin çoğu nötr pH'da yaşayabilirler. İstisna olarak, optimal yaşam için 5,60 pH'a sahip *Anoxybacillus amylolyticus*'tur (Poli vd., 2006).

1.3.2. Sentetik Ortam

Genel olarak, kültür ortamı optimizasyonu ile yüksek verimlilik elde edilmiştir. Bir yetiştirme ortamı oluşturan her bir bileşimin konsantrasyonunun optimizasyonu genellikle zaman alıcı bir prosedürdür (Rodrigues vd., 2005).

1.4. Çalışmanın amacı

İklim değişikliği ve çevre sorunları konusundaki artan endişeler nedeniyle, imalat endüstrilerinin odağı giderek daha yeşil, daha güvenli ve sürdürülebilir alternatif süreçlerin geliştirilmesine doğru kaymaktadır. Lipazın gıda, ilaç, deri, kozmetik, deterjan, tıbbi teşhis, süt ürünleri, içecek, yağ asidi ve kağıt endüstrileriyle ilgili sayısız işlemi katalize etmede başarılı oldukları görülmüştür. (Sarmah vd., 2018). Bu nedenle lipaz ürettiği daha önceden saptanmış *Anoxybacillus* sp. HBB180 tarafından üretilen lipazın, üretim koşullarının optimizasyonu yapılarak en yüksek verimde enzim üretiminin sağlanması amaçlanmıştır. Bu optimizasyonu sağlamak için karbon ve azot kaynaklarının uygunluğuna, , inkübasyon sıcaklığına, inkübasyon süresine ve pH gibi büyüme koşulları lipaz sentezini etkileyebilmektedir. Bu bilgiler ışığında *Anoxybacillus* sp.'den lipaz üretimi üzerine çeşitli kültür koşullarının etkisi araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Lipaz Üretimi

Lipazların genellikle sıvı kültür olarak üretilir, ancak bazı katı kültür fermentasyon yöntemlerinin de kullanılmaktadır. Lipid yapıdaki karbon kaynakları genellikle lipaz üretim verimini artırmaktadır. Tüm fermentasyon parametreleri lipaz aktivitesini, bakterinin üreme ve gelişimini etkilemektedir (Hasan vd., 2006; Sharma vd., 2001).

Shelley, bir bakterinin lipaz pozitif olarak belirlenebilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerektiğini söylemiştir (Hasan vd., 2006).

- Organizma üreyebilmeli;
- Organizma büyüme koşulları altında lipaz üretmeli
- Aktivite tespiti için kullanılan yöntem yeterli hassasiyette sahip olmalıdır.

Lipazların sentezi için seçilecek bakteride aranılan ilk özellik çok miktarda lipazı üretmesidir. Genel olarak bakteri türü seçimi kriterleri aşağıdaki gibidir (Jaeger vd., 2002);

- Kısa fermentasyon süresinde, çok miktarda lipaz verimi sağlamalıdır.
- Ekstraselüler enzim üretimi tercih edilir böylelikle hücre zarı parçalamadan enzim izolasyonu sağlanır.
- İntraselüler enzim olası halinde hücre kolay parçalanmalıdır.
- Bakteri türünün toksik madde ya da antibiyotik üretmemelidir.
- Enzime zarar verebilecek yan ürün oluşmamalıdır.
- Ucuz bir besi yerinde kolay ve hızlı üreyebilmelidir.
- Enzim verimliliği açısından stabil olmalıdır.
- Kültürler saflaştırma işlemleri sorunsuz ve kolay olmalıdır

2.2. Lipaz Üretimi Üzerine Ph ve Sıcaklığın Etkisi

Anoxybacillus türlerinin gelişimi üzerine pH ve sıcaklığın etkisi üzerine yapılan çalışmalar Tablo 5’ de sunulmuştur. Bu çalışmalarda pH 5,60-9,70 ve sıcaklık 50-65 ° C arasında en iyi gelişim gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 5. *Anoxybacillus* türlerinin genel özellikleri (Goh vd., 2013)

| Türler | Kaynak | Büyüme durumu | Sıcaklık aralığı (° C) | Opt. sıcaklık (° C) | pH aralığı | Opt. pH | Referans |
|--------------------------------------------------|-----------------------------|---------------|------------------------|---------------------|------------|-----------|-------------------------------------|
| <i>A. rupiensis</i> | Kaplıca | Aerob | 35–67 | 55 | 5,50–8,50 | 6,00–6,50 | Derekova vd., 2007 |
| <i>A. tepidamans</i> | Jeotermal ısıtılmalı toprak | F. an. | 39–67 | 55 | 6,00–9,00 | 7,00 | Schäffer vd., 2004 |
| <i>A. caldiproteolyticus</i> | Arıtma çamuru numuneleri | Aerob | 35–65 | 60 | 6,00–9,00 | 6,50 | Chen vd., 2004 |
| <i>A. amylolyticus</i> | Jeotermal toprak | F. an. | 45–65 | 61 | 5,00–6,50 | 5,60 | Poli vd., 2006 |
| <i>A. kontaminans</i> | Jelatin numuneleri | F. an. | 50–60 | 50 | 4,00–10,00 | 7,00 | De Clerck vd. 2004 |
| <i>A. voinovskiensis</i> | Voinovske kaplıca | Fa | 30–64 | 54 | 7,00–8,00 | ND | Yumoto vd. 2004 |
| <i>A. kaynarcensis</i> | Kaynarca kaplıcası | Aerob | 35–70 | 60 | 6,00–10,00 | 7,00 | İnan vd. 2012 |
| <i>A. flavithermus</i> | Kaplıca | Fa | 30–72 | 60–65 | 5,50–9,00 | 7,00 | Heinen vd. 1982 |
| <i>A. bogrovensis</i> | Jeotermal kaynak | F. an. | 40–69 | 65 | 6,00–10,00 | 8,00 | Atanassova vd. 2008 |
| <i>A. eryuanensis</i> | Eryuan kaplıcası | F. an. | 35–75 | 55 | 7,00–11,00 | 8,00 | Zhang vd. 2011 |
| <i>A. mongoliensis</i> | Tsenher kaplıcası | F. an. | 35–75 | 60 | 5,00–10,80 | 8,00 | Namsaraev vd. 2010 |
| <i>A. pushchinoensis</i> | Gübre örnekleri | Fa | 37–66 | 62 | 8,00–10,50 | 9,50–9,70 | Pikuta vd. 2000 |
| <i>A. flavithermus</i> subsp. <i>Yunnanensis</i> | Kaplıcalar | Fa | 30–66 | 60 | 5,50–10,00 | 7,00–7,50 | Dai vd. 2011 |

Tablo 5. *Anoxybacillus* türlerinin genel özellikleri (Goh vd., 2013) (devamı)

| <i>Türler</i> | Kaynak | Büyüme durumu | Sıcaklık aralığı (° C) | Opt. sıcaklık (° C) | pH aralığı | Opt. pH | Referans |
|----------------------------------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------|------------------------------------|
| <i>A. tengchongensis</i> | Tengchong kaplıcası | F. an. | 30–75 | 50 | 7,00-11,00 | 8,50 | Zhang vd. 2011 |
| <i>A. gonensis</i> | Gönen kaplıcaları | F. an. | 40–70 | 55–60 | 6,00-10,00 | 7,50-8,00 | Beldüz vd. 2003 |
| <i>A. kestanbolensis</i> | Kestanbol kaplıcası | F. an. | 40–70 | 50–55 | 6,00-10,50 | 7,50-8,50 | Dülger vd. 2004 |
| <i>A. ayderensis</i> | Ayder kaplıcası | F. an. | 30–70 | 50 | 6,00-11,00 | 7,50-8,50 | Dülger vd. 2004 |
| <i>A. salavatlensis</i> | İyi boru hattı tortusu | F. an. | 37–69 | 60 | 5,50-9,50 | 8,00-9,00 | Cihan vd. 2011 |
| <i>A. kamchatkensis</i> | Gayzer vadisinde kaplıca | Fa | 38–67 | 60 | 5,70-9,90 | 6,80-8,50 | Kevbrin vd. 2005 |
| <i>A.kamchatkensis</i> subsp. <i>Asaccharedens</i> | Talisdere kaplıcası | Aerob | 35–65 | 55 | 5,50-9,50 | 7,50 | Gul-Guven vd. 2008 |
| <i>A. termarum</i> | Euganean kaplıcası | Aerob | 55–67 | 65 | 6,00-7,50 | 7,20 | Poli vd. 2009 |

Fa fakültatif aerobe, F. an. fakültatif anaerob, *ND* belirlenmemiş

2.3. Karbon Kaynağının Etkisi

Lipaz üretim aşamasında karbon kaynağı ana bileşenlerdendir ayrıca lipaz üretiminin bir indükleyicisidir. Lipazların üretiminde kültür ortamında glikoz, sukroz, früktoz ve maltoz karbon kaynakları kullanılmaktadır (Fatima vd., 2014). Bu kaynakların dışında yağlar, yağ asitleri, metil esterler, safra tuzları, gliserol gibi hidrofobik substratlarda lipaz üretimini artırmaktadır (Brígida, vd.,2014; Fickers vd., 2005).

Exiguobacterium sp. lipazı için çeşitli karbon kaynakları denenmiş ve en iyi indükleyicinin zeytinyağı olduğu saptanmıştır (Ali vd., 2015).

Burkholderia cepacia lipazının çeşitli yağlar ile yaptıkları çalışmada maximum lipaz aktivitesini hurma yağı, hindistan cevizi yağı ve hardal yağı içeren besiyerinde saptanmıştır (Rathi vd., 2002).

Staphylococcus sp. LP12 suşu lipazı sentetik ve doğal lipit karbon kaynaklarının ile araştırılmış lipaz üretiminin hindistancevizi yağı, öğütülmüş fındık yağı ve zeytinyağı uzun karbon zincirli doğal yağlarda daha yüksek olduğu saptanmıştır (Pogaku vd., 2010).

Mobarok ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* lipaz üretiminin araştırılması için zeytinyağı, glikoz ve tributirin gibi karbon kaynaklarını değerlendirilmiştir. Zeytinyağının lipaz üretimini artırdığını bulunmuştur. Kültür ortamında glikoz varlığının, zeytinyağına kıyasla lipaz üretimini baskıladığı da bildirilmiştir (Mobarok-Qamsari vd., 2011).

Aspergillus carneus lipaz üretimini artırmak için ortam bileşenlerinin ve büyüme koşullarının optimizasyonunun araştırıldığı Kaushik tarafından yapılan çalışmada glikoz optimum karbon kaynağı olarak bulunmuştur (Kaushik vd., 2006).

Balaji'nin çalışmasında karbon kaynakları olarak şekerlerin lipaz üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. En yüksek lipaz üretimiyle en iyi karbon kaynağı glikoz olarak bulunmuş, glikozu, sukroz ve fruktoz izlemiştir. (Balaji vd., 2020).

Tan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Penicillium camembertii* Thom PG-3'ten lipaz üretiminde etkisi denenilen karbohidratlardan üretimi en çok artıranların laktoz ve mannitol olduğunu bildirmişlerdir (Tan vd., 2004).

Duza ve Mastan *Bacillus thuringiensis* (TS11BP)'den en iyi lipaz üretimini için karbon kaynağını dextroz olarak saptamıştır (Duza vd., 2014).

Mazhar ve arkadaşları 2017 yılında *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39'un lipaz üretiminde en iyi karbon kaynağı olarak sukrozu saptamışlardır (Mazhar vd., 2017).

Anoxybacillus flavithermus HBB 134 lipazı ile yapılan çalışmada en iyi indükleyici olarak %0,5zeytin yağı içeren besi ortamında gerçekleştiğini saptamıştır (Bakır, 2016).

Ilesanmi'nin çalışmasında lipaz üretimini tetikleyebilecek Tween20, Tween80, Zeytinyağı, glikoz ve früktoz gibi farklı karbon kaynakları kullanılmıştır. En yüksek lipaz aktivitesine sahip ortamlar sırasıyla zeytinyağı, Tween 80, Tween 20, früktoz ve glikoz olarak bulunmuştur (Ilesanmi vd., 2020).

Sahoo'nun 2018 yılındaki çalışmasında da karbon kaynağı olarak zeytinyağı kullanılmıştır (Sahoo vd., 2018). Yine Sahoo'nun *Anoxybacillus* tarafından üretilen lipazın araştırıldığı 2020 yılındaki çalışmasında da kaynak zeytinyağıdır (Sahoo vd., 2020).

Geobacillus thermoleovorans tarafından termostabil lipaz üretiminin optimizasyonunu çalışmada en uygun kaynak olarak zeytinyağı bildirilmiştir (Abdel-Fattah, 2002).

Ertuğrul ve arkadaşları (2007) *Bacillus* sp. İle yapılan çalışmada lipaz üretimini en çok artıran karbon kaynağı olarak triolein bildirilmiştir (Ertuğrul vd., 2007).

Balaji'nin çalışmasında kaynak olarak zeytinyağı, hindistancevizi yağı, hint yağı, yer fıstığı yağı, hurma yağı ve ayçiçek yağı gibi farklı yağlar kullanılmıştır. En yüksek lipaz üretimi sırasıyla zeytinyağı, ayçiçek yağı, yer fıstığı yağı, hint yağı, hindistan cevizi yağı ve hurma yağında elde edilmiştir (Balaji vd., 2020).

Maia ve arkadaşları *Fusarium solani*'den en iyi lipolitik aktiviteyi susam yağı ve triolein içeren ortamda saptamışlardır (Maia vd., 2001). Tan ve arkadaşları çalışmasında *P. camembertii* Thom PG3'ün en iyi lipolitik aktiviteyi jojoba yağı ve zeytinyağı içeren ortamda görüldüğünü saptamıştır (Tan vd., 2004).

2.4. Azot Kaynağının Etkisi

Lipaz üreten organizmanın fermantasyonu için azot kaynağı gereklidir (Tembhurkar, 2012). Bakteriyel hücrelerin lipaz azot kaynağı için maya ekstraktı, sığır eti ekstraktı pepton, tripton gibi organik azot kaynakları oldukça önemlidir (Deepali vd., 2011). Lipaz üretiminde besi yerinde azot kaynağı için pepton, maya ekstraktı kullanılanlara *Basillus alcalophilus*,

Bacillus licheniformis, *Pseudomonas sp.*, *P. fragi*, *P. Fluorescens* ve *S. haemolyticus* örnek olarak verilebilir (Ghanem vd., 2000). Amonyum sülfat, amonyum klorür, potasyum nitrat gibi inorganik azot kaynaklarında lipaz üretimini arttırmaktadır (Ali vd., 2015).

Exiguobacterium sp. lipazı için maya ekstraktı, sığır eti ekstraktı, pepton, tripton, jelatin gibi organik azot kaynakları karşılaştırıldığında lipaz üretimini en çok maya ekstraktının arttırdığını saptanmıştır (Ali vd., 2015).

Staphylococcus sp. LP12'den lipaz üretimini en çok artıran azot kaynağının pepton olduğu saptanmıştır (Pogaku vd., 2010).

Burkholderia cepacia lipazı inorganik ve organik azot kaynakları incelendiğinde en çok üretim di-amonyum hidrojen ortofosfat ve potasyum nitrat varlığında gözlenmiştir (Rathi vd., 2002)

Staphylococcus sp. LP12'den suşu lipazının üretimini en çok artıran azot kaynağının potasyum nitrat olduğu saptanmıştır (Pogaku vd., 2010).

Aeromonas veronii ile yapılan çalışmada lipaz üretimini en çok artıran azot kaynağının jelatin olduğu saptanmıştır (Kamaladevi vd., 2014).

Mobarok'un çalışmasında kullanılan farklı azot kaynakları arasında en uygun kaynak pepton olarak bulunmuştur. Amonyum klorür ve amonyum dihidrojen fosfat gibi inorganik azot kaynaklarının da bazı mikroplarda etkili olduğu bildirilmiştir (Mobarok-Qamsari vd., 2011).

Balaji'nin çalışmasında azot kaynaklarının *Bacillus sp.* tarafından lipaz üretimi üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Test edilen farklı nitrojen kaynakları arasından, pepton ile bazal ortamda üretime kıyasla maksimal lipaz üretimi elde edilmiştir. Sonrasında da amonyum nitrat ve amonyum klorür gibi organik nitrojen kaynaklarının daha yüksek lipaz üretimine sahip olduğu bulunmuştur (Balaji vd., 2020).

Bora ve arkadaşları, Gulati ve ark. tarafından da yapılan çalışmada peptonun lipaz üretimi için en iyi azotlu kaynak olduğu bulunmuştur (Bora , 2012; Gulati vd., 2005).

Tan ve arkadaşları 2004 yılında *Penicillium camembertii* Thom PG-3'ten lipaz üretimini en çok artıran azot kaynağının yağı alınmış soya olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca inorganik azot kaynaklarından NH₄⁺ veya NO₃⁻ formunda olanların lipaz üretimini artırırken, diğer tüm inorganik kaynaklarının lipaz sentezini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Tan vd., 2004).

Aspergillus veronii EK-2 izolatu ile yapılan çalışmada lipaz üretimini en çok arttıran azot kaynağının jelatin olduğu tespit edilmiştir. İnorganik azot kaynaklarından olan amonyum sülfat ve amonyum klorürün lipaz üretimini arttırdığı saptanmıştır (ztrk vd., 2019). Kamaladevi ve çalışma arkadaşları 2014 yılında aynı tür ile yapılan bir başka çalışmada en lipaz üretimini arttıran en iyi azot kaynağı olarak yine jelatin olarak bildirilmiştir (Kamaladevi vd., 2014).

Aspergillus tamarii JGIF06'dan lipaz üretimini arttıran azot kaynaklarının amonyum klorürü ve amonyum sülfat olduğunu bildirmişlerdir (Das vd., 2017).

Literatürdeki diğer çalışmalarda en iyi azot kaynakları olarak; *Acinetobacter radioresistens* *Aspergillus* sp., *Bacillus coagulans* BTS-3 lipazları ile yapılan çalışmalarda sırasıyla % 0,75'lik yeast ekstrakt, % 1'lik pepton ve % 0,5 pepton ile % 0,5 yeast ekstrakt olarak bildirilmiştir (C.-Y. Li vd., 2004, Cihangir vd., 2004, Kumar vd., 2005). Sirisha ve ark. (Sirisha vd., 2010) da çalışmalarında lipaz üretimi için en iyi azot kaynağı olarak peptonu bildirmişlerdir. Bacha ve ark. *S. aureus*'un lipaz üretiminde en iyi azot kaynağı olarak maya özütü kullandıklarını belirtmişlerdir (Ben Bacha vd.,2016). Mazhar ve arkadaşlarının 2017 yılındaki çalışmasında *B. subtilis* PCSIRNL-39'un lipaz üretiminde en iyi azot kaynağı olarak pepton saptanmıştır (Mazhar vd., 2017).

Pseudomonas aeruginosa üretim ortamında lipaz üretimini etkileyebilecekleri için Maya zt, Pepton, Kazein, Amonyum Nitrat ve Potasyum Nitrat gibi farklı türlerden nitrojen kaynakları kullanılmıştır. Maya Ekstraktı, Amonyum Nitrat, Pepton, Kazein için sırasıyla lipaz aktivitesi kaydedilirken, nitrojen kaynağı olarak Potasyum Nitrat içeren ortamda hiçbir aktivite tespit edilememiştir (İlesanmi vd., 2020).

Pseudomonas sp. ile yapılan çalışmada, maksimum lipaz üretiminin nitrojen kaynağı olarak pepton ve maya ekstraktı kullanıldığında elde edildiği belirtilmiştir (Fatima vd., 2015). *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan çalışmada, amonyum sülfat haricindeki inorganik azot kaynaklarının lipaz üretimini azalttığı rapor edilmiştir (Bisht vd., 2013).

2.5. Zeytin Atık Suyu

Zeytinyağı üretiminde kullanılan yöntemlerden 3 fazlı üretimde, zeytinyağı, atıksu (karasu) ve pirina oluşurken, 2 fazlı üretimde sulu pirina ve zeytinyağı oluşmaktadır. Ülkemizde yaklaşık 1031 adet zeytinyağı tesisi bulunduğu tahmin edilmektedir (Hocaoğlu vd., 2017) Atık suları, su (%83-92), organik madde (%4-16) ve mineral tuzlardan (%1-2) oluşan kötü kokulu ve asidiktir. Üç fazlı zeytinyağı üretim atıksuları; ik fazlı zeytin atık suyuna göre daha asidiktir pH (3-6). Yüksek polifenolik içerik (0.5-24 g/L) ve yüksek katı madde içeriği ile karakterize edilmektedir. Bu atıksular; fruktoz, monos, glukoz, sakkaroz, sukroz ve biraz pentozdan ibaret olan %1,6-4 şeker içermektedir.

