



**LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN *Anoxybacillus*  
*gonensis* UF7 İLE LİPAZ ENZİM ÜRETİMİ**

**Fatma ALTINOK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL**

**2022**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN *Anoxybacillus gonensis* UF7 İLE LİPAZ ENZİM  
ÜRETİMİ**

(Lipase Enzyme Production by Locally Isolated *Anoxybacillus gonensis* UF7)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma ALTINOK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum  
Ocak, 2022

## KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Fatma ALTINOK tarafından hazırlanan “*Lokal olarak izole edilen Anoxybacillus gonensis UF7 ile lipaz enzim üretimini*” başlıklı çalışması 01/02/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU  
*Atatürk üniversitesi* Aslı Islak İmzalıdır

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL  
*Atatürk üniversitesi* Aslı Islak İmzalıdır

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI  
*Erzurum Teknik Üniversitesi* Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun  
.../.../.... tarih ve ..... sayılı  
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

**Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN**

**Enstitü Müdürü**

Aslı Islak İmzalıdır

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.



T.C.  
**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

**ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU**

Yüksek Lisans Tezi olarak *Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL* danışmanlığında sunulan “*Lokal olarak izole edilen Anoxybacillus gonensis UF7 ile lipaz enzim üretimi*” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	5	30
Materyal ve Yöntem	25	35
Bulgular	10	20
Tartışma	10	20
Tezin Geneli	17	25

**Not:** Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Fatma ALTINOK	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
1.2.2022	1.2.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

\* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda yardımcı olan, emeğini, zamanını ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım tüm zorluklarda bana yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e;

Tez çalışmamın yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi birikimime çok şey katan, karşılaştığım tüm zorluklarda yanımda olup beni yüreklendiren, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN ve Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Varlığıyla bana mutluluk veren, çekinmeden yardım isteyebildiğim canım hocam Doç. Dr. Mine AKSOY'a, birlikte çalışmaktan keyif aldığım laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK ve Esra AYGÜN'e deneylerimin belli aşamalarında bana yardımcı olan ve beni bilgilendiren Sayın Arş. Gör. Dr. Mustafa Özkan BALTAÇI ve Sayın Arş. Gör. Mehmet Akif ÖMEROĞLU'na

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim, her an yanımda olup yardımını esirgemeyen, beni hep motive eden Fatih KAYAR'a iyi kötü her günümde yanımda olan, ömrüm boyunca dostluklarına hep ihtiyaç duyacağım değerli dostlarım Şeymanur ÇOBANOĞLU ve Saadet KALAKENGER'e,

Başarımdaki manevi katkıları çok büyük olan destekçilerim annem Gülay ALTINOK'a, babam Nizamettin ALTINOK'a ve kardeşlerim Zehra ALTINOK, Muhammed ALTINOK ve Şevval İclal ALTINOK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma ALTINOK

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN *Anoxybacillus gonensis* UF7 İLE LİPAZ ENZİM ÜRETİMİ

Fatma ALTINOK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

**Amaç:** Lipazlar, geniş bir substrat özgülüğü bulunan, çeşitli uygulama potansiyeline sahip olan enzimlerdir. Bu enzim; ilaç, kozmetik, deri, deterjan, gıda, parfüm, tıbbi teşhis, biyopolimer-biyosensör yapımı, biyoremediasyon, biyodizel ve diğer organik sentetik malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır. Tez çalışmasında, farklı illerden toplanan kaplıca örneklerinden; bakteriler izole edilerek, lipaz enzim aktivitesine sahip suş/suşlar belirlenmiş ve en yüksek aktivite veren izolattan lipaz enzimi saflaştırılarak, karakterizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

**Yöntem:** Kaplıcalardan alınan numuneler, termoslarda laboratuvar ortamına getirilerek termofilik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakteriler lipaz besiyerine inoküle edilerek, enzim aktiviteleri incelenmiştir. En yüksek lipaz aktivitesine sahip izolat alınmış, 16S rRNA sekans analizi ile tür düzeyinde tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra lipaz üretimine geçilmiş, 2 farklı yöntem ile enzim saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat ve iyon değişim sonucu saflaştırılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır.

**Bulgular:** Bu çalışmada; toplam 64 adet termofilik bakteri izole edilmiştir. Elde edilen izolatlardan 14 tanesinin tribütirin agar besiyerinde şeffaf zon oluşturduğu gözlenmiş ve bu bakterilerin sıvı lipaz besiyerinde aktiviteleri hesaplanmıştır. En yüksek aktiviteye sahip UF7 kodlu izolat klonlanmış; *Anoxybacillus gonensis* türüne ait bir suş olduğu tespit edilmiştir. Ardından sıvı lipaz besiyerinde enzim üretilmiş, TPP yöntemi ile %70 amonyum sülfat doygunluğu, 1:1 homojenat:t-bütanol oranında %79,91 verim ve 6,01 kat; amonyum sülfat ve iyon değişim kromatografisi yöntemi ile de, %80 amonyum sülfat doygunluğunda 13,10 kat ve %40,65 verim ile saflaştırılma gerçekleştirilmiş, SDS-PAGE ile molekül kütlesinin ~73 kDa olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışmada, *A. gonensis* UF7 kodlu suş tarafından üretilen lipaz enzimi ilk kez saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Enzim hem TPP hem amonyum sülfat ve iyon değişim kromatografisi olmak üzere 2 farklı yöntem ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla; 8,0 ve 60°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca saflaştırılan lipaz enziminin metanol, etanol gibi organik çözücülerde ve  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  gibi metal iyonları varlığında aktivitesi artarken; DMSO, kloroform ve  $Cu^{+2}$ 'in enzim aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Lipaz, *Anoxybacillus gonensis*, TPP, amonyum sülfat, iyon değişim kromatografisi

Şubat 2022, 97 sayfa

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### LIPASE ENZYME PRODUCTION BY LOCALLY ISOLATED *Anoxybacillus gonensis* UF7

Fatma ALTINOK

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

**Objective:** Lipases are enzymes with a wide substrate specificity, having potential for various applications. This enzyme is used in the production of pharmaceuticals, cosmetics, leather, detergents, food, perfumes, medical diagnostics, biopolymer-biosensor construction, bioremediation, biodiesel and other organic synthetic materials. In the thesis study, the bacteria were isolated from hot spring samples collected from different provinces, the strain/strains with lipase enzyme activity were determined, the lipase enzyme was purified from the isolate with the highest activity and the characterization process was carried out.

**Method:** The samples taken from the hot springs were brought to the laboratory in thermos and isolation of thermophilic bacteria was performed. The isolated bacteria were inoculated on lipase medium and their enzyme activities were investigated. The isolate with the highest lipase activity was selected and identification of the isolate was performed at the species level by 16S rRNA sequence analysis. Then, lipase production was carried out and the enzyme was purified by 2 different methods. Biochemical characterization of the enzyme purified by ammonium sulfate and ion exchange was performed.

**Results:** In this study, a total of 64 thermophilic bacteria were isolated. It was observed that 14 of the obtained isolates formed a transparent zone on tributyrin agar medium and the activities of these bacteria in liquid lipase medium were calculated. The UF7-coded isolate showing the highest activity was cloned, it was determined that the strain belongs to the *Anoxybacillus gonensis*. Then, the enzyme was produced in liquid lipase medium. With the TPP method at 70% ammonium sulfate saturation and 1:1 homogenate:t-butanol ratio, purification was achieved with 79.91% yield and 6.01 times, with ammonium sulfate and ion exchange chromatography method at 80% ammonium sulfate saturation, purification was carried out with 40.65% yield and 13.10 times and molecular mass of the enzyme was determined to be ~73 kDa by SDS-PAGE.