Zeytinyağı atıksuyuna rengini veren fenolik bileşikler; sinamik asit türevleri, benzoik asit türevleri ve hidrosifenilasetik asit gibi ilgili bileşikler olmak üzere üç temel kategoride sınıflandırılabilir. Zeytinyağı atıksularında yüksek konsantrasyonlarda bulunan fenolik bileşikler, fitotoksisite ve antimikrobiyal özelliklere sahip olan ve biyolojik olarak ayrışması zor olan kalıcı bileşiklerdir. Bununla birlikte, düşük pH ve polifenollerin kompleks oluşturma yetenekleri çevredeki ağır metallerin çözünürlüğünü arttırmaktadır (Tunç ve Ayhan, 2015).

2.6. Lipaz aktivitesi üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Rhizopus oryzae suşundan lipaz enzimi optimum pH aralığının 4,50-7, 50 olduğunu optimum sıcaklık değerinin ise 35 °C olarak saptanmıştır. 35 °C üzerinde aktivite kaybı olduğu örneğin 45°C'de ise 30 dakika sonunda enzim aktivitesinde %25 oranında kayıp olduğu saptanmıştır (Hiol vd., 2000).

Cryptococcus sp. lipaz enzimi maksimum enzim aktivitesini pH 7,00 ve sıcaklık 37 °C'de saptanmıştır. Lipazın optimum pH aralığı 5,00-9,00 arasında olduğu, pH 9,00 seviyesinin üstünde aktivitede %50 oranında kayıp olduğu saptanmıştır (Kamini vd., 2001).

Aspergillus niger lipazının optimum pH değeri 2,50 ve sıcak değeri 45 °C olarak saptanmıştır (Mahadik vd., 2002).

P. fluorescens lipazı ile yapılan çalışmada fermentasyon koşulları 45 °C ve pH 4,50 olarak saptanmıştır (Kojima vd., 2003).

Aspergillus carneus lipazının optimal pH aralığı 8,00 – 10,00, optimum pH değerinin ise 9,00 olduğu ve optimal sıcaklık değeri ise 37°C olarak belirlenmiştir (Saxena vd., 2003).

Bacillus megaterium lipazı optimum pH aralığının 5,00- 7,00 arasında olduğu, optimum pH'ı ise 6,00 olduğu bildirilmiştir. Lipazın pH 4,00'de aktivitenin %30'unu kaybettiğini, pH 3,00 seviyesinde ise hiç aktivite göstermediği saptanmıştır (Lima vd., 2004).

Bacillus sphaericus 205 suşunun maksimum lipaz aktivitesini pH 7,00- 8,00 ve 55°C'de gösterdiği, enzimin pH 5,00- 13,00 aralığında 37°C'de 30 dakika stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Sulong vd., 2006).

Pseudomonas aeruginosa lipazının 2 gün boyunca optimal pH aralığında (7,00- 9,00) stabilitesini koruduğu, pH 6,00'da aynı süre sonunda aktivite değerinin %67 olduğu ve pH 10,00'da ise 3 saat'te aktivitesinin %50 olduğu saptanmıştır (Singh vd., 2007).

Pseudomonas aeruginosa lipazının maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 40°C olduğu ve 4 saat boyunca aktivitesini koruduğu, 50°C sıcaklıkta ise aynı süre sonunda aktivitesinin %40 olduğu bildirilmiştir (Gaur vd., 2008).

Serratia marcescens ECU1010 suşu lipazının optimum sıcaklığı 45°C ve pH'ı 8,00 olarak saptanmıştır. Enzimin optimal pH aralığı 6,00- 9,00 seviyesinde olarak bildirilmiştir (L.-L. Zhao vd., 2008).

Pseudomonas fluorescens JCM5963 suşu lipazı optimum pH'ı 9,00 ve optimum sıcaklığının 55°C olduğu saptanmıştır (Zhang vd., 2009).

Nomuraea rileyi lipazının optimum pH değeri 8,00 ve optimum sıcaklık değeri 35 °C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin pH 7,00 – 9,00 sıcaklık 15-35 °C arasında stabil olduğunu belirlenmiştir (Supakdamrongkul vd., 2010).

Kampe ve ark *Aspergillus niger* MTCC 2594 suşu lipazının optimum şartlarını pH 7,00 ve 37 °C olarak saptamışlardır (Nakajima-Kambe vd., 2012).

Mucor hiemalis lipazı optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7,00 ve 50 °C olarak saptanmıştır. Enzimin pH 5,00-11,00 değerlerinde ve 30-50 °C arasında stabil olduğu, 60-80 °C arasında ise aktivitesini %50 oranında kaybettiği saptanmıştır (Ülker vd., 2012).

Aneurinibacillus thermoaerophilus lipaz enziminin optimum pH değerini 7,00 sıcaklık değeri 60 °C olarak saptanmıştır. Enzimin oda sıcaklığında ve pH 4,00-9,00 arasında aktivitesinin stabil olduğunu gözlemlemişlerdir (Masomian vd., 2013).

Staphylococcus sp. lipazının optimum pH değeri 8,00, optimum sıcaklık değeri 45 °C olarak saptanmıştır. Enzimin 1 saat boyunca pH 6,00-9,00 değerleri arasında ve 45 °C sıcaklıkta aktivitesinin %69'unu koruduğu saptanmıştır (Daoud vd., 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Sigma firmasından; Luria-Bertani (LB) broth, agaroz, zeytinyağı ve triolein **Fluka firmasından;** p-nitrofenil laurat, skim milk pepton, tripton, agar, pamuk yağı, badem yağı, mısır yağı ve soya yağı; **Merck firmasından;** yeast ekstrakt (maya özütü), beef ekstrakt (et özütü) p-nitrofenol, metanol, etanol, aseton, amonyum sülfat ve amonyum nitrat **Aldrich firmasından;** ketentohumu yağı **Riedel- de Haen firmasından;** üre, hidrojen peroksit, benzen, toluen, ksilol ve oleik asit kullanılmıştır.

3.2. Mikroorganizma

Bu çalışmada kullanılacak mikroorganizma olan *Anoxybacillus* sp. HBB 180 Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyokimya laboratuvarında önceden izole edilmiş olan stok kültürlerden sağlandı. Bakteri stoğu çalışmaya başlamadan önce, içeriği Tablo 6'de verilen Luria-Bertani (LB) agar ortamında 50 °C' de 24 saat geliştirilmiştir. Bakteri stokları daha sonra steril koşullarda %20'lik skim milk çözeltisi içeren cryotüplere aktarıldı. Sonraki denemelerde kullanmak için ADÜ Biyoloji Bölümü Biyokimya laboratuvarında -80 °C'de saklandı.

Tablo 6. Luria-Bertani agar ortam içeriği

| Kimyasal madde | Miktarı |
|-----------------------|---------|
| Tripton | % 1 |
| Yeast ekstrakt | %0,5 |
| NaCl | % 1 |
| Agar | % 1,5 |

15 dakika boyunca 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 1 mM olacak şekilde eklendi. Optimum koşullar belirlenmeden önce ortam bileşenleri 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 10.000 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 ortam bileşenleri

| Kör | Örnek |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,8 mL Glisin-NaOH (50 mM, pH 9,00) | 0,8 mL Glisin-NaOH (50 mM, pH 9,00) |
| 0,1 mL Glisin-NaOH (50 mM, pH 9,00) | 0,1 mL enzim çözeltisi |
| 0,1 mL pNPL (10 mM, etanolde) | 0,1 mL pNPL (10 mM, etanolde) |

30 dakika boyunca 50 °C’ de inkübasyona bırakıldı.

Reaksiyon durdurucu olarak 0,25 mL 0,1 M Na₂CO₃ kullanıldı.

+4 °C’de 15 dk. boyunca 10.000 x g’de santrifüj edildi.

Spektrofotometre cihazında 410 nm’de ölçüm yapıldı.

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

| Kör | Örnek |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 0,8 mL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,50) | 0,8 mL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8,50) |
| 0,1 mL LB broth | 0,1 mL enzim çözeltisi |
| 0,1 mL pNPL (10 mM, etanolde) | 0,1 mL pNPL (10 mM, etanolde) |

30 dakika boyunca 55 °C’de inkübasyona bırakıldı.

Reaksiyon durdurucu olarak 0,25 mL 0,1 M Na₂CO₃ kullanıldı.

+4 °C’de 15 dk. boyunca 10.000 x g’de santrifüj edildi.

Spektrofotometre cihazında 410 nm’de ölçüm yapıldı.

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

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra Volum 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: ışık yolu (1cm)

ϵ : molar absorbans katsayısı (mM⁻¹ cm⁻¹)

v: örnek hacmi (mL)

t: inkübasyon zamanı (30 dk)

A: absorbans

SF: seyreltme faktörü

3.4. 16S rRNA Analizi ile HBB-180 İzolatının Tanılanması

3.4.1. İzolattan genomik DNA izolasyonu ve PCR

180 nolu izolat gecelik kültürden %2 lik LB'ye ekim yapılmıştır. Optimum enzim üretim koşullarında 24 saat sonra 5 ml sıvı besi yeri alınarak 13000 x g 15 dk +4 derecede santifuj edildi. Sonrasında supernatant uzaklaştırılarak steril distile su ile iki kere yıkama yapıldıktan sonra pellet steril epondorflara aktırıldı. DNA izolasyonu İnvitrogen PureLink mini genomik DNA izolasyon kiti ile devam edildi. Başlangıç olarak pellet üzerine 180 µL genomik digestion buffer, 30 °C µL lizozim (20 mg/mL) ve 10 µL Rnase A eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkube edildi. Sonrasında karışımın üzerine 10 µL (20 mg/ml) proteinaz K eklenerek 50 °C'de 30 dk inkube edildi. İnkubasyon sonrası tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra, supernatant temiz bir tube alınarak üzerine 200 µL ethanol ve 200 µL genomik lysis/binding buffer eklenerek karıştırıldı. Daha sonra üst fazın 640 µL spin kolonlara yüklendi. Kolon yıkama tamponları ile 10000 x g'de 1 ve 3 dakika yıkama yapılarak DNA içeriği temizlendi. Son olarak 100 µL elution buffer eklenerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj sonucunda stok DNA elde edildi. DNA konsatrasyonu NanoDrop 2000 spektrofotometre cihazında ölçülerek, konsatrasyonu PCR reaksiyonu için 50 ng/µL ayarlandı. PCR reaksiyonu 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3 primerleri kullanılarak, 1 µL primerlerden (20 µM), 12.5 µL Taq DNA polimeraz 2X MixRED (Ampliçon) ve 50 ng DNA olmak üzere 25 µL toplam reaksiyon hacmi ile 4 dakika 94 °C 30 döngü, 1 dakika 94 °C'de, 45 saniye 60 °C'de, 1 dakika 72°C'de ve uzama aşamasında 5 dakika 72 °C reaksiyon koşulları kullanılarak tamamlandı. Elde edilen PCR ürünleri %2 lik agarose jel elektroforezi ile kontrol edildi. Forward primer yönünde tek yön olarak Atlas Biyoteknoloji şirketi aracılığıyla hizmet alımı olarak sekans işlemleri tamamlandı.

3.4.2. Data Analizi

16S rRNA tür tayini yöntemi için Atlas biyoteknoloji şirketinden Abı formatında alınan örnek dosyası Bioedit 7.2.6. programı (Thompson vd. 1994) kullanılarak düzenlenip fasta formatına çevrilip tür tayinin için WWW.ncbi.com nükleotid database kullanılarak blastlanma işlemi yapıldı. Elde edilen sonuç NCBI filogenetik analysis aracı ile en yakın 10 tür ile neighbor joining metodu kullanılarak filogenetik ağacı çizildi.

3.5. Kültür Koşullarının *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB 180 Lipaz Üretimi Üzerine etkisi

3.5.1. Başlangıç pH' ının Lipaz üretimi üzerine etkisi

Fermantasyon parametlerinden biri olan pH'nın enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için pH 4,00-10,50 arasındaki pHlarda 0,5 birim kademeli olarak artırılarak enzim üretim ortamı ayarlandı. HBB180 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 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.

3.5.2. İnkübasyon sıcaklığının Lipaz üretimi üzerine etkisi

Fermantasyon parametlerinden biri olan sıcaklığın enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için 30-80 °C arasındaki sıcaklıklarda 5 birim kademeli olarak artırılarak önceden belirlenen optimum pH'6,50'ta üretim ortamı hazırlanır. HBB180 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.

3.5.3. Lipaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi

Enzim üretimi üzerine çeşitli karbon kaynaklarının etkisini saptamak için karbon kaynakları (zeytinyağı, pamuk yağı, soya yağı, mısır yağı, badem yağı, keten tohumu yağı triolein) ve ticari olarak satılan bazı yağlar zeytin yağı (geleneksel üretim), ayçiçek yağı (YUDUM), pamuk yağı (TARİŞ), mısır yağı (EVİN), fındık yağı (GÜRSOY) kullanıldı. Ayrıca Zeytin yağı ve peynir fabrikalarının atığı olan 2 fazlı zeytin kara suyu (2 fazlı üretim işleminde sulu pirina ve yağ olmak üzere 2 ayrı fazdan oluşmaktadır), 3 fazlı zeytin kara suyu (3 fazlı üretim işleminde dekantasyon atıksuyu, pirina ve yağ olmak üzere 3 ayrı fazdan oluşur) ve peynir altı suyu (ÖZSOY) kullanıldı. Yağlar dışındaki denenen peynir altı suyu karbon kaynağı için LB broth ortamı kontrol olarak kullanıldı. Peynir altı suyu dışında denenen tüm karbon kaynakları için kontrol olarak ise %0,5 g gum arabic içeren LB broth ortamı kullanıldı (Tablo 9). Karbon kaynaklarının konsantrasyonlarını belirlemek için ise %0,1, 0,5 ve 1 oranında olacak şekilde kontrol ortamlarına eklendi. Ticari yağlar ise %0,5 g gum arabic içeren LB broth ortamına final konsantrasyonları %0,1, 0,5 ve 1 olacak şekilde eklendikten sonra diğer ortamlardan farklı olarak karıştırıcının (WARING, Commercial Blender 8011ES, USA) maximum hızında 3 dakika emülsifiye edildi. Denenen tüm karbon kaynakları otoklavda 121 °C’de 15 dakika boyunca sterilize edildi.

HBB180 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 55 °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. Karbon kaynaklarının denemelerinde kullanılan kontrol besiyerleri

| Kimyasal madde | Yağ dışı denemeleri | Yağ denemeleri |
|-----------------------------|---------------------|----------------|
| Tripton | %1 | %0,1 |
| Yeast ekstrakt (maya özütü) | %0,5 | %0,5 |
| NaCl | %1 | %1 |
| Arabic gum | - | %0,5 |

pH 6,50

121 °C' de 15 dakika sterilizasyon

3.5.4. 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 (üre, pepton, yeast ekstrakt, tripton) ve inorganik azot kaynaklarından (amonyum sülfat, amonyum nitrat) %0,5 oranında eklendi (Tablo 10). Böylece en iyi enzim üretimini sağlayan nitrojen kaynağı belirlenir. Ardından optimum konsantrasyonu belirlemek için %0,5; 1 ve 1,5 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 ayarlandı. 1 L'lik erlene pH'ı 6,50 olan 200 mL enzim üretim ortamı %1 oranında inoküle edildi. Kültür, 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 55 °C'de ve 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerde lipaz aktivitesi ve hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Tablo 10. Azot kaynağı denemelerinde kullanılan besi ortamı

| Kimyasal madde | Miktarı |
|--------------------------|----------------|
| Zeytin yağı (geleneksel) | %0,5 |
| Azot kaynağı | %0,5 |
| NaCl | %1 |
| Arabic gum | %0,5 |

pH 6,50

121 °C' de 15 dakika sterilizasyon

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

3.5.5. İnkübasyon Süresinin Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

İnkübasyon süresinin enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla HBB180 suşu belirlenen optimum koşullarda (pH 6,50 ve 55 °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.

3.5.6. Lipaz Üretimi Üzerine Lipazın Lokalizasyonu

HBB180 suşu belirlenen optimum koşullarda (pH 6,50 ve 55 °C) 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 12 saat geliştirildi. Sigma-3K30 cihazı ile 20.000xg'de +4 °C'de 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatant (S1) hücre dışı fraksiyon olarak ayrıldı, pellet (P1) ise ultra saf su ile iki kez yıkandı. Son olarak hücre fraksiyonu aynı hacimde + 4 °C ve pH 8,50 de hazırlanan 20 mM Tris-HCl tamponu ile çözüldü. Hücre fraksiyonunun bir kısmı aktivite tayini için ayrıldı, geri kalanı BANDELIN SONOPULS-HD2200 marka sonikatör ile buzlu ortamda %40 güçte, 4 döngüde 10 dakika sonike edildi. Ardından hücre içi fraksiyonu elde etmek için 20.000 x g'de +4 °C'de 20 dakika santrifüjlendi. Böylece Süpernatant (S2) ayrıldıktan sonra

kalan pellet (P2) membrana bağlı aktivite tayinini elde etmek için iki kez ultra saf suda yıkandı ve sonra aynı hacimdeki Tris-HCl tamponunda çözüldü.

Kuruyan örnekler ateşte 3 kere fikse edildikten sonra metilen mavisi ile boyanarak 2 dakika bekletildikten sonra sudan geçirilip dik bir şekilde kuruması beklenir. Mikroskopla bakıldığında 20.dakikada hücreler parçalanmış olarak görüldü.

3.6. *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB 180 Lipazının Karakterizasyonu

3.6.1. 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-Na₂HPO₄) 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 absorbans katsayıları kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır (Tablo 11).

Tablo 11. pNP' ün farklı pH' lardaki molar absorbans katsayıları (Bakır, 2016)

| pH | Molar Absorbans Katsayısı (mM ⁻¹ cm ⁻¹) |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 5,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit-Na ₂ HPO ₄) | 0,2 |
| 5,50 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit-Na ₂ HPO ₄) | 0,58 |
| 6,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit-Na ₂ HPO ₄) | 1,57 |
| 6,50 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit-Na ₂ HPO ₄) | 4,57 |
| 7,00 (McIlvaine tamponu- Sitrik asit-Na ₂ HPO ₄) | 8,71 |
| 7,50 (Tris-HCl) | 16,03 |
| 8,00 (Tris-HCl) | 17,34 |
| 8,50 (Tris-HCl) | 18,26 |
| 9,00 (Glisin-NaOH) | 18,11 |
| 9,50 (Glisin-NaOH) | 18,15 |
| 10,00 (Glisin-NaOH) | 18,04 |
| 10,50 (Glisin-NaOH) | 18,56 |
| 11,00 (Fosfat Tamponu-Na ₂ HPO ₄ -NaOH)) | 18,14 |
| 11,50 (Fosfat Tamponu-Na ₂ HPO ₄ -NaOH)) | 18,42 |
| 11,90 (Fosfat Tamponu-Na ₂ HPO ₄ -NaOH)) | 18,49 |

3.6.2. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine 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 version 25).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Enzimler, hücre içinde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden, kimyasal reaksiyonları hızlandıran, gerekli olmadıkça yan ürün vermeyen, reaksiyonunu dengesine etki etmeyen, yapısı bozulmadan reaksiyondan çıkan protein yapıda moleküllerdir. Enzimlerin çeşitli kimyasal işlemlerde ve endüstriyel birçok uygulamada kullanılması enzimolojiye olan ilgiyi artırmıştır (Pliego vd., 2015). Günlük yaşamda kullanılan enzimler daha çok; ekmek, maya, kırmızı, boza gibi besinlerde kullanılmaktadır (Hammamchi, 2014). Enzimlerin tanınma aşamalarında 1930 yıllarında 80 farklı enzim bilinmekteyken, günümüzde ise 2500 civarı enzimin bilinmektedir ve henüz tespit edilmemiş birçok enzimin olduğu düşünülmektedir (Punekar, 2018).

Lipitler; dünyadaki biomasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Lipolitik enzimler ise suda çözünmeyen bileşiklerin dönüşümünde önemli rol oynar. Lipazlar (triacilgliserol ester hidrolaz, EC 3.1.1.3), yağ-su arayüzünde, serbest yağ asitleri ve gliserol oluşturmak üzere triacilgliserollerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen lipolitik karboksilester hidrolazlardır. Lipazların esnek protein yapıları sayesinde transesterifikasyon (asidoliz ve alkoliz gibi), interesterifikasyon, hidroliz ve aminoliz reaksiyonlarında gerçekleştirebilirler. İleri hidroliz ve sentez reaksiyonları reaksiyon karşımının su aktivitesi ile kontrol edilir (Hasan vd., 2006; Ay vd., 2011).

Lipazlar birçok endüstriyel alanda kullanılan en önemli enzimlerden biridir. Lipazlar; regioselektiflik, kiral seçicilik ve substrat özgüllüğü gibi özellikleri ile endüstride önemli bir yere sahiptirler. Endüstriyel uygulamalar sürekli bir gelişim içinde olduğu ve bu uygulamalarda enzimin farklı spesifik özelliklerini gerektirebileceğinden, yeni özelliklere sahip enzimler her zaman talep görmektedir. Bu talebin karşılanmasında da yeni lipaz kaynaklarının bulunması için giderek artan bir ilgi mevcuttur. (Ertuğrul vd., 2007; Hasan vd., 2006; Konarzycka vd., 2006).

Lipaz üreten çeşitli mikroorganizmalar, bitkisel yağ işleme fabrikaları, yağla kirlenmiş sular ve topraklar, endüstriyel atıkların olduğu bölgeler ve mandıralar gibi habitatlarda bulunurlar. Bununla beraber, özellikle yüksek sıcaklarda ve çeşitli ekstrem koşullarda yaşayan mikroorganizmalar tarafından üretilen lipazlar, çeşitli endüstriyel koşullarda daha stabil olmalarından dolayı tercih edilmektedirler. Ayrıca, termofilik bakterilerden elde edilen

enzimler çeşitli işlem ve saklama koşulları altında da daha yüksek stabiliteye sahiptir. Son yıllarda lipaz üretiminin optimizasyonuna yönelik çalışmalar da çoğalmıştır. Lipaz üretimi optimizasyonu, izolata, büyüme ortamının bileşimine, pH ve sıcaklık gibi inkübasyon koşullarına, karbon ve azot kaynakları gibi besin faktörlerine göre değişmekte ve bu faktörlerin optimizasyonu sayesinde lipaz üretiminde ciddi artış olabilmektedir (Treichel vd., 2010).

Unlu mamüllerde aroma geliştirme ve ürünün raf ömrünün uzatılması, meşrubatlarda aroma geliştirme, kozmetik ürünler ve nemlendirici maddeler, süt yağının hidrolizi, peynir aromasının artırılması, peynir olgunlaşmasının hızlandırılması, peynir benzeri ürünlerin imalatı ve kaymak hidrolizi işlemleri, katı-sıvı yağlarda transesterifikasyonu, et ve balık ürünlerinde yağın uzaklaştırılması, kağıt ürünlerinde kağıt hidrolizi gibi alanlarda lipaz enziminin kullanımı oldukça önemlidir.

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma olan *Anoxybacillus* sp. HBB180 laboratuvarında daha önceden izole edilmiş stok kültürlerden sağlanmıştır. Kantitatif lipaz aktivite tayini substrat olarak p-NPL (p-nitrofenil laurat) kullanılmış ve spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Lipaz ürettiği daha önceden saptanmış *Anoxybacillus* sp. HBB180 izolatından lipaz üretimini arttırmak amacıyla optimum koşullar araştırılmıştır. Bunun için, fermantasyon koşullarında değişiklikler yapılmıştır. Bunlar inkübasyon süresi ve sıcaklığı, besiyeri pH'sı, yağ kaynağı, yağ oranı, organik ve inorganik azot kaynakları optimize edilerek yapılmıştır.

4.1. Data analizi

HBB180 nolu izolatın 16S rRNA gen bölgesi PCR reaksiyonu ile çoğaltılarak NCBI database kullanılarak elde edilen hızalanması sonucunda en fazla oranda (%95.07) ile *Anoxybacillus kaynarcensis* strain D1021 türü ile benzerlik gösterdi. NCBI filogenetik ağacı kullanılarak blastlama sonucu %95 üzerinde benzerlik gösteren 10 suş ile filogenetik ağaç çizilmiştir (Şekil 6).

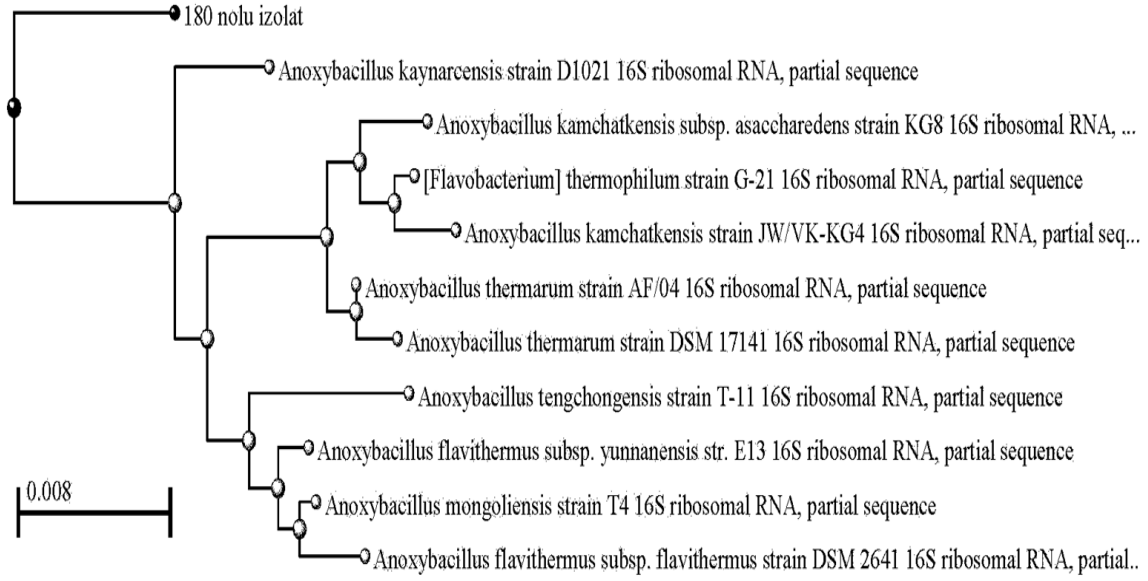
Query 5 GCTGGGCGGCGTGCCTA-TACATGC-AGTCGAGCGGACGATTCAAAAGCTTGCTTTTGAA 62

Sbjct 33 GCT-GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACGATTCAAAAGCTTGCTTTTGAA 91

Query 63 TCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGTAGACGGGGATAACA 122

Sbjct 92 TCGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGTAGACGGGGATAACA 151

Query 123 CCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCGCATGATCTTTCGTTGAAAGG 182
Sbjct 152 CCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATACGAAAGGTCGCATGATGTTTCGTTGAAAGA 211
Query 183 CGGCGCAAGCTGTCGCTACAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG 242
Sbjct 212 CGGCGCAAGCTGCCGCTACAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACG 271
Query 243 GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA 302
Sbjct 272 GCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA 331
Query 303 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGT 362
Sbjct 332 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGT 391
Query 363 CTGACGGAGGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTA 422
Sbjct 392 CTGACGGA-GCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTA 450
Query 423 GGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTACTGTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCAC 482
Sbjct 451 GGGAAGAACAAGTAACGTAGTAAGTGGCGTACTGTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCAC 510
Query 483 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT 542
Sbjct 511 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT 570
Query 543 TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACC 602
Sbjct 571 TGGGGGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACC 630
Query603 GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGGAATTCCACG 662
Sbjct 631 GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT-GGAATTCCACG 689
Query 663 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGGCGAT-GCGGCTCTCTGG 721
Sbjct 690 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG-CGAAGGCGGCTCTCTGG 748
Query 722 TCTGTAAGTACGCTGA-GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGGT 780
Sbjct 749 TCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG-T 807
Query 781 AGTCCCCCGCGT-AACGATGAGTGCTA-GTGTTTAGGAGGGTATCCCACCCCTTTAGTG 838
Sbjct 808 AGTCCAC-GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT-AG-AGGGTATCC-ACCC-TTTAGTG 862
Query 839 CTGGTAGCCTAACGCCATTAAGCAACTCCGCCCTGGGGGAGTTACGCCTCCGCA-GAGT 897
Sbjct 863 CTG-TAGC-TAACGC-ATTAAGCA-CT-CCGCC-TGGGG-AGT-ACGC-TC-GCAAGAGT 912
Query 898 TGCAAATTCAGACGGATTTGACGGCGTCCCGTCACAGGCG-TGCGA-CATGTG 949
Sbjct 913 -G-AACT-CAAA-GGAATTGACGGGGGCCCG-CACAAGCGGTG-GAGCATGTG 960



Şekil 6. HBB 180 izolatına ait filogenetik ağaç

4.2. Kültür Koşullarının *Anoxybacillus Kaynarcensis* Hbb 180 Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

4.2.1. Başlangıç pH'nın Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

pH'nın lipaz üretimi üzerine etkisini belirlemek için HBB180 pH 4,00-10,50 arasında 24 saat inkübe edilmiştir. HBB180, en yüksek enzim aktivitesi (11.01 U/mL) pH 6,50'da elde edildi (Tablo 12, Şekil 7). Ortam pH'ı 7,00 ve 7,50 değerlerinde ise maksimum değere oldukça yakın olup, aralarındaki farkın istatistik olarak önemsiz olduğu saptandı. Bu durum, enzim üretimi için ortamının başlangıç pH'sını pH 6,50-7,50 arasında kullanılabileceğini göstermektedir. HBB 180 pH 6,00'nin altında ve pH 8,50 üzerinde çok az gelişim göstermiştir. pH 6,00 (OD₆₀₀:0,229) ve 8,50'da (OD₆₀₀:1,065) gelişimin çok zayıf olduğu görülmüştür. Ortam pH'ındaki ufak farkların bile bakteri gelişimini ve enzim üretimini etkilediği bilinmektedir. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak *Anoxybacillus flavithermus* HBB134 ile yapılan çalışmada optimum pH 6,50 bulunmuştur (Bakır.,2016). *Anoxybacillus vitaminiphilus* lipazı ile yapılan çalışmada optimum pH 7,00 – 7,50 arasında bulunmuştur (Zhang vd., 2013). *Anoxybacillus* lipazı ile yapılan diğer bir çalışmada ise, en uygun pH değeri 8,30 olarak belirtilmiştir (Sahoo vd., 2020).

Lipaz üretimine üzerine başlangıç pH'ın etkisi ile ilgili diğer türlerle yapılan

çalışmalarda ise *P. fluorescens* HU380 (Kojima vd., 2003), *Burkholderia* sp. (Liu vd.,2006), *Serratia marcescens* ECU1010 (L.-L. Zhao vd., 2008), *Staphylococcus* sp. LP12 (Pogaku vd., 2010), *Bacillus* sp LBN 2 (Bora, 2012), *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (Masomian vd., 2013), *P. aeruginosa* (Bisht vd., 2013), *Staphylococcus* sp. (Daoud vd., 2013), *P. gessardi* (Veerapagu vd., 2013), *Bacillus* sp. (Larbidaouadi vd.,2015), *S. hominis* (Behera vd., 2019), *Bacillus licheniformis* A7 (Tuysuz vd.,2019), *Aeromonas veronii* (Öztürk vd.,2019) ve *Bacillus* sp. suşu VITL8 (Balaji vd.,2020) en yüksek lipaz üretimi pH 4,50-9,50 arasında bulunmuştur.

Funguslar üzerine yapılan çalışmalarda ise *Aspergillus carneus* (Saxena vd., 2003), *Aspergillus* sp. (Cihangir vd., 2004), *Mucor hiemalis* (Ülker vd., 2012), *Aspergillus niger* (Larbidaouadi vd., 2015), *Aspergillus niger* (El-Batal vd., 2016) ve *Aspergillus niger* (Bharathi vd., 2019) en yüksek lipaz üretimi pH 5,50-9,00 arasında bulunmuştur.

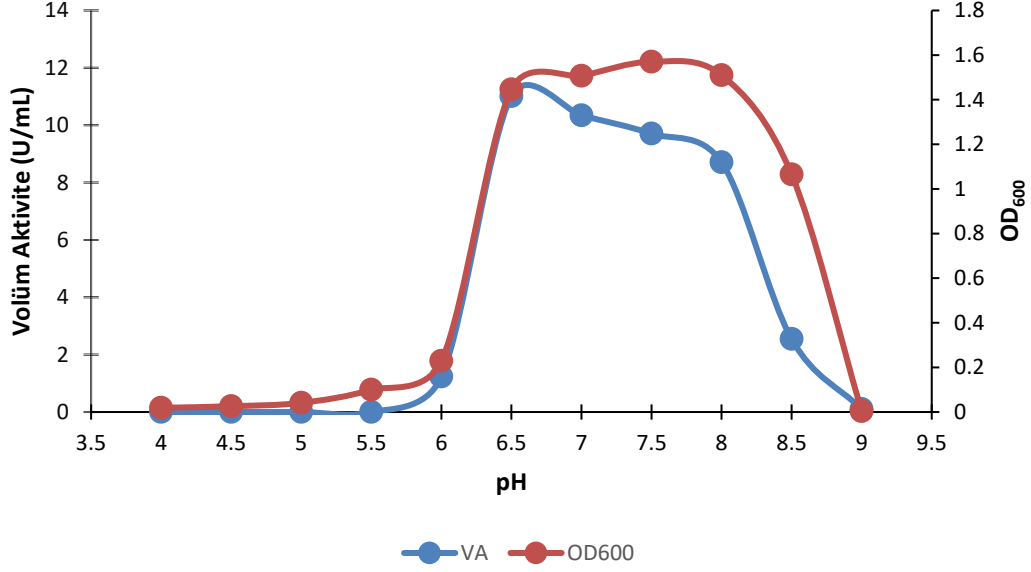
Tablo 12. Başlangıç pH'nın Lipaz üretim ortamı üzerine etkisi

| pH | OD₆₀₀ | x | Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.) | x |
|-------------|-------------------------|----------|----------------------------------------------------|----------|
| 4,00 | 0,019 ± 0,002 | - | 0 | - |
| 4,50 | 0,026 ± 0,001 | - | 0 | - |
| 5,00 | 0,041 ± 0,001 | - | 0 | - |
| 5,50 | 0,100 ± 0,009 | - | 0 | - |
| 6,00 | 0,229 ± 0,011 | b | 1,232 ± 0,890 | b |
| 6,50 | 1,446 ± 0,066 | a | 11,014 ± 0,368 | a |
| 7,00 | 1,507 ± 0,029 | a | 10,344 ± 0,207 | a |
| 7,50 | 1,570 ± 0,035 | a | 9,704 ± 0,525 | a |
| 8,00 | 1,510 ± 0,004 | a | 8,706 ± 0,228 | b |
| 8,50 | 1,065 ± 0,001 | b | 2,548 ± 0,652 | b |
| 9,00 | 0,004 ± 0,001 | - | 0 | - |

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S.: Standart sapma.

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



Şekil 7. Başlangıç pH'nın Lipaz üretim ortamı üzerine etkisi

4.2.2. İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

Lipaz üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisine 30-80 °C arasında denemeler yapıldı. Sıcaklık artışı ile paralel olarak lipaz üretimi 40 °C de başladığı (4,274 U/mL) belirlendi. 55 °C'de ise en yüksek değere ulaştığı (17,884 U/mL) görüldü (Tablo 14, Şekil 8). Enzim üretimi 40°C'inin altında ve 75 °C üzerinde saptanamamıştır. Bu sıcaklıklarda bakteri gelişimi ise çok az gözlemlenmiştir. 60-65 °C arasında bakteri gelişimi iyi olmasına rağmen enzim üretimde istatistiksel olarak önemli bir düşüş olmuştur. Bu düşüş enzimin bu sıcaklıklarda stabilitesinin az olması ile açıklanabilir. *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB 180'in 45-65°C arasında çok iyi gelişim göstermesi bu türün termofil olduğunu gösterir.

Lipaz üretimi için optimum sıcaklık kavramı organizmadan organizmaya değişmektedir. Fermantasyon ortamında organizmanın üremesini ve gelişmesini doğrudan etkilediğinden ortam sıcaklığının lipaz üretimi üzerinde önemli bir etkisinin olduğu belirtilmektedir.

pH'ın *Acinetobacter* sp'den lipaz üretimi için proses optimizasyonunda önemli bir etkiye sahip olmadığını ancak sıcaklığın önemli bir faktör olduğunu bulmuştur (Khoramnia vd., 2011). Sahoo'nun 2020 yılındaki *Anoxybacillus* lipazının araştırıldığı çalışmada tüm değişkenler arasında, sıcaklığın diğer değişkenlerle önemli ölçüde etkileşimli olduğu bulunmuştur (Sahoo vd., 2020).

Bizim sonuçlarımıza benzer olarak *Anoxybacillus vitaminiphilus* lipazı ile yapılan bir çalışmada üretim ortamı gerekli sıcaklığı 38–66 °C'de (optimum 57–60 ° C) bulunmuştur. *Anoxybacillus* lipazı ile yapılan diğer bir çalışmada ise, en uygun sıcaklık değeri ise 47° C olarak belirtilmiştir (Sahoo vd., 2020). *Anoxybacillus* sp. PDF1 suşunun karboksiesteraz enziminin araştırıldığı çalışmada 60-65°C bir sıcaklıkta çalıştığı tespit edilmiş ve endüstri için iyi bir optimum sıcaklığa sahip olduğu düşünülmüştür (Ay vd., 2011). *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ten lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi araştırıldığında, en iyi gelişim 50 °C'de elde edilmiştir (Bakır, 2016). Yapılan diğer çalışmalarda bazı bakterilerin lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili veriler Tablo 13'de özetlenmiştir.

Tablo 13. Bazı bakterilerde lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

| Türler | Optimum sıcaklık (°C) | Referans |
|-------------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| <i>Aeromonas veronii</i> | 30 | Öztürk vd., 2019 |
| <i>Aeromonas veronii</i> EK-2 izolatu | 30 | Öztürk vd., 2019 |
| <i>Serratia marcescens</i> ECU1010 suşu | 30 | L.-L. Zhao vd., 2008 |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | 30 | Behera vd.,2019 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 35 | Bisht vd., 2013 |
| <i>Bacillus</i> sp. suşu VITL8 | 37 | Balaji vd.,2020 |
| <i>Pseudomonas gessardi</i> | 37 | Veerapagu vd., 2013 |
| <i>Bacillus</i> sp. | 40 | Larbidaouadi vd.2015 |
| <i>Geobacillus</i> sp. TW1'in lipazı | 40 | Li vd., 2005 |
| <i>Staphylococcus</i> sp. | 45 | Daoud vd.,2013 |
| <i>Staphylococcus</i> sp. LP12 suşu | 45 | Pogaku vd.,2010 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> HU380 suşu | 45 | Kojima vd., 2003 |
| <i>Bacillus</i> sp. LBN 2 | 50 | Bora, 2012 |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> JC | 55 | Jiang vd., 2009 |
| <i>Burkholderia</i> sp. | 55 | Liu vd., 2006 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> A7 | 55 | Tuysuz vd.,2019 |
| <i>Thermus thermophilus</i> | 60 | Dominguez vd.,2005 |
| <i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> | 60 | Masomian vd.,2013 |

Funguslar üzerine yapılan çalışmalarda ise *Aspergillus carneus* (Saxena et vd., 2003), *Aspergillus* sp. (Cihangir vd., 2004), *Mucor hiemalis* (Ülker vd., 2012), *Aspergillus niger* (Larbidaouadi vd., 2015), *Aspergillus niger* (El-Batal vd., 2016) ve *Aspergillus niger* (Bharathi vd., 2019) en yüksek lipaz üretim ortamı sıcaklığı 24-40° C arasında bulunmuştur.