**Conclusion:** In this study, the lipase enzyme produced by the *A. gonensis* UF7 strain was purified and characterized for the first time. The enzyme was purified by 2 different methods, both TPP and ammonium sulfate-ion exchange chromatography. It was designated that the optimum pH and temperature of the purified enzyme are 8.0 and 60 °C, respectively. In addition, it was observed that while the activity of the purified lipase enzyme increased in organic solvents such as methanol and ethanol and in the presence of metal ions such as Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, the enzyme activity decreased in DMSO, chloroform and Cu<sup>2+</sup>.

**Keywords:** Lipase, *Anoxybacillus gonensis*, TPP, ammonium sulfate, ion exchange chromatography

February 2022, 97 pages

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Termofilik Bakteriler ve Sınıflandırma.....	3
Enzimler .....	5
Mikrobiyal Lipazlar .....	9
Lipazların Kullanım Alanları .....	13
Lipaz Enziminin Bazı Biyoteknolojik Uygulamaları.....	14
Lipaz Enziminin Endüstriyel Uygulamaları.....	15
Enzimlerin Saflaştırılması.....	16
Afinite kromatografisi.....	16
İyon değişim kromatografisi .....	16
Jel filtrasyon kromatografisi .....	17
Su İki fazlı sistem (ATPS) yöntemi .....	17
Üçlü faz ayırma (TPP) .....	17
Tersinir misel sistemi .....	18
İmmünopürifikasyon .....	18
Amonyum sülfat çöktürmesi .....	19
Literatür Araştırması .....	19
MATERYAL VE YÖNTEM .....	23
Materyal .....	23
Çalışmalar İçin Kullanılan Cihazlar.....	23
Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar .....	24

Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı .....	24
Tez Kapsamında Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı.....	26
Yöntem.....	27
Termofilik Özellik Gösteren Bakterilerin İzolasyonu.....	27
Elde Edilen Bakteri Suşlarından, Lipaz Enzimi Üreten İzolatların Belirlenmesi.....	28
Seçilen İzolatın Moleküler Teşhisi .....	28
Genomik DNA izolasyonu.....	28
İzolasyon prosedürü .....	28
DNA Konsantrasyon Değerlerinin Ölçülmesi ve Solüsyonlarının Hazırlanması.....	29
İzole Edilen DNA Örneğinin ve Örneğin Çalışma Solüsyonunun Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	30
16S rRNA PCR analizi .....	30
PCR Reaksiyonu .....	30
PCR Programı .....	31
16S rRNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi.....	31
Klonlama.....	31
Kompotent hücre hazırlama .....	31
Ligasyon işlemi .....	32
Transformasyon işlemi.....	32
Plazmit İzolasyonu .....	33
Plazmitlerin Kontrol Edilmesi ve Konsantrasyonlarının Tespiti .....	34
DNA Dizi Analizi .....	34
Sonuçların Değerlendirilmesi.....	34
En İyi İzolat ile Lipaz Enzim Üretimi.....	34
Üretilen Enzim Homojenatının Hazırlanması.....	34
Lipaz Enzim Aktivite Tayini.....	35
Protein Tayini.....	35
Kalitatif Protein Tayini .....	36
Lipaz Enziminin Saflaştırılması.....	37
Üçlü faz ayırma (TPP) yöntemiyle saflaştırma.....	37
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz uygulaması.....	38
İyon değişim kromatografisi.....	39
SDS- PAGE ile Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi .....	39
SDS-PAGE Jelinin Görüntülenmesi .....	40
Saflaştırılan Lipaz Enziminin Karakterizasyonu .....	40

Enzimin optimum ve stabil sıcaklığının belirlenmesi.....	40
Enzimin optimum ve stabil pH'sının belirlenmesi.....	40
Metal iyonlarının lipaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	41
Çeşitli organik çözücülerin lipaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi .....	41
Bazı inhibisyon ajanlarının lipaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi .....	41
Bazı sürfaktanların ve okside edici ajanın lipaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi .	42
Saflaştırılan lipaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi .....	42
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	43
Termofilik Bakterilerin İzolasyonu.....	43
Lipaz Enzimi Üreten Suşların Belirlenmesi.....	43
Seçilen İzolatın Moleküler Teşhisi .....	44
Genomik DNA İzolasyonu.....	45
16S rRNA PCR.....	45
Klonlama.....	45
Koloni PCR.....	45
Plazmit İzolasyonu .....	46
DNA Dizi Analizi .....	46
<i>A. gonensis</i> UF7'den Lipaz Enziminin Saflaştırılması .....	47
Lipaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Saflaştırılması .....	47
TPP sisteminde amonyum sülfat miktarı ve organik çözücü oranının belirlenmesi.....	47
TPP Sisteminde pH'nın Belirlenmesi .....	51
<i>Anoxybacillus gonensis</i> İzolatından Lipaz Enziminin Geleneksel Saflaştırma Metotları ile Saflaştırılması.....	52
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi.....	52
İyon değişim kromatografisi .....	53
SDS-PAGE ile Enzimin Molekül Kütlesinin Tayini .....	54
Lipaz Enzimi İçin Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları .....	55
Saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH ve pH stabilitesinin bulunmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar.....	55
Saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin bulunmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar.....	57
Farklı konsantrasyonlarda metal iyonlarının saflaştırılan lipaz enzime etkisini belirlemeye yönelik elde edilen sonuçlar .....	59
Bazı inhibitör etkisi olan kimyasalların saflaştırılan lipaz enzimi aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar .....	60

Farklı konsantrasyonlardaki organik çözücülerin saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar.....	61
<i>Anoxybacillus gonensis</i> UF7 bakteri suşundan saflaştırılan lipaz enzimi üzerine okside edici ajan ve sürfaktanların etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar .....	63
<i>Anoxybacillus gonensis</i> UF7 bakteri suşundan saflaştırılan lipaz enziminin substrat spesifitesini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar.....	64
SONUÇ VE ÖNERİLER .....	66
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	82



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimler .....	6
<b>Tablo 2.</b> Mikrobiyal Enzim Kaynakları ve Kullanım Alanları .....	10
<b>Tablo 3.</b> Bakteriyel Lipaz Kaynakları.....	12
<b>Tablo 4.</b> PCR Reaksiyonu Reaktif Madde İçerikleri .....	30
<b>Tablo 5.</b> 16S rRNA PCR işlemi İçin Uygun Sıcaklık, Süre ve Döngü Sayısı.....	31
<b>Tablo 6.</b> Ligasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar .....	32
<b>Tablo 7.</b> Koloni PCR Reaksiyonunun Bileşenleri .....	33
<b>Tablo 8.</b> Koloni PCR Programı.....	33
<b>Tablo 9.</b> Termofilik Bakterilerin Lipaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	43
<b>Tablo 10.</b> Çalışılan Bakterinin Morfolojik Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	44
<b>Tablo 11.</b> TPP Yöntemi İle Lipaz Enzimi Saflaştırma Sonuçları.....	52
<b>Tablo 12.</b> Amonyum Sülfat ve İyon Değişim Kromatografisi Yöntemleri İle Saflaştırma Sonuçları.....	54