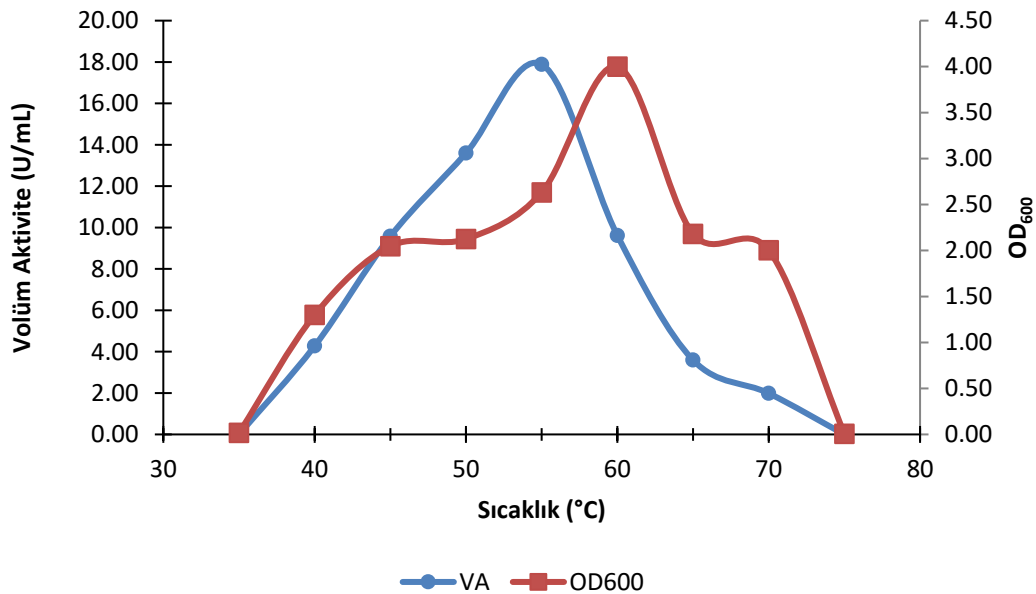
Tablo 14. Lipaz üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

| Sıcaklık (°C) | OD ₆₀₀ | x | Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.S.) | x |
|---------------|-------------------|---|----------------------------------------|---|
| 35 | 0.017 ± 0.003 | - | 0 | - |
| 40 | 1.300 ± 0.004 | b | 4.274 ± 0.484 | b |
| 45 | 2.047 ± 0.023 | b | 9.574 ± 0.887 | b |
| 50 | 2.125 ± 0.008 | b | 13.598 ± 3.087 | a |
| 55 | 2.632 ± 0.025 | b | 17.884 ± 0.024 | a |
| 60 | 4.000 ± 0.000 | a | 9.618 ± 0.272 | b |
| 65 | 2.181 ± 0.016 | b | 3.956 ± 0.186 | b |
| 70 | 2.003 ± 0.003 | b | 1.99 ± 0.102 | b |
| 75 | 0.007 ± 0.003 | - | 0 | - |

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S. : Standart sapma.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile en yüksek aktivite gösteren ortam arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05)



Şekil 8. İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

4.2.3. Karbon Kaynağının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

Üreme ortamında bulunan karbon kaynaklarının bakteri üreme ve lipaz enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla %0,1, %0,5 ve %1 final konsantrasyonlarında 15 farklı karbon kaynağı (ticari ve analitik saflıkta) kullanıldı. LB broth ortamı ve %0,5 g gum arabicli LB broth ortamı kontrol amacı ile kullanıldı.

Yağların etkisi organizmadan organizmaya değişir ve lipolitik enzim üretimini artırdıkları bilinmektedir. Denenen analitik saflıktaki yağlar içerisinde sadece bakteri gelişimi keten tohumu yağının %0,1 ve 0,5 konsantrasyonlarında azalma oldu. Diğer tüm yağların farklı konsantrasyonlarında ise bakteri gelişimi kontrole göre artmış olduğu görülmektedir (Tablo 15, Şekil 9).

Keten tohumu yağının %0,1 ve 0,5 konsantrasyonlarda bakteri gelişimine paralel olarak enzim üretimini de azalttığı görüldü. Sadece %1'lik konsantrasyonda enzim üretimi ve bakteri gelişimi bakımından kontrole aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi. Çalışmamıza benzer olarak *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 ile yapılan çalışmada da keten tohumu yağı bakteri gelişimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Bakır, 2016).

Triolein %0,1'lik konsantrasyonunda kontrole yakın bakteri gelişimi görülmüş fakat enzim üretimi yaklaşık %50 artış gösterdi. Trioleinin diğer yüksek konsantrasyonlarında ise enzim üretimi kontrole göre istatistiksel olarak farklı bulunmadı.

Badem, mısır ve pamuk yağlarının sadece %0,5'lik konsantrasyonunda enzim üretimi kontrole göre yaklaşık olarak 1,75-2,21 katlık artış sağladığı ve bu konsantrasyondaki enzim üretimi kontrole göre istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu. Diğer konsantrasyonlardaki enzim üretimi ise kontrole göre istatistiksel olarak aralarındaki fark önemsiz bulundu.

Soya yağının denenen tüm konsantrasyonlarında enzim üretimi çok azda olsa artış göstermiş olmasına rağmen kontrole göre aralarındaki istatistiksel fark önemsiz bulundu.

Zeytinyağı denenen tüm konsantrasyonlarında enzim üretimini yaklaşık olarak 2,05-2,76 kat artırdığı görüldü. Tüm konsantrasyonlardaki enzim üretimi ise kontrole göre istatistiksel olarak aralarındaki fark önemli bulundu. Analitik saflıktaki yağların arasında lipaz üretiminde en etkili olan kaynak %0,5 zeytinyağı (22,824 U/mL) olarak saptandı (Tablo 15, Şekil 9).

Ticari yağlar ile yapılan denemelerde ayçiçek, fındık, mısır, pamuk yağlarının ve peynir altı suyunun tüm konsantrasyonlarında enzim üretimi kontrole göre yaklaşık olarak

1,50-2,40 katlık artış sağladı ve enzim üretimi kontrole göre istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu. Peynir altı suyu tüm konsantrasyonlarında bakteri gelişiminde kontrole benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Zeytinyağı denenen tüm konsantrasyonlarında enzim üretimini yaklaşık olarak 1,50-3,32 kat artırdığı görüldü. Tüm konsantrasyonlardaki enzim üretimi, kontrole göre istatistiksel olarak aralarındaki fark önemli bulundu. Analitik saflıktaki yağlarda olduğu gibi ticari yağların arasında da lipaz üretiminde en etkili olan karbon kaynağı %0,5 zeytinyağı olarak saptandı. Böylece lipaz üretimi için en iyi indükleyici olarak zeytinyağı (27,246 U/mL) seçildi (Tablo 16- Şekil 10). Denenen tüm yağlar içerisinde ticari zeytinyağının ucuz olması nedeniyle lipaz üretiminin optimizasyonunda karbon kaynağı olarak kullanıldı.

Çalışmamızda kullandığımız ticari yağların genel anlamda enzim üretimini artırdıkları görüldü. Denenen ticari yağlar içerisinde sadece zeytin atık suyu (2'li faz) %1,5 ve zeytin atık suyu (3'lü faz) %1 ve %1,5 konsantrasyonlarda bakteri gelişimini inhibe etti. Zeytin atık suyunun bileşiminde bulunan farklı organik moleküllerin enzim üretimi ve bakteri gelişimini inhibisyonuna neden olmuş olabilir. Zeytinyağı üretim atıksuları, su (%83-92), organik madde (%4-16) ve mineral tuzlardan (%1-2) oluşan kötü kokulu asidik atıksulardır. Organik madde; şekerler, azotlu bileşikler, yağ asitleri, polialkoller, polifenoller, pektin ve yağlardan oluşmaktadır. Zeytin atık suyunda enzim üretiminde 2'li fazda %1'lik derişimde kademeli artış gözleendiği için %1,5'lik konsantrasyonda denenmiştir ancak bu derişimde bakteri gelişimi gözlenmemiştir. Diğer tüm yağların farklı konsantrasyonlarında ise bakteri gelişimi kontrole göre artmış olduğu görülmektedir (Tablo 16, Şekil 10).

Ticari yağlar arasında geleneksel üretim zeytinyağından sonra enzim aktivitesini en fazla artıran zeytin atık suyu 2'li faz %1 (17,682 U/mL) ve pamuk yağı %0,5'lik (17,550 U/mL) konsantrasyonlarıdır. Zeytin atık suyu 2'li faz %1,5 dışındaki tüm konsantrasyonlarında enzim üretimini yaklaşık olarak 1,86-2,41 kat artırdığı görüldü. Zeytin atık suyu 2'li faz %1,5 dışındaki tüm konsantrasyonlardaki enzim üretimi ise kontrole göre istatistiksel olarak aralarındaki fark önemli bulundu. Zeytin atık suyu 3'lü fazda bakteri gelişimi gözlenen %0,1 ve 0,5'lik konsantrasyonlarında enzim üretimini sırasıyla yaklaşık 1,51 ve 1,99 kat artırdığı gözleendi. Zeytin atık suları çevreye zarar veren kirlilik yönü düşünülüğünde enzim üretimini arttıran karbon kaynağı olarak kullanımının mümkün olabileceğini düşünmekteyiz.

Yağlar genel olarak lipolitik enzim üretimini artırmaktadır. Zeytinyağı, lipaz üretimi için en çok kullanılan substrattır çünkü sadece lipaz üretimi için bir indükleyici olarak değil, aynı zamanda mikroorganizmanın büyümesi için karbon kaynağı olarak da görev yaptığı belirtilmiştir (Kumar vd., 2016). Genellikle indükleyicisi olarak yağ, trigliseritler, yağ asitleri, aralar, safra tuzları ve gliserol gibi lipid kaynaklarının varlığını gerektirir.

Bizim çalışmamıza benzer olarak *Aspergillus niger* ve *Bacillus coagulans*'in sadece zeytinyağı varlığında en yüksek lipaz verimini ürettiği de gösterilmiştir (Prasad vd., 2011). *Pseudomonas aeruginosa* 'dan lipaz üretiminin araştırılması için denenen karbon kaynakları arasından en uygun kaynak zeytinyağı olarak bulunmuştur. Lipaz üreten mikroorganizmanın izolasyonu için yağ içeren ortamın daha iyi bir ortam sağladığı rapor edilmiştir. Kültür ortamında glikoz varlığının, zeytinyağına kıyasla lipaz üretimini baskıladığı da bildirilmiştir (Mobarak-Qamsari vd., 2011). *Pseudomonas aeruginosa*'dan lipaz üretimini tetikleyebilecek Tween20, Tween80, Zeytinyağı, glikoz ve früktoz gibi farklı karbon kaynakları kullanılmıştır. En yüksek lipaz aktivitesine sahip ortamlar sırasıyla zeytinyağı, Tween 80, Tween 20, früktoz ve glikoz olarak bulunmuştur (Ilesanmi vd., 2020). *Bacillus sp.* ile yapılan çalışmada karbon kaynağı olarak zeytinyağı, hindistancevizi yağı, hint yağı, yer fıstığı yağı, hurma yağı ve ayçiçek yağı gibi farklı yağlar kullanılmıştır. En yüksek lipaz üretimi sırasıyla zeytinyağı, ayçiçek yağı, yer fıstığı yağı, hint yağı, hindistan cevizi yağı ve hurma yağında elde edilmiştir (Balaji vd., 2020). *Exiguobacterium sp.* BBXS-7 ile yapılan çalışmada enzim aktivitesini en çok artıran karbon kaynağı zeytinyağı bulunmuştur (Ali, 2015). *Bacillus coagulans* ile yapılan çalışmada kaynak zeytinyağıdır (Alkan, 2007). *Anoxybacillus flavithermus* ile yapılan çalışmada en iyi lipaz üretimi %0,5 zeytinyağı içeren besi ortamında gerçekleşmiştir. Bunu %0,1 triolein içeren ortam izlemektedir (Bakır, 2017). *Bacillus licheniformis* lipaz aktivitesini en fazla artıran karbon kaynağı olarak zeytinyağı kullanılmıştır (Sahoo vd., 2018). *Anoxybacillus* tarafından üretilen lipazın araştırıldığı 2020 yılındaki çalışmasında da kaynak zeytinyağıdır (Sahoo vd., 2020). *Geobacillus thermoleovorans* tarafından termostabil lipaz üretiminin optimizasyonunu araştıran çalışmada en uygun kaynak olarak zeytinyağı bildirilmiştir (Abdel-Fattah, 2002).

Bizim çalışmamızdan farklı olarak *Aspergillus carneus* tarafından lipaz üretimini artırmak için ortam bileşenlerinin ve büyüme koşullarının optimizasyonunun araştırıldığı Kaushik tarafından yapılan çalışmada glikoz optimum karbon kaynağı olarak bulunmuştur (Kaushik vd., 2006). Balaji'nin çalışmasında karbon kaynakları olarak şekerlerin lipaz üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Glikoz en yüksek lipaz üretimiyle en iyi karbon kaynağı olarak

bulunmuş, bunu sükröz ve fruktoz izlemiştir. Öte yandan, nişasta, mannoz ve galaktoz, daha düşük lipaz üretimiyle sonuçlanmıştır (Balaji vd., 2020). *Penicillium camembertii* Thom PG-3'ten lipazının optimizasyonu denemelerinde karbon kaynağı olarak en iyi aktiviteyi artıranların laktoz ve mannitol olduğunu bildirmişlerdir (Tan vd., 2004). *Bacillus thuringiensis* (TS11BP)'den en iyi lipaz üretimini için karbon kaynağını dextroz olarak saptamıştır (Duza ve Mastan, 2014). *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39'un lipaz üretiminde en iyi karbon kaynağı olarak sukrozu saptamışlardır (Mazhar vd., 2017). *Bacillus coagulans* BTS-3 lipazı ile yapılan çalışmada maximum enzim aktivitesinin mısır yağı içeren ortamda elde edildiği, rafine hardal yağının takip ettiği bildirilmiştir (Kumar vd., 2005). *Bacillus* sp.'den lipaz üretiminde en iyi lipolitik aktiviteyi triolein içeren ortamda elde etmişlerdir (Ertuğrul et al., 2007). *Fusarium solani*'den en iyi lipolitik aktiviteyi susam yağı ve triolein içeren ortamda saptamışlardır (Maia vd., 2001). *Aeromonas veronii* ile yapılan çalışmada lipaz enziminin optimizasyonu ve karakterizasyonu isimli çalışmada en uygun karbon kaynağı olarak %1 hindistan cevizi yağı belirlenmiştir. (Öztürk vd.,2019)

Lipaz aktivitesi için ana faktör karbon olmuştur çünkü lipazlar indüklenebilir enzimlerdir. Bu nedenle genel olarak yağ gibi bir lipid kaynağının veya triaçilgliseroller, yağ asitleri, esterler, safra tuzları ve gliserol gibi başka bir indükleyici varlığında üretilirler. Bununla birlikte üretim şekerler, polisakkaritler, peynir altı suyu ve diğer karmaşık kaynaklar gibi karbon kaynaklarından önemli ölçüde etkilenirler (Lotti vd.,1998).

Enzim üretim seviyesi, lipid karbon substratlarının varlığında önemli ölçüde artmıştır ve bu tür bileşikler üzerinde büyüme sırasında hücreye bir yağ asidi karbon kaynağı sağlamak için anahtar mekanizmayı temsil eder. Enzim üretimi muhtemelen yağ asidi esterleri tarafından indüklenir, çünkü glikoz gibi lipid olmayan substratlarla göre enzim seviyesinde önemli bir artışa yol açan etkili indükleyicidirler.

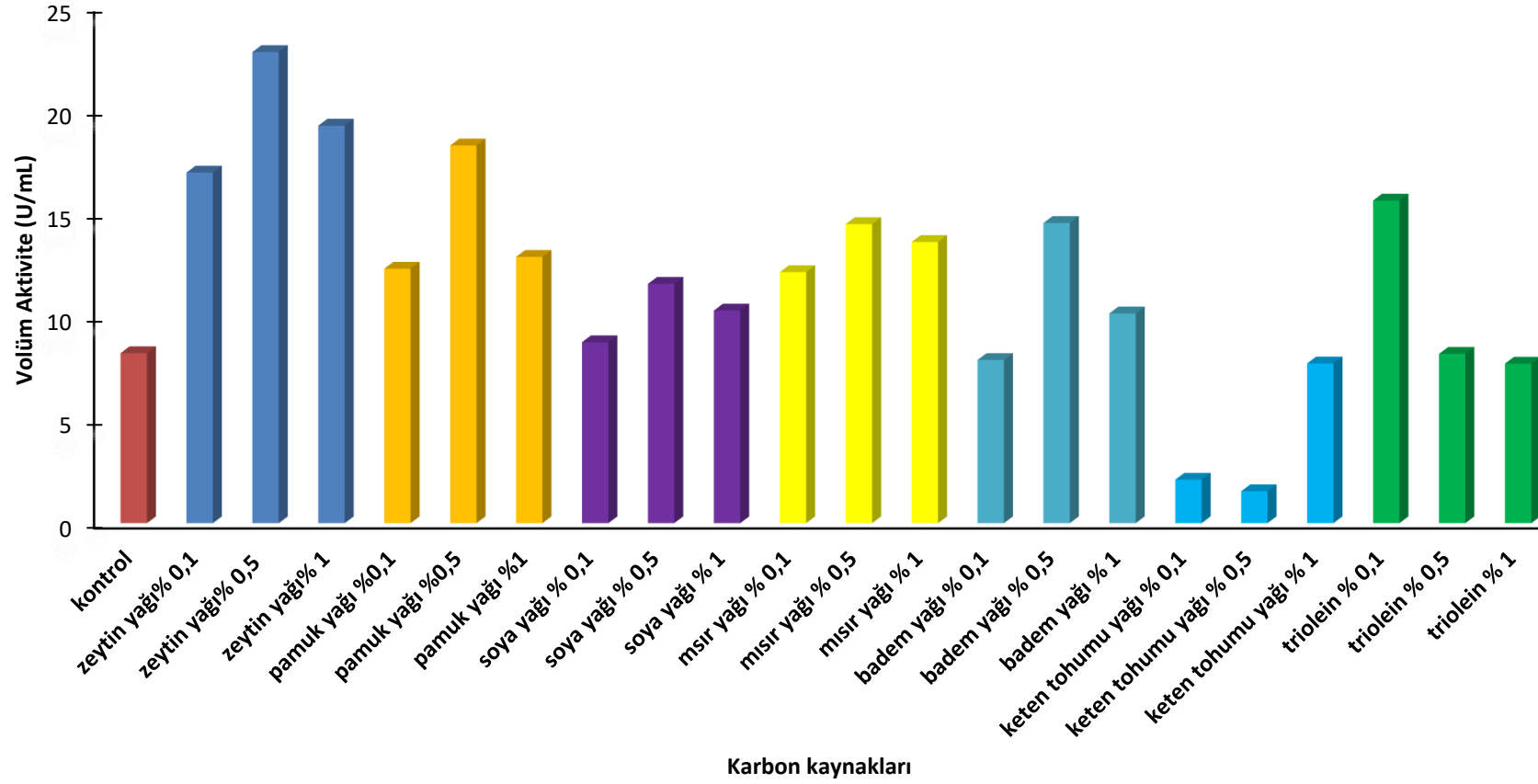
Tablo 15. Çeşitli Karbon Kaynaklarının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

| Yağlar | OD ₆₀₀ | Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.) | x |
|------------------------|-------------------|----------------------------------------|---|
| Kontrol | 1,571 | 8,274 ± 0,900 | a |
| Badem yağı %0,1 | 1,945 | 7,944 ± 0,804 | a |
| Badem yağı %0,5 | 2,039 | 14,562 ± 0,183 | b |
| Badem yağı %1 | 2,010 | 10,194 ± 0,387 | a |
| Keten tohumu yağı %0,1 | 1,189 | 2,124 ± 0,737 | a |
| Keten tohumu yağı %0,5 | 1,351 | 1,560 ± 0,161 | a |
| Keten tohumu yağı %1 | 1,564 | 7,776 ± 0,686 | a |
| Mısır yağı %0,1 | 2,135 | 13,644 ± 0,126 | a |
| Mısır yağı %0,5 | 2,157 | 14,508 ± 0,383 | b |
| Mısır yağı %1 | 2,214 | 12,186 ± 0,793 | a |
| Pamuk yağı %0,1 | 2,901 | 12,354 ± 0,091 | a |
| Pamuk yağı %0,5 | 2,900 | 18,306 ± 1,060 | b |
| Pamuk yağı %1 | 2,197 | 12,924 ± 0,130 | a |
| Soya yağı %0,1 | 2,515 | 8,802 ± 0,144 | a |
| Soya yağı %0,5 | 2,033 | 11,622 ± 0,085 | a |
| Soya yağı %1 | 2,181 | 10,332 ± 0,599 | a |
| Triolein %0,1 | 1,574 | 15,048 ± 0,653 | b |
| Triolein %0,5 | 2,008 | 8,238 ± 0,306 | a |
| Triolein %1 | 1,597 | 7,764 ± 0,146 | a |
| Zeytin yağı %0,10 | 2,002 | 16,998 ± 0,181 | b |
| Zeytin yağı %0,50 | 2,039 | 22,824 ± 0,656 | b |
| Zeytin yağı %1 | 2,121 | 19,266 ± 0,721 | b |