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Lipaz enziminin sentez ve hidroliz reaksiyonu.....	7
Şekil 2. Lipaz enziminin katalizlediği reaksiyon çeşitleri; (a) hidroliz, (b) esterifikasyon, (c) asidoliz, (d) alkoliz, (e) transesterifikasyon, (f) aminoliz.....	8
Şekil 3. Protein tayini için kullanılan standart grafik.....	36
Şekil 4. UF7 bakterisinin tribütirin agar besiyerinde görüntüsü .....	44
Şekil 5. UF7 bakterisinin TSA besiyerindeki görüntüsü.....	44
Şekil 6. <i>Anoxybacillus gonensis</i> UF7'nin 16SrRNA jel görüntüsü .....	45
Şekil 7. Koloni PCR görüntüsü: (M: Markır (BioLabs N0550S) 4 ve 6 pozitif olarak kabul edilen örnekler).....	46
Şekil 8. Filogenetik ağaç .....	46
Şekil 9. TPP metodunda %20 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranlarının <i>Anoxybacillus gonensis</i> UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi .....	48
Şekil 10. TPP metodunda %30 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının <i>A. gonensis</i> UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	48
Şekil 11. TPP metodunda %40 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının <i>A. gonensis</i> UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	49
Şekil 12. TPP metodunda %50 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının <i>A. gonensis</i> UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	49
Şekil 13. TPP metodunda %60 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının <i>A. gonensis</i> UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	50
Şekil 14. TPP metodunda %70 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının <i>A. gonensis</i> UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	50
Şekil 15. TPP metodunda %80 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının <i>A. gonensis</i> UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	51
Şekil 16. <i>A. gonensis</i> UF7 lipaz enziminin saflaştırılmasında TPP metodunda pH'nın etkisi .....	51
Şekil 17. Lipaz enziminin iyon değişim kromatografisi ile elüsyonu gösteren grafik.....	53
Şekil 18. <i>A. gonensis</i> UF7'den TPP yöntemiyle saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü, M: Marker, 1: Homojenat, 2: TPP ara faz, 3: TPP alt faz .....	55

<b>Şekil 19.</b> <i>A. gonensis</i> UF7’den iyon değişim kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü, M: Marker,1: Homojenat, 2: İyon değişim saflaştırması .....	55
<b>Şekil 20.</b> Lipaz enziminin optimum pH ‘sı için oluşturulan aktivite ölçüm grafiği.....	56
<b>Şekil 21.</b> Lipaz enzimi için oluşturulan stabil pH grafiği .....	57
<b>Şekil 22.</b> Lipaz enziminin optimum sıcaklığının ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği .....	57
<b>Şekil 23.</b> Sıcaklığın lipaz enzimi kararlılığı üzerine etkisi.....	58
<b>Şekil 24.</b> Bazı metal iyonlarının lipaz enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	60
<b>Şekil 25.</b> Bazı inhibisyon ajanlarının lipaz aktivitesi üzerine etkisi .....	61
<b>Şekil 26.</b> Organik çözücülerin (%25) lipaz enzimi üzerindeki etkisi.....	62
<b>Şekil 27.</b> Organik çözücülerin (%50) lipaz enzimi üzerindeki etkisi.....	63
<b>Şekil 28.</b> Saflaştırılan lipaz enzimi üzerine okside edici ajan ve sürfaktanların etkisi .....	64
<b>Şekil 29.</b> Lipaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi .....	65

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
BSA	Bovin Serum Albümin
Bç	Baz Çifti
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
E.C.	Enzim komisyon numarası
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EU	Enzim ünitesi
kDa	Kilodalton
M	Molar
mM	Milimolar
mA	Miliamper
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid
<i>pNP</i>	<i>p-nitrofenil</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametilenetilendiamin
V	Volt
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

## GİRİŞ

Mikroorganizmaların, cinsler arasında farklılık gösteren, yüksek gelişim gösterdikleri optimum sıcaklık değerleri vardır. Bazı mikroorganizmalar 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişim gösterebilirken, bazıları ise 100 °C'nin üzerinde gelişim gösterebilmektedir. Bakteriler, en yüksek gelişim gösterdikleri optimum sıcaklıklara göre 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; optimum sıcaklıkları düşük olan psikrofiller, orta derecede olan mezofiller, yüksek olan termofiller, çok yüksek olan hipertermofillerdir. Bakteri grubu içerisinde bulunan termofilik bakteriler gelişim gösterdikleri sıcaklıklara göre üç grupta incelenmektedir. Optimum gelişim sıcaklıkları 65-75°C olan zorunlu veya ekstrem termofiller 40-42°C'nin altında gelişim gösteremezken, fakültatif termofiller hem 50-65°C aralığında hem de 30°C sıcaklıkta gelişim gösterebilmektedir. Termotolerant sınıfında bulunan termofilik bakteri suşlarının maksimum gelişim sıcaklıkları 45-50°C aralığındadır ve 30°C'nin altındaki sıcaklıklarda da gelişim göstermektedir (Başbülül 2001).

Organizmalar, ekstrem koşullara karşı hücresel işlevleri ve metabolik yolları düzenleyerek hayatta kalabilmektedir. Örneğin termofilik bakterilerin hücre zarında bulunan doymuş yağ asitleri, hücre içerisinde hidrofobik bir ortam oluşturur ve yüksek sıcaklıklarda hücre zarının stabil kalmasını sağlar. Ayrıca termofillerin enzim, protein, nükleik asit gibi hücresel bileşenleri de 65-85°C gibi yüksek sıcaklıklara, asidik-alkali koşullara ve protein hidrolizi gibi denatüranlara karşı dayanıklıdır (Haki and Rakshit 2003).

Christian Gottfried Ehrenberg tarafından 142 adet *Bacillus* cinsi mikroorganizma 16S rRNA dizisi ile belirlenmiş, adlandırılmış ve Bakteri (Eubakteri) domainine dahil edilmiştir. *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar: Hareketli, zorunlu veya fakültatif aerob, katalaz pozitif, oksidaz pozitif ya da negatif, endospor oluşturan, Gram pozitif, çoğunlukla çubuk şekilli kemoorganotrof özellikte olan bakteri grubudur (Yılmaz 2006; Vos *et al.* 2011). Biyoteknoloji ve çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan enzimler, *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedir. *Bacillus* cinsine ait bakteriler lipaz, amilaz, pektinaz, kitinaz, ksilanaz, selülaz, proteaz gibi farklı hücre dışı enzimleri üretme yeteneğine sahiptir (Woese Wolfe 1985; Katı *et al.* 2016).

*Bacillus* cinsi bakteriler genellikle mezofilik olduğu gibi, termofil ve psikrofil özelliğe sahip türleri de bulunmaktadır (Todar 2015). 2000 yılında hayvan gübresinden izole edilen *Anoxybacillus* suşunun, fenotipik özellikleri temel alındığında *Bacillus* grubundan ayrılıp, bakteri sistematığına yeni bir cins olarak kaydedilmiştir. *Anoxybacillus* cinsinin tip türü

*Anoxybacillus pushchionensis*'dir. İlk izole edildiğinde anaerob bir bakteri cinsi olduğu düşünüldüğünden, üremesi ve çoğalması için oksijen gerektirmeyen anlamına gelen “anoksi” eki cins isminin başına ilave edilmiş, yapılan çalışmalarda zorunlu anaerob özelliği aerotolerant veya fakültatif anaerob olarak düzeltilmiştir (Pikuta *et al.* 2000)

*Anoxybacillus gonensis* türü; çubuk şeklinde, kolonileri pürüzlü ve krem rengi, Gram pozitif, hareketli, endospor oluşturan bir bakteridir. Fakültatif anaerob olan bakteri oksidaz ve katalaz pozitifdir. Bu tür; 40-70°C arasındaki sıcaklıklarda (optimum 55-60°C), pH 6-10 (optimum 7,5-8,0) aralığında ve optimum %4 tuz konsantrasyonunda gelişim göstermektedir (Belduz *et al.* 2003). *A. gonensis* ile yapılan çalışmada; tribütrin agar besiyerine ekimi gerçekleştirilip, 60°C de üç gün inkübasyona bırakılmış ve besiyerinde oluşan şeffaf zon, bakterinin tributirinin parçalanmasından sorumlu hücre dışı bir enzim ürettiğini göstermiştir. Bu kalitatif test, *A. gonensis*'in kısa zincirli ester bağlarını hidroliz edebilen enzim (lipaz, esteraz ya da türevi) ürettiğini göstermiştir (Faiz *et al.* 2007).

Bu tez çalışması kapsamında, farklı illerden toplanan kaplıca sularından termofilik bakteriler izole edilmiştir. Elde edilen bakteriler, tribütrin agar besiyerine ekilerek lipaz üreten suşların ayrımı sağlanmıştır. Lipaz aktivitesi ölçüm prosesi uygulanarak, en yüksek lipaz aktivitesi gösteren bakteri suşu seçilip, 16S rRNA dizi analizine gönderilmiş ve türün *Anoxybacillus gonensis* olduğu tespit edilmiştir. İzolat için optimizasyon çalışmaları yapıp en yüksek lipaz üretiminin gerçekleştiği optimal şartlar belirlenmiş ve bu optimal şartlar uygulanarak üretilen lipaz enzimi saflaştırılmıştır. Elde edilen saf lipaz enziminin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

## KURAMSAL TEMELLER

### Termofilik Bakteriler ve Sınıflandırma

Sıcaklık, canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için önemli bir faktördür. Bazı canlılar sıcaklığın yüksek olduğu ortamlarda yaşamsal faaliyetlerini yerine getiremezken, bazıları bu sıcaklığa hızlı uyum sağlayabilecek özelliklere sahip olduğu için yaşamlarını çok rahat bir şekilde devam ettirebilir. Termofilik terimi ilk olarak 1879'da Miquel tarafından yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen organizmaları tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Termofilik bakteriler; 45-80°C sıcaklıklarda yaşayan organizmalar olup, yaşam alanları arasında çöller, termal bölgeler, derin kara ve okyanus dipleri gibi jeotermal alanlar bulunmaktadır. Bu bakterilerin 121°C'ye kadar yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmeleri mümkündür (Suddin *et al.* 2019; Gulmus and Gormez 2020; Abdollahi *et al.* 2021).

Ekstremofilik mikroorganizmalar; yüksek- düşük sıcaklık, pH, basınç ve tuzluluk oranlarına sahip olan aşırı ekosistemlerde yaşar ve üç alemde (bakteri, arkea ve ökarya) de üyeler içermektedir. En yüksek büyüme sıcaklıklarına (103-110°C) sahip organizmalar; Archaea'ya ait *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* ve *Melanopyrus* cinslerinin üyeleridir. Mantarlar içinde *Ascomycetes* ve *Zygomycetes* sınıfları, bakterilerde ise *Thermotoga maritima* ve *Aquifex pyrophilus* yüksek büyüme sıcaklığına sahiptir (Mohammad *et al.* 2017; Abdollahi *et al.* 2021).

Termofiller; proteaz, amilaz, lipaz, ksilanaz, pektinaz, kitinaz, selüloz, DNA polimeraz gibi termostabil ve ekstrem koşullarda aktif olabilen enzim üretme potansiyelleri nedeniyle literatürde sıklıkla yer almaktadır. Endüstriyel işlemlerde termostabil enzimlerin kullanılmasının birçok avantajı vardır. En temel avantajlarından bir tanesi; reaksiyon sıcaklığı arttıkça reaksiyon hızının da artmasıdır (Örneğin, 10°C'lik sıcaklık artışı reaksiyon hızını yaklaşık iki katına çıkarır). Termostabil enzimler, daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir ve sıcaklıktaki ani artışları tolere edebilmektedir. Bu enzimler sadece termostabil olmalarıyla değil, aynı zamanda yüksek veya düşük pH, yüksek tuzluluk gibi koşullar altında da aktivitelerini koruyabildikleri için çeşitli endüstriyel proseslerde (tıbbi, kimya, gıda, tekstil, kağıt, deri), biyoteknoloji ve gen mühendisliği alanlarında rahatlıkla kullanılabilir (Abdollahi *et al.* 2021; Gaur *et al.* 2021).

Termofilik bakteriler, ekstrem koşullarda hücre ve molekül fonksiyonlarının bozulmasına engel olacak adaptasyona sahiptirler, bunlar; hücre içeriğinde bulunan yüksek

tuz konsantrasyonu, proteinlerin kuaterner yapıda olması ve hücre membranında bulunan doymuş yağ asitleridir. Termofilik organizmaların hücresel elemanları ve hücresel bileşenleri (enzimler, proteinler, nükleik asitler gibi) 65-85 °C gibi yüksek sıcaklığa dayanıklılık göstermektedir. Aynı zamanda ekstrem asidik ve alkali şartlar gibi denatüre edicilere ve proteolize karşı dayanıklıdırlar. Ayrıca hipertermofil bakterilerin tümünde ve bazı termofilik bakterilerde bulunan pozitif süper sarmal DNA oluşumunu ve DNA'daki bağlantı sayısının artmasını sağlayan reverse giraz (RG) enzimi çift zincirli DNA'yı sıcaklığın neden olduğu denaturasyona karşı korumaktadır (Kumar and Nussinov 2001; Haki and Rakshit 2003; Inan 2011).

Bütün bakterilerde ortak bulunan, şaperon adı verilen ısı-şok proteini termofilik bakterilerde çokça üretilmektedir. Bu moleküller, denatüre olan proteinlerin tekrar eski formda katlanmalarını sağlayarak, özelliklerini yeniden kazandırmaktadır (Macario and de Macario 2002) Termofiller, sıcaklık değişimlerine uyum sağlayamayan organizmaların kullandığı elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara tolerans göstermektedir (López-García 1999). Hipertermofilik bakteriler, yüksek sıcaklıklarda erimeye karşı mikroorganizmayı daha dirençli hale getiren tek tabaka lipid yapıda bir membrana sahiptir. Arkealar, hücre membranının yanında içerdikleri eter lipidleri ile sıcaklığa ve degradasyona karşı dirençli hale gelmektedir (Daniel and Cowan 2000). Termofilik bakterilerin yaşadıkları ortama uygun olarak, RNA yapısı da diğer bakterilere göre farklılık gösterir. Termofilik RNA'ların yüksek sıcaklıklardaki stabilitesini; zengin GC içeriğine sahip olması, özel posttranskripsiyonel modifikasyonlar ve protein bağlanma bölgelerindeki değişimler sağlamaktadır (Fang *et al.* 2001).