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 9. Lipaz üretimi üzerine çeşitli karbon kaynaklarının etkisi

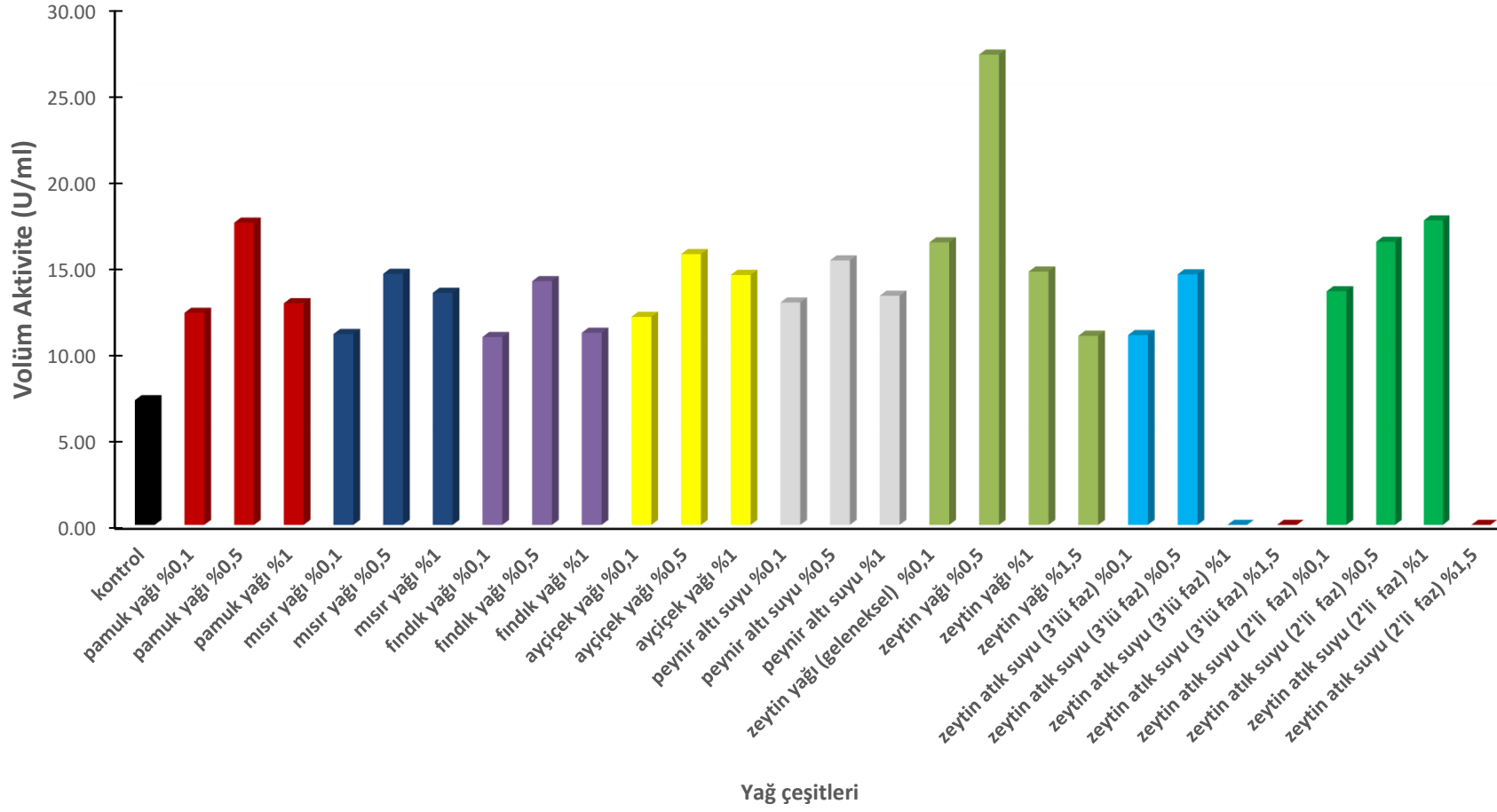
Tablo 16. Çeşitli Ticari Yağların Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

| Yağlar | OD ₆₀₀ | Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.S.) | x |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------------------|---|
| Kontrol | 1,570 | 7,314 ± 0,07 | a |
| Ayçiçek yağı %0,1 | 2,000 | 12,120 ± 0,027 | b |
| Ayçiçek yağı %0,5 | 2,070 | 15,738 ± 0,021 | b |
| Ayçiçek yağı %1 | 2,100 | 14,538 ± 0,075 | b |
| Fındık yağı %0,1 | 1,795 | 10,956 ± 0,128 | b |
| Fındık yağı %0,5 | 1,810 | 14,178 ± 0,126 | b |
| Fındık yağı %1 | 1,871 | 11,202 ± 0,055 | b |
| Mısır yağı %0,1 | 2,135 | 11,130 ± 0,041 | b |
| Mısır yağı %0,5 | 2,157 | 14,604 ± 0,027 | b |
| Mısır yağı %1 | 2,214 | 13,506 ± 0,021 | b |
| Pamuk yağı %0,1 | 2,001 | 12,354 ± 0,091 | b |
| Pamuk yağı %0,5 | 2,039 | 17,550 ± 0,141 | b |
| Pamuk yağı %1 | 2,100 | 12,906 ± 0,147 | b |
| Peynir altı suyu %0,1 | 1,574 | 12,948 ± 0,027 | b |
| Peynir altı suyu %0,5 | 1,576 | 15,378 ± 0,055 | b |
| Peynir altı suyu %1 | 1,580 | 13,338 ± 1,075 | b |
| Zeytin atık suyu (2'li faz) %0,1 | 1,117 | 13,596 ± 0,092 | b |
| Zeytin atık suyu (2'li faz) %0,5 | 1,547 | 16,446 ± 0,027 | b |
| Zeytin atık suyu (2'li faz) %1 | 2,010 | 17,682 ± 0,075 | b |
| Zeytin atık suyu (2'li faz) %1,5 | 0 | 0 | - |
| Zeytin atık suyu (3'lü faz) %0,1 | 1,691 | 11,070 ± 0,036 | b |
| Zeytin atık suyu (3'lü faz) %0,5 | 1,700 | 14,574 ± 0,116 | b |
| Zeytin atık suyu (3'lü faz) %1 | 0 | 0 | - |
| Zeytin atık suyu (3'lü faz) %1,5 | 0 | 0 | - |
| Zeytin yağı (geleneksel) %0,1 | 2,002 | 16,416 ± 0,048 | b |
| Zeytin yağı (geleneksel) %0,5 | 2,100 | 27,246 ± 0,110 | b |
| Zeytin yağı (geleneksel) %1 | 2,111 | 14,730 ± 0,145 | b |
| Zeytin yağı (geleneksel) %1,5 | 2,115 | 11,028 ± 0,045 | b |

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S.: Standart sapma.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05)



Şekil 10. Lipaz üretimi üzerine çeşitli yağların etkisi

4.2.4. Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimi Üzerine Etkisi

Çalışmamızda enzim üretimini optimize etmek için çeşitli azot kaynaklarının etkisini araştırmak için LB ortamındaki yeast ekstrakt ve tripton çıkarıldı, bunların yerine çeşitli organik ve inorganik azot kaynaklarından %0,5, 1 ve 1,5 oranında eklenerek değerlendirildi.

Denenen inorganik azot kaynaklarının (üre, amonyum sülfat, amonyum nitrat) bakteri gelişimini artırdığı fakat enzim üretimini aynı oranda artıramadığı gözlemlendi.

Organik azot kaynakları inorganik azot kaynaklarına göre daha zengin bir içeriğe sahiptir. Denenen organik azot kaynaklarından enzim üretimi pepton %0,5 ve Tripton %1 hariç kontrolden düşük olarak saptandı. Enzim miktarını en çok artıran azot kaynağı diğer çalışmaların benzer olarak %0,5 pepton (12,978 U/mL) bulundu (Tablo 17, Şekil 11). Yeast ekstrakt %0,5'lik derişimi ile (11,646 U/mL), %1'lik derişimi (11,268 U/mL) ve Tripton %1 (12,126 U/mL) içeren örneklerin kontrole yakın sonuçlar verdiği görüldü.

Denenen organik ve inorganik azot kaynakları arasında pepton %0,5'lik konsantrasyonu ile maximum enzim üretimi sağlayan azot kaynağı olarak saptanmıştır. Bu etkinin sebebi, NH_4^+ iyonlarının peptondan salınması ve düşük konsantrasyonda proteaz inhibe edici özelliğinden dolayı büyümeyi uyarıcı ve aynı zamanda enzim verimini arttırmıştır. Azot kaynakları tüm enzimlerin sentezlenmesinde önemli bir role sahiptir. Çünkü hücre metabolizması ve enzim sentezi için gerekli olan pek çok hücre büyüme faktörleri ve amino asitleri organik azot kaynakları sağlamaktadır. İnorganik azot kaynakları ise kaynakları hızlı bir şekilde kullanır. Bu nedenle hem organik hem de inorganik kaynaklar lipaz üretiminde kullanılmaktadırlar (Tan vd., 2004).

Bizim çalışmamıza benzer olarak *Bacillus sp* ile yapılan çalışmada test edilen farklı nitrojen kaynakları arasında, peptonun 20 U/ml'lik bir üretimle test edilen tüm nitrojen kaynakları arasında en iyisi olduğu bulunmuştur (Bora, 2012). *Fusarium globulosum* ile yapılan çalışmada peptonun lipaz üretimi için en iyi azotlu kaynak olduğu bulunmuştur (Gulati vd., 2005). Lipolitik bir bakteri olan *Staphylococcus sps.* L2 izolatu ile yapılan çalışmada benzer şekilde için en iyi azot kaynağı olarak peptonu bildirmişlerdir (Sirisha vd., 2010). *B. subtilis* PCSIRNL-39'un lipaz üretiminde en iyi azot kaynağı olarak pepton saptanmıştır (Mazhar vd., 2017). *Aspergillus sp.* ile yapılan çalışmada en iyi azot kaynağı % 1'lik pepton saptanmıştır (Cihangir vd., 2004). *Pseudomonas aeruginosa* KM110 ile yapılan çalışmada Nitrojen kaynağı olarak pepton, maya özütü, amonyum dihidrojen fosfat gibi

maddeler kullanılmıştır. Kullanılan farklı nitrojen kaynakları arasında en uygun kaynak pepton olarak bulunmuştur. Amonyum klorür ve amonyum dihidrojen fosfat gibi inorganik azot kaynaklarının da bazı mikroorganizmalarda etkili olduğu bildirilmiştir (Mobarak-Qamsari vd., 2011). *Bacillus* sp. tarafından lipaz üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Test edilen farklı nitrojen kaynakları arasından, pepton ile bazal ortamda üretime kıyasla maksimal lipaz üretimi elde edilmiştir. Sonrasında da amonyum nitrat ve amonyum klorür gibi organik nitrojen kaynaklarının daha yüksek lipaz üretimine sahip olduğu bulunmuştur (Balaji vd., 2020). *Anoxybacillus flavithermus*'ten lipaz üretimini artıran en iyi azot kaynağı olarak pepton % 0,5 saptamışlardır (Bakır,2016).

Bizim çalışmamızdan farklı olarak *Penicillium camembertii* Thom PG-3'ten lipaz üretiminde yağı alınmış soyanın en iyi nitrojen kaynağı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca NH_4^+ veya NO_3^- formundaki inorganik azot kaynaklarının lipaz üretimini artırırken, üre gibi inorganik kaynakların lipaz sentezini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Tan vd., 2004). *Aeromonas veronii* ile yapılan çalışmada lipaz enziminin optimizasyonu ve karakterizasyonu isimli çalışmada en uygun organik azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve inorganik azot kaynağı olarak jelatin bildirilmiştir (Öztürk vd.,2019). *A. Veronii* lipazı için kültür koşulları optimize edildiğinde en iyi azot kaynağının jelatin olduğunu bildirmişlerdir (Kamaladevi vd., 2014). *Aspergillus tamarii* JGIF06'dan maksimum lipaz üretimini sağlamak için inorganik azot kaynağı olarak amonyum klorür ve amonyum sülfat olduğunu belirtmişlerdir (Das vd., 2017). Literatürdeki diğer çalışmalarda en iyi azot kaynakları olarak *Acinetobacter radioresistens*'den lipaz üretiminde en iyi azot kaynağı olarak % 0,75'lik yeast ekstrakt kullanılmıştır (C.-Y. Li vd., 2004). *Bacillus coagulans* BTS-3'den lipaz üretiminde en iyi azot kaynağı olarak % 0,5 pepton ve % 0,5 yeast ekstrakt bildirilmiştir (Kumar vd., 2005). *S. aereus*'un lipaz üretiminde en iyi azot kaynağı olarak maya özütü kullandıklarını belirtmişlerdir (Ben Bacha vd., 2016). *Pseudomonas aeruginosa* üretim ortamında lipaz üretimini etkileyebilecekleri için maya özütü, pepton, kazein, amonyum nitrat ve potasyum nitrat gibi farklı türlerden nitrojen kaynakları kullanılmıştır. Maya ekstraktı, amonyum nitrat, pepton, kazein için sırasıyla lipaz aktivitesi kaydedilirken, nitrojen kaynağı olarak potasyum nitrat içeren ortamda hiçbir aktivite tespit edilememiştir (Ilesanmi vd., 2020). *P. Putida* ile yapılan çalışmada maksimum lipaz üretimini sağlamak için azot kaynağı olarak pepton ve maya ekstraktı kullandıklarını bildirmişlerdir (Fatima vd., 2015). *P. aeruginosa* ile yapılan çalışmada, amonyum sülfatın lipaz üretimini artırdığını, diğer tüm inorganik azot kaynaklarının lipaz üretimini azalttığı rapor edilmiştir (Bisht vd., 2013).

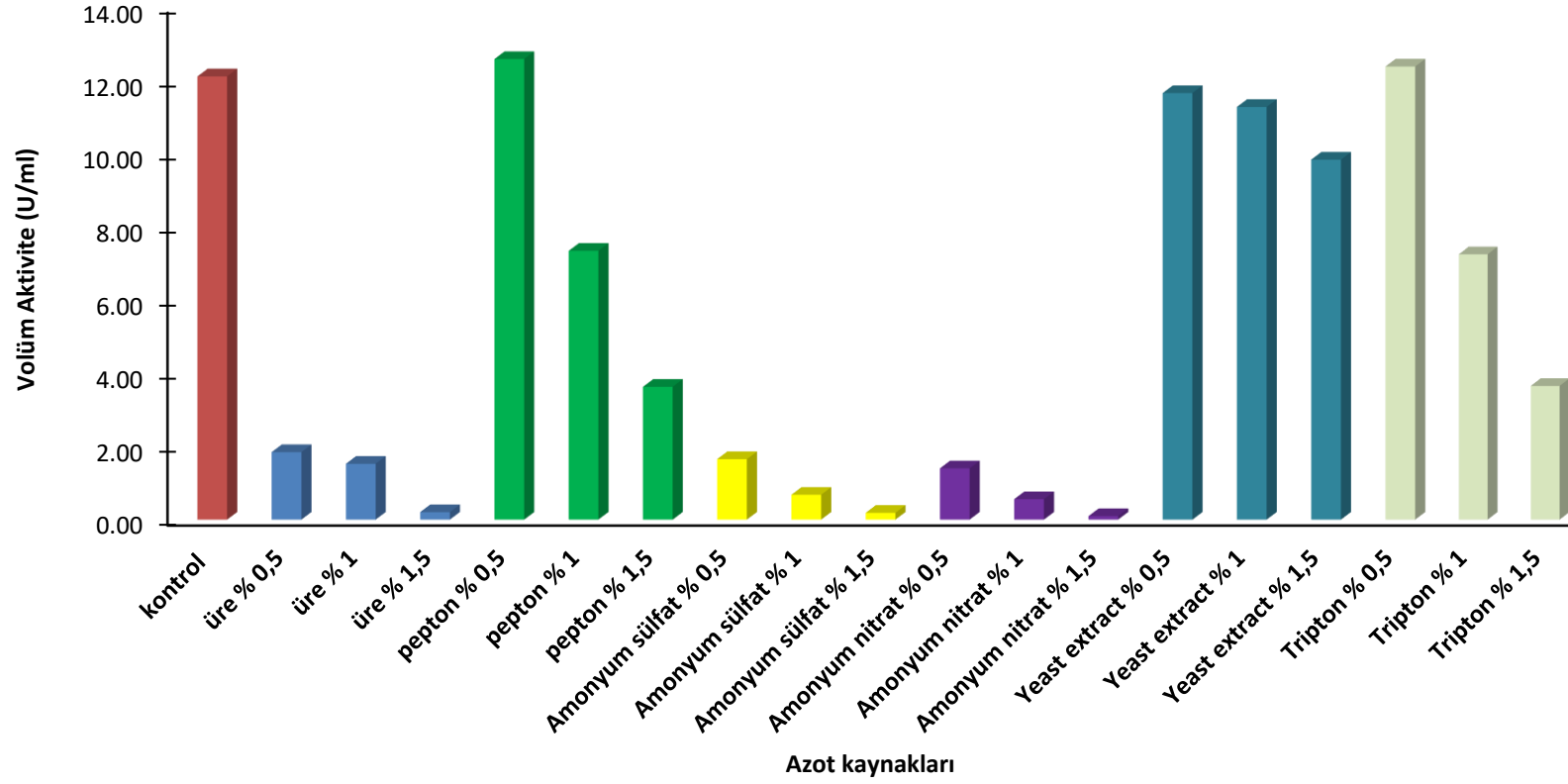
Tablo 17. Çeşitli azot kaynaklarının lipaz üretimi üzerine etkisi

| Azot kaynakları | OD ₆₀₀ | Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.S.) | x |
|----------------------------|-------------------|----------------------------------------|---|
| Kontrol | 1,437 | 12,102 ± 0,045 | a |
| Amonyum nitrat %0,5 | 2,158 | 1,398 ± 0,055 | b |
| Amonyum nitrat %1 | 2,262 | 0,558 ± 0,036 | b |
| Amonyum nitrat %1,5 | 2,354 | 0,096 ± 0,028 | b |
| Amonyum sülfat %0,5 | 2,085 | 1,650 ± 0,075 | b |
| Amonyum sülfat %1 | 2,321 | 0,678 ± 0,045 | b |
| Amonyum sülfat %1,5 | 2,340 | 0,186 ± 0,028 | b |
| Pepton %0,5 | 1,832 | 12,978 ± 0,073 | a |
| Pepton %1 | 1,537 | 9,324 ± 0,045 | b |
| Pepton %1,5 | 0,910 | 3,624 ± 0,073 | b |
| Tripton %0,5 | 1,544 | 7,506 ± 0,045 | b |
| Tripton %1 | 1,501 | 12,126 ± 0,045 | a |
| Tripton %1,5 | 1,543 | 3,648 ± 0,037 | b |
| Üre %0,5 | 2,037 | 1,842 ± 0,045 | b |
| Üre %1 | 2,120 | 1,524 ± 0,045 | b |
| Üre %1,5 | 2,058 | 0,204 ± 0,058 | b |
| Yeast extract %0,5 | 1,533 | 11,646 ± 0,126 | a |
| Yeast extract %1 | 1,487 | 11,268 ± 0,154 | a |
| Yeast extract %1,5 | 1,510 | 9,828 ± 0,082 | b |

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S: Standart sapma.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 11. Çeşitli azot kaynaklarının lipaz üretimi üzerine etkisi

4.2.5. HBB 180'nin zamana bağılı değişimi ve lipaz üretimi

Anoxybacillus kaynarcensis HBB 180 bakterisi ile ilk çalışmaya başlandığında temel besi ortamındaki zamana bağılı gelişimi ve enzim üretimini saptamak için 24 saatlik inkübasyon yapıldı. İnkübasyon süresince 3'er saatlik aralıklarla örnekler alınarak hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) ve lipaz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Alınan ölçümler sonucunda bakteri gelişiminin 3.saatten itibaren başlayarak artarak 9.saate kadar log fazında olduğu görüldü. 9.saatten sonra durgunluk fazına geçerek 15.saatte (9,272 U/ml) maksimum değere ulaştığı gözlendi (Tablo 18, Şekil 12). 18. saatte aktivitede bir düşüş gözlendi. Aktivitedeki bu düşüşün ortamdaki proteazların aktivitesinin yol açtığı düşünölmektedir. 21. Saatten itibaren aktivitede bir artış gözlenmiş fakat değerler arası fark istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır. Hücrelerin lizise uğraması sonucu hücre içi enzimin bir kısmının dışarı salınması sebebiyle aktivitede artış görölmüştür. Çalışmamıza benzer olarak *Bacillus circulans* MAS2 ile yapılan hücre içi esterazının araştırıldığı çalışmada bildirilmiştir. MAS2 esterazının aktivitesi, 10 saat boyunca hücre gelişimine bağılı olarak artmış ve inkübasyon süresi uzadıkça hücre lizisine bağılı olarak hücre dışı enzim aktivitesinde artış görölmüştür (Kademi vd.,1999). HBB 180 suşu optimum koşullar belirlendikten sonra bu ortamda (pH 6,50, sıcaklık 55 °C, azot kaynağı %0,5 pepton, karbon kaynağı %0,5 zeytinyağı) zamana bağılı gelişimlerinin log fazının başlarında başlayıp, ortasında enzim aktivitesinin 12.saatte (15,886 U/ml) maksimum değere ulaştığı ve daha sonra gerilemeye başladığı saptandı (Tablo 19, Şekil 12).