Bakterileri, geleneksel yollar olan; morfolojik, metabolik ve fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırmak farklı bakteri türleri arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koymakta yetersiz kalmaktadır. Nükleik asitlerin dizi analiz verilerini temel alan; mikrobiyal sistematığın filogeniye dahil olmasıyla mikroorganizmalar evrimsel özelliklerine göre sınıflandırılabilmiştir. Bu sayede klasik testlerin uzun süren deneyleri, daha fazla iş gücü gerektirmesi, tecrübeli araştırmacılara ihtiyaç duyması, pahalı olması ve elde edilen sonuçların yoruma açık olması gibi dezavantajları yerini moleküler yöntemlere bırakmıştır. Bu yöntemde lipidler, proteinler, karbonhidratlar, DNA-RNA çalışma materyali olarak kabul edilir ve bunlardan birinin veya birleşimleriyle oluşan kombinasyonların kullanımıyla, mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonu gerçekleştirilir (Adıgüzel 2006).

Sistematik, organizmaların çeşitliliğini ve onların çevreleriyle olan ilişkilerini çalışarak, organizmaları karakterize eden, adlandıran ve tanımlanmış pek çok özelliğe göre

gruplandırılan taksonomi bilimi ile filogeni arasında ilişki kurmaktadır. Bakteriyel taksonomide genel teşhis ve tanımlamada pratik açıdan genellikle fenotipik özelliklerden yararlanılmaktadır. Taksonomi, birbiriyle bağlantılı olan sınıflandırma, isimlendirme ve tanımlama olarak üç alt bilim dalından oluşmuştur. Taksonominin mevcut faktörlerinden birincisi, türlerin ve temel taksonomik birimlerin belirlenmesi ve bu birimleri sıralamak için uygun bir ilerleme planının yapılmasıdır. İkincisi, adlandırmadır ve taksonomik bir düzenin oluşturulması için terimler ve kurallardan oluşmaktadır. İsimlendirilmenin doğru bir şekilde yapılması için International Nomenclature of Bacteria'da söz edilen uluslararası kurallar ve tanımlanan isimler kullanılmaktadır (Baltacı 2015).

## **Enzimler**

Enzim terimi ilk defa 1877'de fizyoloji profesörü olan Wilhelm Friedrich Kuhne tarafından kullanılmıştır. Enzim, biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör görevi gören, canlı organizmalarca üretilen, reaksiyonun başlaması için aşılması gereken aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandıran ve reaksiyon sonucu herhangi bir değişikliğe uğramadan çıkan biyomoleküldür (Gurung *et al.* 2013; Singh *et al.* 2016). Enzimler substratlarına spesifiktir ve kimyasal katalizörlere göre yüksek faaliyet göstermeleri yönüyle daha avantajlıdır. Enzim etkinliği ise substrat-enzim konsantrasyonuna, pH ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır (Javed *et al.* 2018). Enzimler hücre içerisinde gerçekleşen reaksiyonları katalizlemenin yanında; protein yıkımı, DNA'nın sentez-yıkım işlemleri, protein taşınması, sindirim, sinirsel uyarıların iletimi, sentez reaksiyonları, apoptosis mekanizması gibi önemli birçok olayın gerçekleştirilmesinde görev alır ve katalizledikleri reaksiyona özgüdürler (Whitford 2013).

Hücrelerde önemli metabolik faaliyetleri üstlenen enzimlerden, amaçlanan istekler doğrultusunda günlük hayatta da yararlanılmaya başlanmıştır (**Tablo1**). Tıpta teşhis ve tedavide, temizlik malzemelerinde (1915 yılında Rahm tarafından yapılan çalışmada, lipaz ve proteaz enzimlerini, etken bir temizleyici olarak çamaşır yıkama sularına katmıştır), alkollü içecek, meyve suyu- süt üretiminde, ekmek- peynir yapımında, bebek gıdalarında, kimyada, kâğıt-kauçuk üretiminde, fotoğraf endüstrisinde, ziraat alanında, biyolojik savaşlarda, biyopolimer ve biyoyakıt üretimi gibi çok geniş alanlarda enzimlerden yararlanılmaktadır. Enzimlerin çok tercih edilmesinin nedeni; ucuz maliyetli olması, hücre dışı ortamlarda aktif olarak çalışabilmeleri, alerjik veya toksik etkilerinin olmamasıdır (Sevinç 2010).

**Tablo 1.** Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimler (Inan 2011).

ENZİMLER	SICAKLIK ARALIĞI(°C)	REAKSİYONLAR	KULLANIM ALANLARI
Amilolitik	90-100	Polisakkarit→disakkarit, monosakkarit	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda ve içecek endüstrisi, tatlandırıcı yapımı
Ksilanaz	45-105	Kraft hamuru→ksilan+lignin	Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisinde
Kitinazlar	65-75	Kitin→kitobioz Kitin→N-asetilglukozamin Kitin→deasetilaz	Gıda, kozmetik, ilaç, çimento endüstrisi, atık su temizlenmesi ve kâğıt üretimi
Selülaz	45-95	Selüloz→glukoz	Deterjan ve tekstil endüstrisi, çöp ve atıkların işlenmesi
Proteaz	65-85	Protein→peptit ve aminoasitler	Fırıncılık, mayalanma, deterjan, gıda, ilaç ve deri endüstrisi
Lipazlar	30-70	Yağ uzaklaştırılması, hidrolizis, alkolizis, aminoizis	Süt, deterjan, kâğıt, ilaç, kozmetik, deri ve tekstil endüstrisi
DNA Polimeraz	90-95	DNA replikasyonu	Genetik mühendisliği, PCR

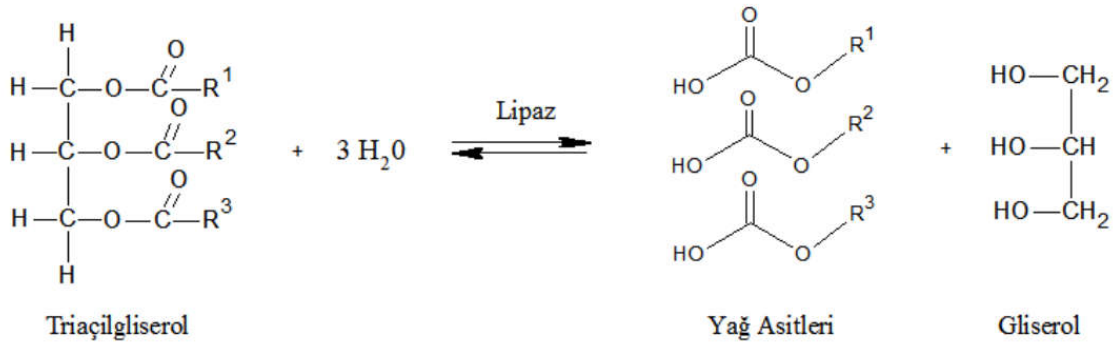
2016 yılında, endüstriyel enzimlerin piyasa değeri 4,61 milyar dolarken 2017- 2022 yılları arasında %5,8'lik bir büyüme ile 6,3 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Piyasadaki en büyük payın ise 2,3 milyar dolar ile gıda-içecek endüstrisinde olması beklenmektedir (Deckers *et al.* 2020).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ile müzakere ederek, enzimleri sistematik olarak adlandırıp sınıflandıran Uluslararası bir Enzim Komisyonu kurmuştur (Singh *et al.* 2016). Bu komisyona göre enzimler katalizledikleri ana reaksiyonlara göre kodlanıp, 6 sınıfa ayrılmıştır ve 2018'de yedinci grup olarak translokazlar eklenmiştir. Bunlar:

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon reaksiyonları, elektronların bir molekülden diğerine transferini içermektedir. Bu sınıftaki enzimler, dehidrojenazlar olarak adlandırılmaktadır.
2. Transferazlar: Bu enzimler, atom gruplarının bir molekülden diğerine transferini katalizlemektedir.

3. Hidrolazlar: Hidrolazlar, substratların su ile ayrışmasını katalize ederler. Hidrolazlar tarafından büyük moleküller küçük parçalara ayrılmaktadır.
4. Liyazlar: Bu enzimler, grupların çift bağlara eklenmesini veya grupların çıkarılmasıyla çift bağların oluşumunu katalizlemektedir. Oluşturulan bağlar, hidrolizden farklı bir yöntem kullanılarak ayrılmaktadır.
5. İzomerazlar: Grupların molekül içinde konumlarının transferini katalize ederler.
6. Ligazlar (Sentetazlar): Ligazlar, moleküller arası yeni kovalent bağlar ile bağ gruplarının oluştuğu biyosentetik reaksiyonları katalizlemektedir (Gurung *et al.* 2013).
7. Translokazlar: İyonların veya moleküllerin hücre zarı boyunca hareketini veya bunların zarlar içinde ayrılmasını katalize ederler (Tipton and McDonald 2018).

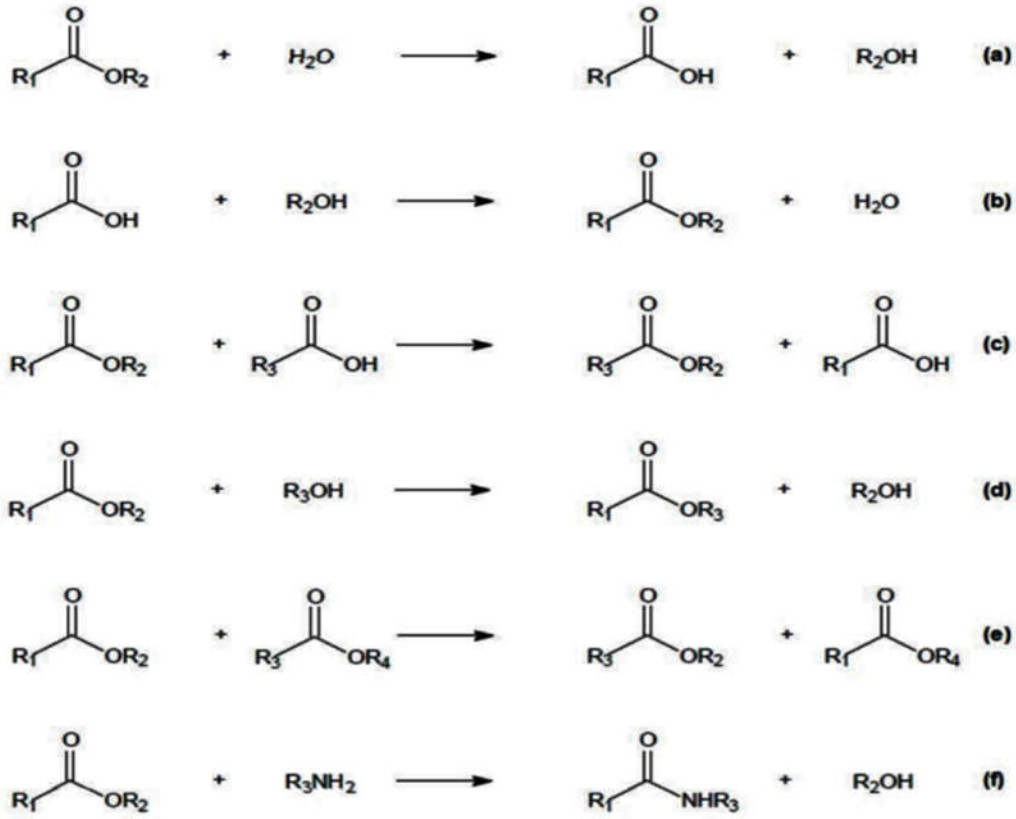
Gliserol ester hidrolaz ya da triaçilgliserol açilhidrolaz olarak adlandırılan lipazlar (E.C.3.1.1.3), hidrolaz grubuna aittir ve katalizledikleri reaksiyonlar çift yönlüdür. Yani triaçilgliserollerin; digliserid, monogiliserid, serbest yağ asiti, gliserole hidrolizini katalizlerken, aynı zamanda sulu veya susuz ortamda bu reaksiyonun tersini de (yağ sentez reaksiyonunu) sentezleyebilmektedir (Javed *et al.* 2018).



**Şekil 1.** Lipaz enziminin sentez ve hidroliz reaksiyonu (Ekinci 2015)

Literatür verileri incelendiğinde, lipazların  $\alpha/\beta$  hidrolaz süper ailesi üyelerinden olduğu, aktif nükleofilik serin kalıntısı bulunduğu, neredeyse bütün lipazlarda (Yalnızca *Candida antartica*'dan elde edilen lipaz enzimi, korunmuş olan bu peptid dizisine sahip değildir) korunmuş olan Gly-X-S-X-Gly pentapeptid yapısını oluşturan aminoasit dizilimine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu pentapeptidi oluşturan aminoasit dizisinin etrafında konumlanan diğer aminoasit rezidüleri, mikrobiyal lipazlar arasında akrabalık düzeyinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Lipaz enziminin aktif bölgesi; serin, histidin, aspartik veya glutamikasit aminoasitlerinden oluşur ve bu aktif bölgeyi amfifilik  $\alpha$  heliks peptidinden oluşan bir kapak kaplamaktadır. Ayrıca lipazlarda, trigliseridler için 4 substrat bağlanma cebi

(oksianyon deliği, sn-1, sn-2, sn-3) bulunmaktadır. Esterazların bir alt sınıfı olan lipazları kodlayan genlere, bakteri ve mantarlarda rastlanıldığı gibi bu genlerin bazı virüslerde de bulunduğu tespit edilmiştir (Kapoor and Gupta 2012; Gurung *et al.* 2013; Masomian *et al.* 2016; Javed *et al.* 2018). Lipazlar; hidroliz, alkoliz, asidoliz, aminoliz, esterifikasyon, transesterifikasyon ve interesterifikasyon olmak üzere 6 farklı reaksiyonu katalizlemektedir (Davranov 1994; Savitha *et al.* 2007)



**Şekil 2.** Lipaz enziminin katalizlediği reaksiyon çeşitleri; (a) hidroliz, (b) esterifikasyon, (c) asidoliz, (d) alkoliz, (e) transesterifikasyon, (f) aminoliz (Gül 2013)

Lipazların önemli özellikleri şu şekildedir:

1. Bir çok substrata spesifik olarak bağlanma özelliğine sahiptir (Aulakh and Prakash 2010).
2. Hem hidroliz hem de sentez reaksiyonlarında kemoselektivite, regioselektivite ve stereoselektivite gösterdiklerinden farmasotik ve tarım endüstrisinde optik olarak aktif bileşiklerin üretimi için çok fazla kullanılmaktadır (Snellman *et al.* 2002).
3. Mantarlar, mayalar ve bakteriler tarafından ucuz maliyetli ve büyük miktarlarda üretilmektedir (Gül 2013).

4. Birçok lipazın kristal yapıları, X-ışını kristalografisi ile çözümlenerek; belirlenen amaç doğrultusunda protein mühendisliğiyle yapılmaktadır (Kapoor and Gupta 2012; Javed *et al.* 2018).
5. Enzim, aktif hale gelmek için kofaktör gerektirmezken aynı zamanda yan reaksiyonları da katalizleyebilmektedir.
6. Organik çözücülere karşı, enzim kararlılığını korumaktadır (Jaeger and Eggert 2002).