Anoxybacillus kaynarcensis HBB 180 lipazının başlangıç ve optimum koşullar arasında 12. saatteki enzim üretim miktarları kıyaslandığında 2,56 kat artırdığı saptandı. HBB 180 suşunun başlangıç (15.saat) ve optimum koşullardaki (12.saat) maximum üretim yaptıkları saatlerdeki üretim miktarları kıyaslandığında, optimum koşulların enzim üretim miktarını 1,71 kat artırdığı saptandı.

Bizim çalışmamıza benzer olarak yağlı atıklarla kirlenmiş topraktan lipaz üretimi yapan bakterilerin araştırıldığı çalışmada toprakta belirgin lipaz aktivitesi izlenmiş ve optimal inkübasyon süresi için en yüksek aktivite 12 saatte izlenmiştir (İlesanmi vd., 2020). *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 suşu optimum koşullarda geliştirildiğinde enzim üretiminin 12. saatte maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır. (Bakır, 2017)

İnkübasyon sürelerinin karşılaştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Balaji'nin çalışmasında *Bacillus* lipazının zeytinyağında 28 saat inkübasyonda üretildiğini göstermiştir. Zeytinyağı konsantrasyonu ve zamanındaki artış enzim üretimini olumsuz etkilemiştir (Balaji et al.,

2020). Hasan ve arkadaşlarının çalışmalarında 48 saat inkübasyondan sonra *Bacillus*'tan elde edilen kültür süpernatantının maksimum lipaz aktivitesi gösterdiğini, *Bacillus* lipazının 24 saatlik inkübasyonda maksimum lipaz üretiminin olduğunu gözlemlemişlerdir (Hasan vd., 2006; Mohan vd., 2008). Hücre büyümesi ve lipaz aktivitesi için en uygun verimi 67. saat'te almışlardır (Liu vd., 2006). *Aeromonas* sp. EBB-1 ile yaptıkları çalışmada maksimum lipaz aktivitesi için gerekli inkübasyon süresini 15 saat olarak rapor etmişlerdir (Charoenpanich vd., 2011).

Liu ve arkadaşlarının çalışmasında optimal koşullar oluşturulduğunda üretkenlikte 5 kat artış olduğunu göstermiştir (Liu vd., 2006). Chauhan'ın 2013 yılındaki çalışmasında ise *Staphylococcus arlettae*'den lipaz üretiminde optimizasyonun yaklaşık 1.8 kat daha yüksek lipaz verimini iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir (Chauhan vd., 2013). Sharma'nın çalışmasında *Arthrobacter* tarafından lipaz üretimi için fiziksel parametrelerin optimizasyonu sonrasında lipaz aktivitesinde 1.6 katlık bir artış ortaya koymuşlardır (Sharma vd., 2009). Bu nedenle literatürden, ortam bileşenlerinin optimizasyonu ile lipaz aktivitesinde daha fazla artışın mümkün olduğu söylenebilir. *Aeromonas veronii* ile yapılan çalışmada lipaz enziminin optimizasyonu ve karakterizasyonu isimli çalışmada maksimum lipaz üretimi sağlamak için inkübasyon süresini 18 saat olarak belirlemiştir (Öztürk vd.,2019).

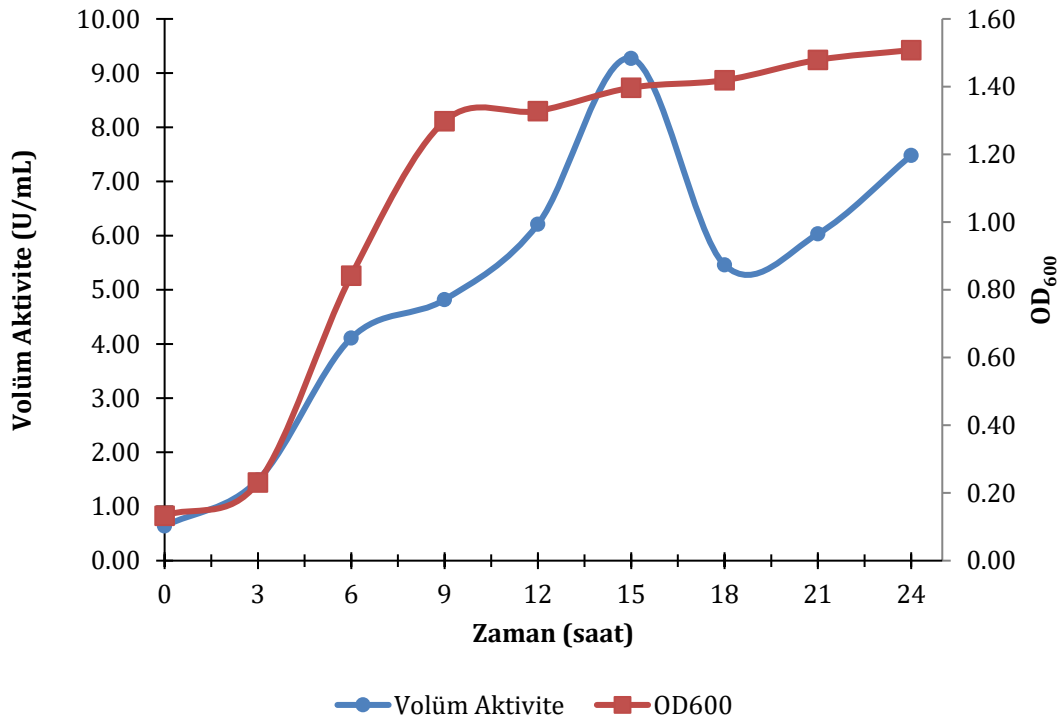
Tablo 18. Büyüme eğrisi (başlangıçta)

| Zaman | OD ₆₀₀ | Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.S.) | X |
|---------|-------------------|----------------------------------------|---|
| 0 saat | 0,133 ± 0,001 | 0,640 ± 0,060 | b |
| 3 saat | 0,231 ± 0,016 | 1,488 ± 0,071 | b |
| 6 saat | 0,842 ± 0,032 | 4,110 ± 0,364 | b |
| 9 saat | 1,298 ± 0,026 | 4,818 ± 0,243 | b |
| 12 saat | 1,328 ± 0,034 | 6,210 ± 0,724 | b |
| 15 saat | 1,397 ± 0,006 | 9,272 ± 0,247 | a |
| 18 saat | 1,419 ± 0,009 | 5,338 ± 0,194 | b |
| 21 saat | 1,479 ± 0,012 | 6,032 ± 0,337 | b |
| 24 saat | 1,508 ± 0,008 | 7,480 ± 0,124 | b |

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S.: Standart sapma.

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



Şekil 12. Büyüme eğrisi (başlangıçta)

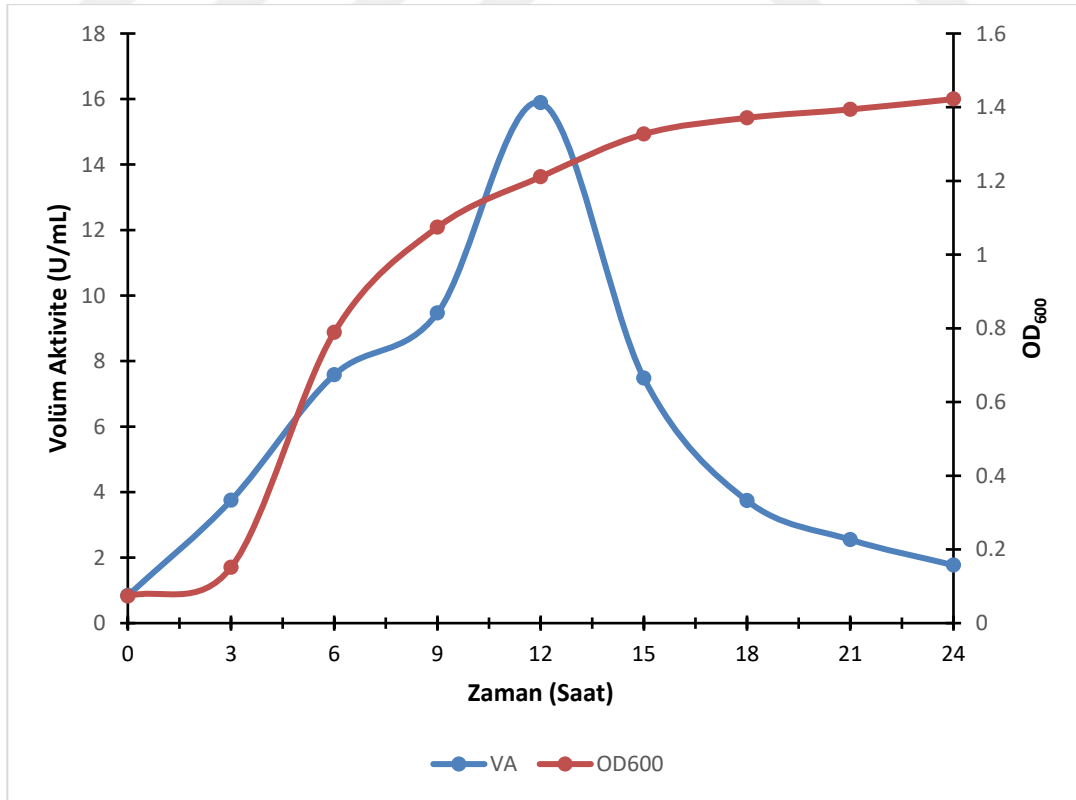
Tablo 19. Büyüme eğrisi (optimum koşullarda)

| Zaman | OD ₆₀₀ | Volüm Aktivite (U/mL) | X |
|---------|-------------------|-----------------------|---|
| 0 saat | 0,073 ± 0,001 | 0,842 ± 0,024 | b |
| 3 saat | 0,151 ± 0,002 | 3,748 ± 0,018 | b |
| 6 saat | 0,789 ± 0,002 | 7,580 ± 0,031 | b |
| 9 saat | 1,074 ± 0,003 | 9,466 ± 0,003 | b |
| 12 saat | 1,211 ± 0,005 | 15,886 ± 0,035 | a |
| 15 saat | 1,327 ± 0,007 | 7,476 ± 0,006 | b |
| 18 saat | 1,371 ± 0,003 | 3,736 ± 0,073 | b |
| 21 saat | 1,394 ± 0,006 | 2,548 ± 0,037 | b |
| 24 saat | 1,422 ± 0,002 | 1,770 ± 0,091 | b |

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S.: Standart hata.

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



Şekil 13. Büyüme eğrisi (optimum koşullarda)

4.2.6. Lipaz üretimi üzerine lipazın lokalizasyonu

HBB 180 suşunun optimum lipazın lokalizasyonunu bulmak için LB broth içeren tüpe stok kültürden inoküle edildi ve bir gece inkübe edildi. Gecelik kültürün absorbansı 600 nm’de 0,1 olacak şekilde ayarlandı. 1 L’lik erlene pH’ı 6,50 olan 200 mL enzim üretim ortamı % 1 oranında inoküle edildi. Kültür, 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 55 °C’de ve 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kültür ortamı santrifüjlendi. Santrifüj sonucunda süpernatant 1 (S1) ve pellet 1 (P1) elde edildi, her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü (Tablo 20). P1 de enzim aktivitesi yüksek, S1 de ise düşük bulundu. Enzimin hücre içi veya hücre zarında olacağı düşünülerek, P1 hücre fraksiyonu sonikasyon yoluyla parçandı. Homojenat tekrar santrifüjlenerek S2 ve P2 fraksiyonları elde edildi. Bu fraksiyonlarda da enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzim aktivitesi S2 de yüksek bulundu. Bu durum enzimin hücre içi bir enzim olduğunu göstermektedir. Parçalanmamış hücre fraksiyonunun enzim aktivitesi, hücre içi fraksiyonda çıkan aktivite değerlerine yakın çıkmıştır. Bunun sebebi substratın hidrolizlenmeden önce hücre duvarının içinden geçişiyle açıklanabilir. Bizim sonuçlarımıza benzer bulgular elde edilmiştir (Kademi vd., 1999; Kakariari vd., 2000).

Bizim çalışmamıza benzer olarak *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 lipazı hücre içi olarak bildirilmiştir (Bakır,2016). Bizim çalışmamızdan farklı olarak Halotolerant *Bacillus* sp. ile hücre dışı lipaz üretiminin optimizasyonu için Balaji’nin çalışmasında makro ve mikro besinlerin, karbon kaynağı, nitrojen kaynağı, indükleyici ve metal iyonlarının ve pH, çalkalanma oranının lipaz üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Balaji et al., 2020). *Bacillus* sp. lipazının hücre dışı olduğu belirtilmiştir (Bora,2012). *Bacillus coagulans* lipazının hücre dışı olduğu bildirildi (Alkan, 2017).

Tablo 20. Lipaz üretimi üzerine lipazın lokalizasyonu

| Volüm Aktivite (U/mL) | Volüm (U/mL) | Aktivite Volüm (U/mL) | Aktivite Volüm (U/mL) | Aktivite |
|--------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| S1 | P1 | S2 | P1 | |
| ORT.± S.S. | ORT.± S.S. | ORT.± S.S. | ORT.± S.S. | |
| 1.405 ± 0,08 | 4,554 ± 0,17 | 5,598 ± 0,29 | 1.658 ± 0.27 | |

S1; Hücre dışı fraksiyon, **P1;** Hücre fraksiyon, **S2;** Hücre içi fraksiyon,
P2; Membrana bağlı fraksiyon

4.3. *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB 180 Lipazının Karakterizasyonu

4.3.1. pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

pH enzim aktivitesini etkileyen önemli bir faktördür. Bu nedenle lipaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisini gözlemlemek için 5,50-10,00 arasında denemeler yapılmıştır. Enzim aktivitesi pH 5,50'den itibaren 0,5'er birim artmasıyla birlikte aktivite kademeli olarak artarak, pH 8,50'de (13,758 U/ml) maksimum değere ulaşmış daha sonra ise düşüşe geçmiştir (Tablo 22, Şekil 13). pH 8,00 ve pH 8,50'deki aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur. Diğer tüm pH'larda enzim aktivitesi optimuma göre istatistiksel olarak farklı olduğu bulundu. Enzim aktivitesinin pH 6,50 -10,00 aralığında optimum değerinin %50'nin fazla ve pH 7,50-9,00 aralığında optimum aktivitenin %80'inden fazla olduğu saptandı. Buna göre *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB 180 lipazının alkali karakterde bir enzim olduğunu göstermektedir. HBB 180 lipazının geniş bir pH aralığında çalışması ve alkali bir enzim olmasından dolayı özellikle deterjan endüstrisi gibi alanlarda kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Bakteriyel lipaz üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında genel olarak lipazların maksimum 7'den yüksek pH değerlerinde aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Gupta vd., 2004). Bizim çalışmamıza benzer olarak *Anoxybacillus* lipazının araştırıldığı çalışmada tüm değişkenler arasında, pH'ın diğer değişkenlerle önemli ölçüde etkileşimli olduğu bulunmuştur. Lipaz aktivitesi için en uygun pH değeri 8,20 olarak saptanmıştır (Sahoo vd., 2020). *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ten enzim maksimum lipaz üretim pH'ı 9,00 saptanmıştır (Bakır, 2016). *Anoxybacillus flavithermus* suşu için maksimum lipaz üretimi için optimum pH aralığı 6,50-8,00 olarak bulunmuştur (Chiş vd.,2013).

Lipaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi ile ilgili diğer türlerle yapılan çalışmalarda ise *Geobacillus* sp. TW1 (Li vd., 2005), *Serratia marcescens* ECU1010 suşu (L.-L. Zhao vd., 2008), *Geobacillus stearothermophilus* JC (Jiang vd., 2009), *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 suşu (Zhang vd., 2009). *Pseudomonas aeruginosa* KM110 (Mobarak-Qamsari vd., 2011), *Bacillus licheniformis* (Sahoo vd., 2018), *Pseudomonas aeruginosa* (Ilesanmi vd., 2020) en yüksek lipaz aktivitesi pH 7,50-11,00 arasında bulunmuştur. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar Tablo 21' de özetlenmiştir.

Tablo 21. Çeşitli bakteri türleri üzerine lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

| Türler | pH | Referanslar |
|----------------------------------------|-----------|----------------------------------|
| <i>Pseudomonas gessardii</i> | 3,50 | Ramani vd. [66] |
| <i>Enterococcus durans</i> NCIM5427 | 4,60 | Vrinda [97] |
| <i>Streptomyces</i> LP10 | 6,00 | Aly vd. [98] |
| <i>Geobacillus zalihae</i> sp. | 6,50 | Rahman vd. [92] |
| <i>Bacillus</i> THL027 | 7,00 | Dharmsthiti ve Luchai [91] |
| <i>Burkholderia multivorans</i> | 7,00 | Gupta ve ark. [94] |
| <i>Exiguobacterium</i> sp. BBXS-7 | 7,00 | Ali,2015 |
| <i>Salinivibrio</i> sp. SA-2 suşu | 7,50 | Amoozegar vd. [64] |
| <i>Burkholderia</i> sp. ZYB002 | 8,00 | Shu vd. [96] |
| <i>Burkholderia multivorans</i> V2 | 8,00 | Dandavate vd. [95] |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LP602 | 8,00 | Dharmsthiti ve Kuhasuntisuk [93] |
| <i>Bacillus koagulan</i> BTS-3 | 8,50 | Kumar vd. [65] |
| <i>Geobacillus thermoleovorans</i> | 9,00 | Abdel, 2002 |
| <i>Bacillus</i> sp. LBN2 | 10,00 | Bora (2012) |

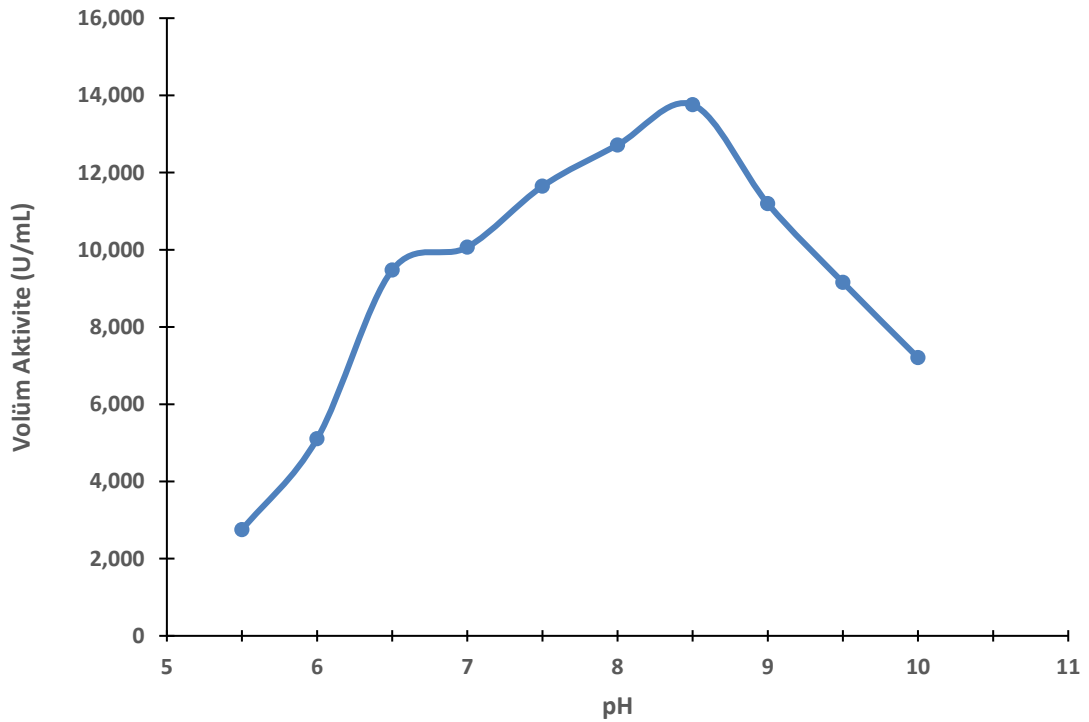
Tablo 22. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

| pH | Volüm Aktivite (U/mL) (ORT.± S.S.) | X | Kalan aktivite (%) |
|-------|---------------------------------------|---|-----------------------|
| 5,50 | 2,748 ± 0,130 | b | 20 |
| 6,00 | 5,106 ± 0,225 | b | 37 |
| 6,50 | 9,474 ± 0,445 | b | 69 |
| 7,00 | 10,068 ± 0,287 | b | 73 |
| 7,50 | 11,646 ± 0,126 | b | 85 |
| 8,00 | 12,714 ± 0,028 | a | 92 |
| 8,50 | 13,758 ± 0,184 | a | 100 |
| 9,00 | 11,196 ± 0,452 | b | 81 |
| 9,50 | 9,156 ± 0,075 | b | 67 |
| 10,00 | 7,206 ± 0,073 | b | 52 |

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S. : Standart sapma.