### **Mikrobiyal Lipazlar**

Mikroorganizmalar; ucuz besin maddeleri ile kolayca üretilme, yüksek stabiliteye sahip önemli enzimler üretebilme, kültür ortamından kolayca ayrıştırılabilme ve genetik modifikasyonlara açık organizmalar oldukları için endüstriyel ve biyoteknoloji alanlarında bitki ve hayvanlara göre çok daha avantajlı olmaktadır. Bu gibi alanlarda kullanılacak olan mikroorganizmaların, yalnızca enzim üretme yetenekleri değil patojen veya toksik olmama özellikleri de araştırılır. Ayrıca endüstri alanında kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mikrobiyal kökenli olduğu için, lipaz enzim üretiminde de mikroplardan yararlanılmaktadır (Demain and Solomon 1981; Destain *et al.* 2005; Kıran *et al.* 2006). Enzim aracılı proselere; azaltılmış işlem süresi, daha düşük enerji ihtiyacı, ucuz maliyetli olmaları, sağlığa zararlı olmayan ve çevre dostu özellikleri nedeniyle sıklıkla başvurulmaktadır (Li *et al.* 2012; Choi *et al.* 2015).

Lipazlar hayvan, bitki ve çok çeşitli mikroorganizma türlerinde bulunmaktadır. Mikrobiyal kökenli lipazlar; kolay ve ucuz yöntemlerle elde edilebilme, düşük maliyetli ekstraksiyon, sıcaklık-pH stabilitesi, her reaksiyon türüne göre substratlarına özgü olmaları, organik çözücülerde korudukları stabil aktiviteleri, yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları ve istenmeyen yan ürün oluşturmaması gibi özellikleriyle, diğer lipazlara kıyasla avantajlı hale gelmektedir (Jaeger and Reetz 1998; Aulakh and Prakash 2010). Günümüzde çalışılan lipazların çoğu mantar ve bakteri kaynaklı mikrobiyal lipazlardır. Özellikle fungal kaynaklı *Candida*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Thermomyces* gibi cinslerde bulunan lipazlar ile bakteriyel kaynaklı *Pseudomonas* cinsinde bulunan lipazlar saflaştırılıp çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (Arpigny and Jaeger 1999).

**Tablo 2.** Mikrobiyal Enzim Kaynakları ve Kullanım Alanları (Bharathi and Rajalakshmi 2019)

ELDE EDİLDİĞİ KAYNAK	MİKROORGANİZMA	KULLANILDIĞI ALAN
MAYA	<i>Candida</i> sp.	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
	<i>Cryptococcus</i> sp.	Mikrobiyal Tip Kültür Koleksiyonu
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Mikrobiyal Tip Kültür Koleksiyonu
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Zeytinyağı
	<i>Trichosporon asahii</i>	Petrolle kirlenmiş toprak
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
	<i>Yamadazyma terventina</i>	Zeytinyağı
FUNGUS	<i>Rhizopus oryzae</i>	Atık yağla kontamine olmuş toprak
	<i>Rhizopus</i> sp.	Yağla kontamine toprak
	<i>Penicillium</i> sp.	Soya yemeği ve peynir
	<i>Penicillium chrysoenum</i>	Endüstriyel atıklar
	<i>Meterhizium anisopliae</i>	Süt atıkları
	<i>Aspergillus niger</i>	Endüstriyel Mikroorganizmaların Ulusal Koleksiyonu
BAKTERİ	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Et fabrikası buzdolabı
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Toprak numunesi
	<i>Thalassospira permensis</i>	Deniz suyu
	<i>Staphylococcus warneri</i>	Yağla kontamine toprak
	<i>Enterococcus durans</i>	Balık işleme atıkları
	<i>Bacillus subtilis</i>	Fars Tipi Kültür Koleksiyonu
	<i>Bacillus</i> sp.	Yağla kontamine toprak
	<i>Bacillus sphaericus</i>	Mikrobiyal Tip Kültür Koleksiyonu
	<i>Acinetobacter</i> sp.	Petrolce zengin toprak
	<i>Aeromonas caviae</i>	Süt işleme endüstrisi

Mikrobiyal lipaz kaynakları; endüstriyel atıklardan, süt ürünlerinden, bitkisel yağ işleme fabrikalarından, yağ ihtiva eden tohumlardan, yağ ile kirlenmiş topraklardan, kompost yığınlarından, çürümüş gıda ürünlerinden ve çeşitli çevrelerden izole edilebilmektedir (Gül 2013; Muthazhagan and Thangaraj 2014). İzole edilen bu mikroorganizmalar, direkt ve indirekt yöntem ile farklı substrat maddeleri bulduran katı agar ya da sıvı besiyerinde geliştirilebilmektedir (Bharathi *et al.* 2019). Son yıllarda yapılan çalışmalar, azot-karbon kaynağı, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, çözülmüş oksijen konsantrasyonu ve lipit

kaynakları gibi birçok çevresel parametrenin fungal lipaz enzim üretimini etkilediğini göstermiştir (Sharma *et al.* 2001). Termofilik fungal lipaz üreticilerinden *Mucor pusillus*, *Rhizopus homothallicus* ve *Aspergillus terreus*, termostabil hücre dışı lipaz üreticisi olarak bildirilmiştir (Singh and Mukhopadhyay 2012). Fungal lipazlar istikrarları, seçiciliği ve geniş substrat özgülüğü nedeniyle birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Wiseman 1975). Lipaz enzim üretimi için genel funguslar tercih edilirken, saflaştırma ve üretimde sağladıkları kolaylık nedeniyle filamentli funguslar son zamanda ön plana çıkmaktadır (Pandey *et al.* 2016; Roy *et al.* 2021).

Birçok bakteri iyi birer lipaz üreticisidir. Zorlu endüstriyel ortam şartlarına karşı dayanıklı olma, kolay elde edilebilme, heterojen ortamlarda çalışabilme, geniş ölçekli substrat özgülüğü, pH toleransı ve yüksek sıcaklıklarda gelişim gösterebilme gibi özellikleri nedeniyle de endüstride tercih edilmektedir (Hasan *et al.* 2006; Ramani *et al.* 2010; Gupta *et al.* 2015; Javed *et al.* 2018). Bakteriyel lipazların çoğu hücre dışı üretilir ve sıcaklık, pH, azot ve karbon kaynağı, lipid varlığı, inorganik tuzlar, çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi beslenme ve fiziko-kimyasal faktörlerden büyük ölçüde etkilenir (Jaeger *et al.* 1999; Gupta *et al.* 2004; Vasudevan 2004).

Endüstriyel proseslerde kullanılan, taksonomik olarak birbirine yakın bakteriyel suşlar birbirlerinden farklı türde lipaz enzim üretimi gerçekleştirebilir. En yaygın lipaz üreten cins, *Bacillus*'tur ve *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* türleri çeşitli endüstriyel ve biyoteknolojik çalışmalarda yer almaktadır (Iizumi *et al.* 1990; Gupta *et al.* 2004; Guncheva and Zhiryakova 2011; Suci *et al.* 2018).