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



Şekil 14. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

4.3.2. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

Sıcaklık enzim aktivitesi etkileyen önemli etkenlerden birisidir. Bu nedenle lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini saptamak için enzim 10-70 °C arasında inkübasyona bırakılarak denemeler yapılmıştır. Enzim aktivitesi 10°C'den itibaren sıcaklığın artmasıyla birlikte artarak 55°C'de (21,996 U/ml) maksimum değere ulaştı, daha sonra ise düşüşe geçti. 45- 55 °C arasındaki sıcaklık değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu (Tablo 24, Şekil 14). Enzim aktivitesinin bu aralıkta %85-100 arasında olduğu saptanmıştır. Diğer tüm sıcaklıklarda enzim aktivitesi maksimuma göre istatistiksel olarak farklı bulundu. Ancak, 35 ve 60°C sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesi maksimuma göre %50'nin üzerinde olduğu görülmektedir. Enzimin geniş bir sıcaklık aralığında aktivite gösteriyor olması enzimin yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel işlemlerde kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Çalışmamıza benzer olarak *Anoxybacillus sp.* ARS-1 lipazının araştırıldığı çalışmada tüm değişkenler arasında, sıcaklığın diğer değişkenlerle önemli ölçüde etkileşimli olduğu bulunmuştur. Lipaz üretimini için en uygun sıcaklık değeri 57,5 °C olarak belirtilmiştir (Sahoo vd., 2020). *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134'ten enzim maksimum lipaz üretim sıcaklığı 50 °C olarak belirtilmiştir (Bakır, 2016). *Bacillus licheniformis* A7 (GenBank numarası: KC310458)'ten lipaz üretimi için optimum sıcaklık 55°C olarak belirtilmiştir (Tuysuz vd.,2019). *Anoxybacillus flavithermus* suşu için maksimum lipaz üretimi için optimum sıcaklık 60-65 °C bulunmuştur. (Chiş vd.,2013). Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar Tablo23'de özetlenmiştir.

Sıcaklık, enzim sentezini mRNA transkripsiyon seviyesinde ve muhtemelen proteinlerin translasyon seviyelerinde düzenler, böylece proteinlerin stabilitesini ve ayrıca üretimi artırır.

Tablo 23. Çeşitli bakteri türleri üzerine lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

| Türler | Sıcaklık (° C) | Referanslar |
|----------------------------------------|----------------|----------------------------------|
| <i>Pseudomonas gessardii</i> | 30 | Ramani vd. [66] |
| <i>Enterococcus durans</i> NCIM5427 | 30 | Vrinda [97] |
| <i>Burkholderia multivorans</i> | 30 | Gupta ve ark. [94] |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 30 | Suci vd.,2018 |
| <i>Burkholderia multivorans</i> V2 | 37 | Dandavate vd. [95] |
| <i>Streptomyces</i> LP10 | 37 | Aly vd. [98] |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PS35 | 40 | Kanmani,2016 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> E1PA | 40 | Saengsanga vd.,2016 |
| <i>Serratia marcescens</i> ECU1010 | 45 | (L.-L. Zhao vd., 2008). |
| <i>Salinivibrio</i> sp. SA-2 suşu | 50 | Amoozegar vd. [64] |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | 51 | Sahoo vd., 2018 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LP602 | 55 | Dharmsthiti ve Kuhasuntisuk [93] |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM5963 | 55 | Zhang vd.,2009 |
| <i>Bacillus koagulan</i> BTS-3 | 55 | Kumar vd. [65] |
| <i>Bacillus</i> sp. LBN2 | 60 | Bora (2012) |
| <i>Geobacillus zalihae</i> sp. | 65 | Rahman vd. [92] |
| <i>Burkholderia</i> sp. ZYB002 | 65 | Shu vd. [96] |
| <i>Bacillus</i> THL027 | 70 | Dharmsthiti ve Luchai [91] |
| <i>Thermus thermophilus</i> | 70 | Dominguez vd.,2005 |
| <i>Geobacillus thermoleovorans</i> | 70 | Abdel, 2002 |

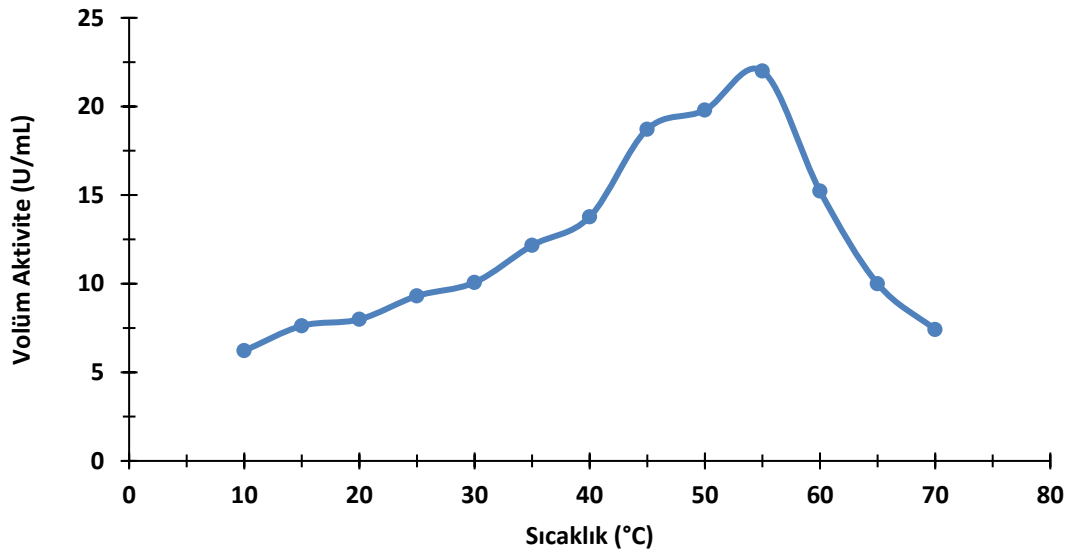
Tablo 24. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

| Sıcaklık °C | Volüm Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.S.) | X | Kalan aktivite (%) |
|----------------|----------------------------------------|---|-----------------------|
| 10 | 6,216 ± 0,120 | b | 28 |
| 15 | 7,620 ± 0,453 | b | 34 |
| 20 | 7,968 ± 0,453 | b | 36 |
| 25 | 9,306 ± 0,126 | b | 42 |
| 30 | 10,068 ± 0,440 | b | 46 |
| 35 | 12,162 ± 0,310 | b | 55 |
| 40 | 13,770 ± 0,301 | b | 61 |
| 45 | 18,714 ± 3,980 | a | 85 |
| 50 | 19,792 ± 0,216 | a | 90 |
| 55 | 21,996 ± 0,048 | a | 100 |
| 60 | 15,222 ± 0,092 | b | 69 |
| 65 | 9,996 ± 0,240 | b | 45 |
| 70 | 7,410 ± 0,027 | b | 33 |

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.S. : Standart sapma.

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



Şekil 15. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma olan *Anoxybacillus* sp. HBB 180 Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında daha önceden izole edilmiş stok kültürlerden sağlanmıştır. *Anoxybacillus* sp. HBB180 izolatından maksimum enzim üretimini sağlamak ve lipaz üretiminin artırılması için karbon kaynağı, inorganik ve organik azot kaynağı, başlangıç pH'sı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı gibi farklı fermantasyon parametreleri optimize edilmiştir. Kantitatif lipaz aktivite tayini p-NPL (p-nitrofenil laurat) substratı ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Bu çalışmayla *Anoxybacillus* sp. HBB 180 lipazının optimizasyon ve karakterizasyon çalışması detaylı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Taranan literatürde *Anoxybacillus* sp. HBB 180 lipazıyla ilgili farklı parametrenin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Enzim üretimi için ortamının optimum pH aralığı 6,50 -7,50 arasında bulundu. HBB180, en yüksek enzim aktivitesi (11.01 U/mL) pH 6,50'da elde edildi. *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB 180'in 45-65°C arasında çok iyi gelişim göstermesi bu türün termofil olduğunu gösterir. 55 °C'de ise en yüksek değere ulaştığı (17,884 U/mL) görüldü.

Analitik saflıktaki yağlar ve ticari yağlar arasında da lipaz üretiminde en etkili olan karbon kaynağı %0,5 zeytinyağı olarak saptandı. Denenen tüm yağlar içerisinde ticari zeytinyağının ucuz olması nedeniyle en iyi indükleyici olarak zeytinyağı (27,246 U/mL) karbon kaynağı olarak kullanıldı.

Enzim miktarını en çok artıran azot kaynağı diğer çalışmaların benzer olarak %0,5 pepton (12,978 U/mL) bulundu.

HBB 180 suşu optimum koşullar belirlendikten zamana bağlı gelişimlerinin log fazının başlarında başlayıp, ortasında enzim aktivitesinin 12.saatte (15,886 U/ml) maksimum değere ulaştığı ve daha sonra gerilemeye başladığı görüldü.

Anoxybacillus kaynarcensis HBB 180 lipazının başlangıç ve optimum koşullar arasında 12. saatteki enzim üretim miktarları kıyaslandığında 2,56 kat artırdığı saptandı.

Enzimin büyük oranda hücre içinde olduğu saptandı.

Enzim aktivitesinin pH 6,50 -10,00 aralığında optimum değerinin %50'nin fazla ve pH 7,50-9,00 aralığında optimum aktivitenin %80'inden fazla olduğu saptandı. Buna göre *Anoxybacillus kaynarcensis* HBB 180 lipazının alkali karakterde bir enzim olduğunu

göstermektedir. HBB 180 lipazının geniş bir pH aralığında çalışması ve alkali bir enzim olmasından dolayı özellikle deterjan endüstrisi gibi alanlarda kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Enzim aktivitesi 10°C'den itibaren sıcaklığın artmasıyla birlikte artarak 55°C'de (21,996 U/ml) maksimum değere ulaşmış, daha sonra ise düşüşe geçmiştir. 45- 55 °C arasındaki sıcaklık değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. Enzim aktivitesinin bu aralıkta %85-100 arasında olduğu saptanmıştır. Diğer tüm sıcaklıklarda enzim aktivitesi maksimuma göre istatistiksel olarak farklı bulundu. Ancak, 35 ve 60°C sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesi maksimuma göre %50'nin üzerinde olduğu görülmektedir. Enzimin geniş bir sıcaklık aralığında aktivite gösteriyor olması enzimin yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel işlemlerde kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

HBB-180 bakterisinin kültür koşulları incelendiğinde en iyi lipaz üretiminin, % 0,5 zeytinyağı, % 0,5 pepton % 0,5 gum arabic ve % 1 NaCl'den oluşan üretim ortamında başlangıç pH'sı 6,50 olan 55 °C' sıcaklıkta, 12 saat geliştirildiğinde saptandı. HBB-180 lipazının lokalizasyonu, hücre içerisinde bulunduğu belirlendi.

Lipaz aktivitesini incelediğimizde, maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü pH ve sıcaklık sırasıyla 8,50 ve 55 °C bulundu.

Çalışmanın sonucunda besiyeri kaynak bileşenleri ve inkübasyon koşullarının değiştirilmesiyle *Anoxybacillus* sp. HBB 180 izolatından lipaz üretiminin arttığını, *Anoxybacillus* sp. HBB 180 lipazı için optimum çalışma koşulları sağlandığında ise enzimin aktivitesinde artış olduğunu gösterilmiştir.

Kültür koşulları optimize edildiğinde *Anoxybacillus* sp. *HBB 180* bakterisinin üremesi için optimal koşullar;

- Karbon kaynakları %0,5 zeytinyağı
- Azot kaynağı %0,5 pepton
- pH 6,50
- İnkübasyon sıcaklığı 55 °C
- İnkübasyon süresi 12 saat olarak saptanmıştır.

Anoxybacillus sp. HBB 180 lipazının aktivitesi için optimal koşullar;

- Enzim aktivitesinin pH 8,5'da %100 iken, 8'de %92'ye, 7,5'da %85'e düştüğü

saptandı.

- Enzim aktivitesinin sıcaklık denemedeinde ise 55 °C’de %100 iken, 50 °C’de %89’a, 45 °C’de %82’e düştüğü saptandı.

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, *Anoxybacillus* sp. HBB 180 izolatının lipaz üretimi için potansiyel olarak kullanılabilceği ve endüstriyel potansiyeli yüksek bir enzim elde edildiği öngörülmektedir. Yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde optimal koşullara sahip olması, termal stabilitesinin olması ve geniş bir pH aralığında aktivitesinin korunması nedeniyle, *Anoxybacillus* sp. HBB 180 bakterisinden elde edilen lipazın, endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda termostabil lipaz uygulamalarında kullanım potansiyeli olduğunu düşünmekteyiz. Türkiye’nin jeotermal alanlar açıısından geniş bir ülke olması sebebiyle, bu enzimin endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalara yönelik ileri araştırmaların yapılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y. R. (2002). Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. Using Box-Behnken experimental design. *Biotechnology Letters*, 24 (14), 1217-1222.
- Adam, B., ve Yiğitoğlu, M. R. (2012). Tıbbi Biyokimya, Nobel Yayınevi, 1. Baskı.
- Aehle, W. (2007). Enzymes in Industry. Wiley. In: VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Akoh, C., & Min, D. (1998). Microbial Lipases “and—Enzymatic Interesterification “. *Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 641-698.
- Ali, C. H., Zhang, J.-J., Mbadinga, S. M., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., Gu, J.-D., & Mu, B.-Z. (2015). Screening, isolation and optimization of an extracellular lipase producing *Exiguobacterium* sp. BBXS-7 segregated from waste cooking oil contaminated sites. *Wulfenia J*, 22, 185-201.
- Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F., & Dogru, M. (2007). Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 136 (2), 183-192.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., & Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry.
- Arpigny, J. L., & JAEGER, K.-E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical journal*, 343 (1), 177-183.
- Association, E. T. (2001). Enzymes; A primer on use and Benefits today and tomorrow. *Enzyme Technical Association, Washington, DC*, 34.
- Ay, F., Karaoglu, H., Inan, K., Canakci, S., & Belduz, A. O. (2011). Cloning, purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from *Anoxybacillus* sp. PDF1. *Protein expression and purification*, 80 (1), 74-79.
- Bakır, Z. B. (2016). Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134’ün lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu.

- Balaji, L., Chittoor, J. T., & Jayaraman, G. (2020). Optimization of extracellular lipase production by halotolerant *Bacillus* sp. VITL8 using factorial design and applicability of enzyme in pretreatment of food industry effluents. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50 (7), 708-716.
- TUYSUZ, E., BALTACI, M. Ö., OZKAN, H., TASKIN, M., & ADIGUZEL, A. Lipase production from thermophilic bacteria using waste frying oil as substrate. *Teknik Bilimler Dergisi*, 9 (3), 23-27.
- Behera, A. R., Veluppai, A., & Dutta, K. (2019). Optimization of physical parameters for enhanced production of lipase from *Staphylococcus hominis* using response surface methodology. *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (33), 34277-34284.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., & Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102 (2), 133-153.
- Ben Bacha, A., Moubayed, N. M., & Al-Assaf, A. (2016). An organic solvent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* ALA1 strain with potential for use as an industrial biocatalyst. *Biotechnology and applied biochemistry*, 63 (3), 378-390.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., & Komathi, S. (2019). Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *Journal of King Saud University-Science*, 31 (4), 898-901.
- Bisht, D., Yadav, S. K., & Darmwal, N. S. (2013). Computation of interactive effects and optimization of process parameters for alkaline lipase production by mutant strain of *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (1), 245-252.
- Bora, L., & Bora, M. (2012). Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus* sp isolated from Hotspring of Arunachal Pradesh, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (1), 30-42.
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*, 26 (1), 73-81.
- Brant, A., Hole, A., Cannon, J., Helm, J., Swales, C., Welch, J., . . . Cullinan, P. (2004). Occupational asthma caused by cellulase and lipase in the detergent industry. *Occupational and environmental medicine*, 61 (9), 793-795.

- Brígida, A. I., Amaral, P. F., Coelho, M. A., & Goncalves, L. R. (2014). Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *101*, 148-158.
- Burcu Bakir, Z., & Metin, K. (2017). Production and characterization of an alkaline lipase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. HBB16. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, *31* (3), 303-312.
- Chandra, P., Enespa, Ranjan, S., Pankaj, K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review
- Charoenpanich, J., Suktanarag, S., & Toobbucha, N. (2011). Production of a thermostable lipase by *Aeromonas* sp. EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand. *Science Asia*, *37* (2), 105-114.
- Chauhan, M., Chauhan, R. S., & Garlapati, V. K. (2013). Modelling and optimization studies on a novel lipase production by *Staphylococcus arlettae* through submerged fermentation. *Enzyme research*, 2013.
- Chiş, L., Hriscu, M., Bica A., Toşa M., Nagy G., Róna G., Vértessy B., Irimie F., (2013) Molecular cloning and characterization of a thermostable esterase/lipase produced by a novel *Anoxybacillus flavithermus* strain
- Chowdhury Paul, S., Jain, P., Mitra, J., Dutta, S., Bhattacharya, P., Bal, B., . . . Pal, S. (2012). Induction of Cr (VI) reduction activity in an *Anoxybacillus* strain under heat stress: a biochemical and proteomic study. *FEMS microbiology letters*, *331* (1), 70-80.
- Christophe, L. P., Zambare, V. P., Zambare, A., Kumar, H., & Malek, L. (2015). A thermo-alkaline lipase from a new thermophilic *Geobacillus thermodenitrificans* AV-5 with potential application in biodiesel production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *90* (11), 2007-2016.
- Cihan, A. C., Cokmus, C., Koc, M., & Ozcan, B. (2014). *Anoxybacillus calidus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from soil near a thermal power plant. *Int J Syst Evol Microbiol*, *64* (Pt 1), 211-219.
- Cihangir, N., & Sarikaya, E. (2004). Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20* (2), 193-197.
- Cooper, G. M. (2000). The central role of enzymes as biological catalysts. In: *Sinauer Associates*.

- Coorevits, A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., & Logan, N. A. (2012). Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly ‘thermoglucosidasius’); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (7), 1470-1485.
- Cox, M. M., & Nelson, D. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., Aloulou, A. (2013). Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International journal of biological macromolecules*, 57, 232-237.
- Das, A., Bhattacharya, S., Shivakumar, S., Shakya, S., & Sogane, S. S. (2017). Coconut oil induced production of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamarii* under submerged fermentation. *Journal of basic microbiology*, 57 (2), 114-120.
- Deep, K., Poddar, A., & Das, S. K. (2013). *Anoxybacillus suryakundensis* sp. nov, a moderately thermophilic, alkalitolerant bacterium isolated from hot spring at Jharkhand, India. *PLoS One*, 8 (12), e85493. doi:10.1371/journal.pone.0085493
- Deepali, B., Santosh Kumar, Y., & Nandan Singh, D. (2011). Enhanced Production of Extracellular Alkaline Lipase by an Improved Strain of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10,055. *American Journal of Applied Sciences*, 9 (2). doi:10.3844/ajassp.2012.158.167
- Dharmstithi, S., & Kuhasuntisuk, B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21 (1-2), 75-80.
- Dominguez, A., Pastrana, L., Longo, M. A., Rúa, M. L., & Sanroman, M. A. (2005). Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochemical engineering journal*, 26 (2-3), 95-99.
- Duza, M. B., & Mastan, S. (2014). Optimization of lipase production from *Bacillus thuringiensis* (TS11BP), *Achromobacter xylosoxidans* J2 (TS2MCN)-isolated from

- soil sediments near oilseed farm. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci*, 9, 66-76.
- Eed, J. (2012). Factors affecting enzyme activity. *Essai*, 10 (1), 19.
- Eijkman, C. (1901). Ueber Enzyme bei bakterien und Schimmelpilzen. *Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr*, 29, 841-848.
- El-Batal, A. I., Farrag, A. A., Elsayed, M. A., & El-Khawaga, A. M. (2016). Effect of environmental and nutritional parameters on the extracellular lipase production by *Aspergillus niger*. *International Letters of Natural Sciences*, 60.
- Enzyme Classification and Nomenclature. In *eLS* (pp. 1-11).
- Ertuğrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149 (3), 720-724.
- Fadıloğlu, S., & Erkmen, O. (2004). Gıda Sanayiinde Enzimlerin Önemi. *Gıda*, 29 (5).
- Fatima, H., Khan, N., Rehman, A. U., & Hussain, Z. (2014). Production and partial characterization of lipase from *Pseudomonas putida*. *Ferment. Technol*, 2, 112.
- Fatima, H., Khan, N., & Rehman, A. U. (2015). Production and Partial Characterization of Lipase from *Pseudomonas putida*. *Fermentation Technology*, 4 (1-7).
- Ferreira, A. N., Ribeiro, D. D. S., Santana, R. A., Santos Felix, A. C., Alvarez, L. D. G., Lima, E. d. O., Nascimento Junior, B. B. d. (2017). Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera*. *Chemical Engineering Communications*, 204 (10), 1167-1173.
- Fickers, P., Destain, J., & Thonart, P. (2005). Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 27 (22), 1751-1754.
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T., & Petersen, S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie*, 82 (11), 1033-1041.
- Gaur, R., Gupta, A., & Khare, S. (2008). Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*, 43 (10), 1040-1046.
- Ghanem, E. H., Al-Sayed, H. A., & Saleh, K. M. (2000). An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (5), 459-464. doi:10.1023/A:1008947620734

- Goh, K. M., Gan, H. M., Chan, K. G., Chan, G. F., Shahar, S., Chong, C. S., Chai, K. P. (2014). Analysis of anoxybacillus genomes from the aspects of lifestyle adaptations, propHage diversity, and carbohydrate metabolism. *PLoS One*, 9 (6), e90549. doi:10.1371/journal.pone.0090549
- Goh, K. M., Kahar, U. M., Chai, Y. Y., Chong, C. S., Chai, K. P., Ranjani, V., . . . Chan, K.-G. (2013). Recent discoveries and applications of Anoxybacillus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (4), 1475-1488.
- Grahame, D., Bryksa, B., & Yada, R. (2015). Factors affecting enzyme activity. In *Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality* (pp. 11-55): Elsevier.
- Gulati, R., Isar, J., Kumar, V., Prasad, A. K., Parmar, V. S., & Saxena, R. K. (2005). Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. *Pure and Applied Chemistry*, 77 (1), 251-262.
- Guncheva, M., & Zhiryakova, D. (2011). Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68 (1), 1-21.
- Gupta, N., Sahai, V., & 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.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (6), 763-781.
- Gündüz, H. B., Beşoluk, Ş., & Önder, İ. (2011). Karmaşık sistemlerde liderlik bakışıyla: DNA liderlik. *Uluslararası İnsan Bilimleri Dergisi*, 8 (1), 520-544.
- Hammamchi, H. (2014). *Rhodotorula Mucilaginosa* Dan Lipaz Enzimi Üretimi ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 39 (2), 235-251.
- Hocaoğlu, S. M., Baştürk, İ., Aydöner, C., Haksevenler, B. (2018). Türkiye'deki Zeytinyağı İşletmelerinin 3 Fazlıdan 2 Fazlı Üretime Geçiş Durumunda Pirina Tesislerinin Yeterliliğinin CBS Destekli Analizi. AAT FAKÜLTESİ DERGİSİ, 2018, Cilt 32, Sayı 1, 43-58 (*Journal of Agricultural Faculty of Uludağ University*) Araştırma Makalesi.

- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., & Comeau, L. C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial technology*, 26 (5-6), 421-430.
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & 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., Belduz, A. O., & Canakci, S. (2013). *Anoxybacillus kaynarcensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylanase producing bacterium. *Journal of basic microbiology*, 53 (5), 410-419.
- Jaeger, K.-E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13 (4), 390-397.
- Jiang, Y., Zhou, X., & Chen, Z. (2009). Cloning, expression, and biochemical characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus stearothermophilus* JC. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (4), 747-751.
- Kamaladevi, B., Prabhavathi, P., Sankareswaran, M., Anbalagan, S., Radhakrishnan, N., Prabhu, D. (2014), "Screening and Medium Optimization of Lipase Producing Bacteria from Saltpan.", *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 72-77, 2014.
- Kanmani, P., Dhivya, B., Kumaresan K., Aravind J., (2016). *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 Isolated from fat and oil contaminated sites: Augmentation of lipase production using statistical experimental design.
- Kamini, N., & Iefuji, H. (2001). Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2. *Process Biochemistry*, 37 (4), 405-410.
- Kaushik, R., Saran, S., Isar, J., & Saxena, R. K. (2006). Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40 (3-4), 121-126.
- Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Beh, B. K., & Lai, O. M. (2011). Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. In submerged and solid-state fermentations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*,

2011.

- Kierkels, J., Vleugels, L., Kern, J., Meijer, E., & Kloosterman, M. (1990). Lipase kinetics: On-line measurement of the interfacial area of emulsions. *Enzyme and Microbial technology*, 12 (10), 760-763.
- Kingsley, L. J., & Lill, M. A. (2015). Substrate tunnels in enzymes: structure–function relationships and computational methodology. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 83 (4), 599-611.
- Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U., & Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1), 12-19.
- Kojima, Y., & Shimizu, S. (2003). Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of bioscience and bioengineering*, 96 (3), 219-226.
- Konarzycka-Bessler, M., & Jaeger, K.-E. (2006). Select the best: novel biocatalysts for industrial applications. *Trends in biotechnology*, 24 (6), 248-250.
- Kulkarni, N., & Gadre, R. V. (2002). Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28 (6), 344-348.
- Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S. S., & Arora, P. K. (2016). Lipase catalysis in organic solvents: Advantages and applications. *Biological Procedures Online*, 18 (1), 2.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., & Gupta, R. (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein expression and purification*, 41 (1), 38-44.
- Larbidaouadi, K., Benattouche, Z., & Abbouni, B. (2015). Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase isolated from industrial rejection of gas station. *Int. J. Biotechnol. Allied Field*, 3 (9), 146-153.
- Lee, K.-W., Bae, H.-A., Shin, G.-S., & Lee, Y.-H. (2006). Purification and catalytic properties of novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* sp. ES-1 for hydrolysis of (S)-ketoprofen ethyl ester. *Enzyme and Microbial technology*, 38 (3-4), 443-448.
- LESUISSE, E., SCHANCK, K., & COLSON, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic

- pH -tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 216 (1), 155-160.
- Li, C.-Y., Cheng, C.-Y., & Chen, T.-L. (2004). Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 19 (1), 25-31.
- Li, H., & Zhang, X. (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expression and Purification*, 42 (1), 153-159.
- Lima, V. M., Krieger, N., Mitchell, D. A., Baratti, J. C., de Filippis, I., & Fontana, J. D. (2004). Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31 (1-3), 53-61.
- Liu, C.-H., Lu, W.-B., & Chang, J.-S. (2006). Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. By response surface methodology. *Process Biochemistry*, 41 (9), 1940-1944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.013>
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J. L., Brocca, S., Valero, F., & Lafuente, J. (1998). Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chemistry and physics of lipids*, 93 (1-2), 143-148.
- Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., & Gokhale, D. V. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38 (5), 715-721.
- Maia, M. M. D., Heasley, A., De Morais, M. C., Melo, E. H. M., Morais Jr, M. A., Ledingham, W. M., & Lima Filho, J. L. (2001). Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource technology*, 76 (1), 23-27.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill Jr, C. G., & Amundson, C. H. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 14 (6), 426-446.
- Masomian, M., Abd Rahman, R. N. Z. R., Salleh, A. B., & Basri, M. (2013). A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. *Process Biochemistry*, 48 (1), 169-175.
- Mazhar, H., Abbas, N., Ali, S., Sohail, A., Hussain, Z., & Ali, S. S. (2017). Optimized production of lipase from *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39. *African Journal of Biotechnology*, 16 (19), 1106-1115.

- Mercan Ülkü, D. (2018). *Antep fıstığı bitkisinden (Pistacia vera L.) lipaz enzimi saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi*. Kütahya Dumlupınar Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Metin, K. (2007). Moleküler Biyoloji, Protein sentezi ve yıkımı. Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karatağ, M., Tanyolaç, B. (editörler), Nobel Yayın Dağıtım, 555- 576 s., Ankara.
- Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., & Moosavi-Nejad, Z. (2011). Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iranian journal of microbiology*, 3 (2), 92.
- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International journal of microbiology*, 2017.
- Mohan, T. S., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2008). Isolation and characterization of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste. *African journal of Biotechnology*, 7 (15).
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. ve Rodwell, V. W. (2004). Harper Biyokimya, Nobel Yayınevi, 25. Baskı.
- Nakajima-Kambe, T., Edwinoliver, N., Maeda, H., Thirunavukarasu, K., Gowthaman, M., Masaki, K., Kamini, N. (2012). Purification, cloning and expression of an *Aspergillus niger* lipase for degradation of poly (lactic acid) and poly (ϵ -caprolactone). *Polymer degradation and stability*, 97 (2), 139-144.
- Narayan, V. V., Hatha, M. A., Morgan, H. W., & Rao, D. (2008). Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the Savusavu hot springs in Fiji. *Microbes and environments*, 0809250010-0809250010.
- Nawani, N., & Kaur, J. (2007). Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial technology*, 40 (4), 881-887.
- Nawani, N., Khurana, J., & Kaur, J. (2006). A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290 (1-2), 17-22.

- Nelson, D. L., ve Cox, M. M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri, Palme Yayıncılık, 5. Baskı.
- Noureddini, H., Gao, X., & PH ilkana, R. (2005). Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource technology*, 96 (7), 769-777.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B.W., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman I., Schrag, J. (1992). Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B.W., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman I., Schrag, J. 1992. *The α/β -hydrolase fold*. *Protein Eng.*, 5:197-211.
- Öztürk, B. (2002). Lipaz enzimi: Yapısal özellikleri ve uygulama alanları. *Gıda mühendisliği dergisi*, 12, 20-23.
- Öztürk, Ş., & Keskin Taldari, E. (2019). Bazı Mikroorganizmaların Ürettiği Lipaz Enziminin Optimizasyon ve Karakterizasyonu. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi.
- Paiva, A. L., Balcao, V. M., & Malcata, F. X. (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases☆. *Enzyme and Microbial technology*, 27 (3-5), 187-204.
- Patel, A., SĠnghania R., Ashok, P.. (2017). Production, Purification and Aplication of Microbial Enzymes.
- Pandey, A., & Ramachandran, S. (2006). General Introduction in Enzyme Technology. A. Pandey, C. Webb, & CR Larroche. *Asiatech, New Delhi*, 1-10.
- Parihar, D. K. (2012). Production of lipase utilizing linseed oilcake as fermentation substrate. *Int. J. Sci. Environ. Technol*, 1 (3), 135-143.
- Pereira-Meirelles, F.V., Rocho-Leão, M.H.M., Sant'Anna, G.L. 1997. A stable lipase from *Candida lipolytica*. Cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63-65 (1): 73-85. (1997).
- Pikuta, E., Cleland, D., & Tang, J. (2003). Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1T: emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus*. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (5), 1561-1562.

- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Laurinavichius, K. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (6), 2109-2118.
- Pliego, J., Mateos, J. C., Rodriguez, J., Valero, F., Baeza, M., Femat, R., Camacho, R., Sandoval, G., & Herrera-López, E. J. (2015). Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using p-nitrophenyl butyrate. *Sensors*, 15 (2), 2798-2811.
- Pogaku, P., Fan, W., Suresh, A., Zhong, S., Srinivas, P., Reddy, S. R., Peng, Z. (2010). Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12. *African journal of Biotechnology*, 9 (6), 882-886.
- Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Nicolaus, G., De Appolonia, F., Nicolaus, B. (2006). *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). *Systematic and applied microbiology*, 29 (4), 300-307.
- Prasad, M. P., & Manjunath, K. (2011). Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species.
- Punekar, N. (2018). Enzymes: Historical Aspects. In *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (pp. 5-13): Springer.
- Rahman, N. F. A., Basri, M., Rahman, M. B. A., Rahman, R. N. Z. R. A., & Salleh, A. B. (2011). High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry. *Bioresource technology*, 102 (3), 2168-2176.
- Rathi, P., Goswami, V., Sahai, V., & Gupta, R. (2002). Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *Journal of applied microbiology*, 93 (6), 930-936.
- Ray, A. (2012). Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and technology*, 2 (2), 33-37.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M., & Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 147, 237-250.

- Rodrigues, M. I., & Iemma, A. F. (2005). *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*: Casa do Pão Editora.
- Romdhane, I. B.-B., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouri, A., & Belghith, H. (2010). A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochemical Engineering Journal*, 53 (1), 112-120.
- S., T. C. (2017). Biomacromolecules. Department of Chemistry, Carleton University, New Jersey. 11, 323-325.
- Saengsanga, T., Siripornadulsil, W., & Siripornadulsil, S. (2016). Molecular and enzymatic characterization of alkaline lipase from *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA isolated from lipid-rich food waste. *Enzyme and microbial technology*, 82, 23-33.
- Sahoo, R. K., Das, A., Gaur, M., Sahu, A., Sahoo, S., Dey, S., Rahman, P. K. S. M., & Subudhi, E. (2020). Parameter optimization for thermostable lipase production and performance evaluation as prospective detergent additive. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50 (6), 578-584. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1719513>
- Sahoo, R. K., Kumar, M., Mohanty, S., Sawyer, M., Rahman, P. K. S. M., Sukla, L. B., & Subudhi, E. (2018). Statistical optimization for lipase production from solid waste of vegetable oil industry. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 48 (4), 321-326. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1431785>
- Sarmah, N.; Dhanashekar, R.; Sheelu, G.; Yamuna Rani, K. (2017). Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. *Biotechnology Progress* 34 (1) DOI: 10.1002/btpr.2581
- Saxena, R., Davidson, W., Sheoran, A., & Giri, B. (2003). Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 39 (2), 239-247.
- Saxena, R., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of microbiological methods*, 52 (1), 1-18.
- Scanlon, M., Henrich, A., & Whitaker, J. (2018). Factors affecting enzyme activity in food processing. In *Proteins in Food Processing* (pp. 337-365): Elsevier.
- Schmid, R. D., & Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37 (12), 1608-1633.

- Scopes, R. K. (2001). Enzyme activity and assays. *e LS*.
- Shaoxin, C., Lili, Q., & Bingzhao, S. (2007). Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochemistry*, 42 (6), 988-994.
- Sharma, A. K., Tiwari, R. P., & Hoondal, G. S. (2001). Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, PHysiology, Genetics, MorpHology, and Ecology of Microorganisms*, 41 (6), 363-366.
- Sharma, A., Bardhan, D., & Patel, R. (2009). Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. *IJBB* Vol.46 (2) [April 2009]. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/4055>
- Sigurgísladóttir, S., Konráðsdóttir, M., Jónsson, Á., Kristjánsson, J. K., & Matthiasson, E. (1993). Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. *Biotechnology Letters*, 15 (4), 361-366.
- Singh, S., & Banerjee, U. (2007). Purification and characterization of trans-3- (4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 42 (7), 1063-1068.
- Sirisha, E., Rajasekar, N., & Narasu, M. L. (2010). Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biological Research*, 4 (5), 249-252.
- Snellman, E. A., Sullivan, E. R., & Colwell, R. R. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *European Journal of Biochemistry*, 269 (23), 5771-5779.
- Steinweg, J. M., Dukes, J. S., & Wallenstein, M. D. (2012). Modeling the effects of temperature and moisture on soil enzyme activity: linking laboratory assays to continuous field data. *Soil Biology and Biochemistry*, 55, 85-92.
- Suci, M., Arbianti, R., & Hermansyah, H. (2018). Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 105 (1), 012126.
- Sulong, M. R., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2006). A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus spH aericus* 205y: Extracellular expression of a

- novel OST-lipase gene. *Protein expression and purification*, 49 (2), 190-195.
- Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A., & Wiwat, C. (2010). Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105 (3), 228-235.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28 (10), 2731-2739.
- Tan, T., Zhang, M., Xu, J., & Zhang, J. (2004). Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochemistry*, 39 (11), 1495-1502.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., & Zhao, Y. (2020). The Classification of Enzymes by Deep Learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811.
- Tembhurkar, V. R., Kulkarni, M. B., Peshwe, S. A. (2012). Optimization of Lipase Production by *Pseudomonas* spp. in submerged batch process in shake flask culture. *Science Research Report*, 2, 46-50.
- Thomson, C. A., Delaquis, P. J., & Mazza, G. (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39 (2), 165-187.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and bioprocess technology*, 3 (2), 182-196.
- Tunç, M. S., & Ünlü, A. (2015). Zeytinyağı Üretim Atıksularının Özellikleri, Çevresel Etkileri ve Arıtım Teknolojileri. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi* Cilt 4 (2) 44-74 2015 DOI: 10.17100/nevbiltek.211031
- Ugras, S. (2017). Characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus licheniformis* Ht7 isolated from Hayran Thermal Springs in Giresun. *Romanian Biotechnological Letters*, 22 (1), 12297-12306.
- Ülker, S., & Karaoğlu, Ş. A. (2012). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114 (4), 385-390.

- Veerapagu, M., Narayanan, A. S., Ponmurugan, K., & Jeya, K. R. (2013). Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 6 (3), 62-67.
- Venkatesagowda, B., Ponugupaty, E., Barbosa, A. M., & Dekker, R. F. (2015). Solid-state fermentation of coconut kernel-cake as substrate for the production of lipases by the coconut kernel-associated fungus *Lasiodiplodia theobromae* VBE-1. *Annals of microbiology*, 65 (1), 129-142.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., . Whitman, W. B. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3): Springer Science & Business Media.
- Wolfson, D., Olmstead, S., Meiss, D., & Ralston, J. (2008). Making sense of digestive enzymes, KLAIRE LABSTM™. *A division of ProTheraR*. In: Inc.
- Zhang, A., Gao, R., Diao, N., Xie, G., Gao, G., & Cao, S. (2009). Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56 (2-3), 78-84.
- Zhang, X. Q., Zhang, Z. L., Wu, N., Zhu, X. F., & Wu, M. (2013). *Anoxybacillus vitaminiphilus* sp. nov., a strictly aerobic and moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63 (Pt 11), 4064-4071. doi:10.1099/ijs.0.050096-0
- Zhao, L.-L., Xu, J.-H., Zhao, J., Pan, J., & Wang, Z.-L. (2008). Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochemistry*, 43 (6), 626-633.
- Zhao, Z., Fu, J., Dhakal, S., Johnson-Buck, A., Liu, M., Zhang, T., Yan, H. (2016). Nanocaged enzymes with enhanced catalytic activity and increased stability against protease digestion. *Nature communications*, 7 (1), 1-9.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.../.../2021

Aslı ÇANAKÇI