**Tablo 3.** Bakteriyel Lipaz Kaynakları (Gupta *et al.* 2004; Javed *et al.* 2018)

BAKTERİ KAYNAĞI	REFERANS	BAKTERİ KAYNAĞI	REFERANS
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	(Bakir and Metin 2016)	<i>Enterococcus faecium</i>	(Ramakrishnan <i>et al.</i> 2016)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	(Cherif <i>et al.</i> 2011)	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	(Dror <i>et al.</i> 2015)
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	(Bhavani <i>et al.</i> 2013)	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	(Kapoor and Gupta 2012)
<i>A. denitrificans</i>	(Odera <i>et al.</i> 1986)	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	(Abol Fotouh <i>et al.</i> 2016)
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	(Masomian <i>et al.</i> 2016)	<i>Lactococcus chungangensis</i>	(Konkit <i>et al.</i> 2016)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i>			(Akbar <i>et al.</i> 2014)
<i>Bacillus licheniformis</i>	(Ashfaq 2014)	<i>Micrococcus luteus</i>	
<i>Bacillus aerius</i>	(Saun <i>et al.</i> 2014)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Mobarak-Qamsari <i>et al.</i> 2011)
<i>Bacillus smithii</i>	(Lailaja and Chandrasekaran 2013)	<i>Pseudomonas putida</i>	(Ananthi <i>et al.</i> 2014)
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	(Tripathi <i>et al.</i> 2014)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	(Zheng <i>et al.</i> 2012)
<i>Burkholderia ubonensis</i>	(Yang <i>et al.</i> 2016)	<i>Pseudomonas luteola</i>	(Ribeiro <i>et al.</i> 2011)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	(Bajaj <i>et al.</i> 2010)	<i>Staphylococcus sp.</i>	(Daoud <i>et al.</i> 2013)
<i>Staphylococcus warneri</i>	(Yele and Desai 2015)	<i>Streptomyces lividans</i>	(Wang <i>et al.</i> 2016)
<i>Xanthomonas oryzae</i>	(Mo <i>et al.</i> 2016)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	(Ji <i>et al.</i> 2015)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Lopes <i>et al.</i> 2002)	<i>P. pseudomallei</i>	(Kanwar and Goswami 2002)

Genel olarak lipaz üretimi için; organik azot kaynağı, yağ, yağ asidi ve gliserol gibi lipidik bir karbon kaynağının bulunması yeterlidir. Lipaz enzim üretimi “submerged fermantasyon (SMF)” sistemi olarak adlandırılan lipaz sıvı besiyerinde ve “solid state fermantasyon (SSF)” olarak adlandırılan katı hal fermantasyon sisteminde gerçekleştirilir. Sıvı lipaz besiyerinde karbon kaynağı olarak çeşitli sıvı yağlar kullanılırken, katı lipaz besiyerinde farklı substratlar bulunmaktadır. Enzim üretiminde sıklıkla sıvı besiyeri tercih edilmektedir, bunun en önemli sebebi de mikroorganizmanın kolaylaşan yetiştirilme koşulu ve bu sistemde üretilen enzimlerin çoğunun ekstraselüler olması nedeniyle kolayca saflaştırılabilmesidir (Ramos-Sánchez *et al.* 2015).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin, hücre dışına salgılanması için optimum sıcaklık esastır (Bharathi *et al.* 2019). Özellikle, termofillerden üretilen termofilik lipazlar, yüksek sıcaklık altında, organik çözücüler- deterjanların varlığında çok iyi katalitik aktivite ve stabilite sergilemektedir (Li and Liu 2017; Shahinyan *et al.* 2017; Atalah *et al.* 2019). Bu lipazlar, kimyasal denatürasyona karşı da dirençli oldukları için endüstriyel proseslerde önemli rol oynamaktadır. Oda sıcaklığının üzerinde erime noktasına sahip yağlar, lipitler ve içeriğinde bol miktarda yağ ihtiva eden endüstriyel atıklar yüksek sıcaklıklarda enzimatik olarak işlenmektedir. Artan ortam sıcaklığı mezofilik kaynaklardan elde edilen enzimin katalizini engellerken, termostabil lipaz enzimleri aktivitelerini korumaktadır (Kim *et al.* 1994; Schmidt-Dannert *et al.* 1994; Rúa *et al.* 1997). Örneğin, *Alcaligenes* sp.'den elde edilen termofilik lipaz enzimi, 60–70 °C'lik optimal sıcaklık, asit-alkali ortamın zorlu reaksiyon koşullarında mükemmel katalitik aktivite ve stabiliteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Liu *et al.* 2021).

### **Lipazların Kullanım Alanları**

Lipaz enzimi, özgüllüğü, yüksek sıcaklığa dayanıklı olması, geniş pH aralığında stabil kalması, toksik olmaması ile endüstriyel ve biyoteknoloji alanlarında en önemli üç temel enzimden biri haline gelmiştir (Verma and Kanwar 2008). Enzimler, milyarlarca dolarlık bir pazar payına sahiptir. Önemli enzimlerden olan lipazlar, genellikle; deterjan, gıda, ilaç, peptit sentezi, yağ hidrolizi, kozmetik, kâğıt endüstrisi, biyosensör yapımı, atık arıtımı, biyobozunum, tıp ve ilaç sanayisi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Jaeger and Reetz 1998; Doukyu and Ogino 2010; Choudhury and Bhunia 2015). Lipaz enzimi, substrata özgül olma ve çeşitli organik çözücülerde spesifik olarak bölgesel seçici reaksiyonlar gerçekleştirebilme gibi eşsiz yetenekleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda önemli bir biyokatalizör olmuştur (Pandey *et al.* 1999).

Geçmiş yıllarda atıklar, kazılan çukur içerisine gömülerek ortadan kaldırılmış, ancak her seferinde boşaltılacak yeni bir yer bulma zorluğu ve çöp imha yöntemindeki eksiklikler nedeniyle yeni yöntemler araştırılmıştır. Yüksek sıcaklıkta yakma ve kimyasal ayırma kullanarak atıkları arıtma için yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin, çevreye verdikleri zarar ve pahalılık gibi dezavantajları nedeniyle, kirleticileri uzaklaştırmak için mikroorganizmaların kullanıldığı biyoremediasyon alternatif yöntem haline gelmiştir. İlk zamanlarda, *C. rugosa'* dan elde edilen lipaz, yüzeyden yağ çıkarmak için kullanılmıştır (Bailey and Ollis 1986). Daha sonraki dönemde ise lipazın evsel atıklar, kümes hayvan atıkları ve endüstriyel atıklar dahil olmak üzere atık su arıtımı için kullanılabileceği keşfedilmiştir (Arora *et al.* 2020).

Lipaz enzimi, tıpta bazı hastalıkların teşhisinde kullanılan önemli bir enzimdir. Örneğin; *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin neden olduğu tüberküloz hastalığını teşhis etmek için kullanılır. Bakteride bulunan lipaz enzimi, sadece tüberküloz teşhisinde değil, akut pankreatit tespiti, kötü huylu tümör tedavisinde yüksek özgüllük ve duyarlılıkla çalışmaktadır. Endüstriyel olarak lipazlar, atık yağların gideriminde, polyester atıklarının uzaklaştırılmasında, su arıtımında, biyoremediasyon proseslerinde kullanılmaktadır (Pandey *et al.* 1999; Nagarajan 2012).

### **Lipaz Enziminin Bazı Biyoteknolojik Uygulamaları**

Canlı organizmalar kullanılarak üretilen polimerlere, biyopolimer ismi verilmektedir ve polifenoller, polisakaritler, polyesterler gibi çeşitleri bulunmaktadır. Biyopolimerin enzim katalizli sentezi, polimer yapısının mükemmel seçiciliği ve kontrolü, biyolojik olarak parçalanabilmeleri, yenilenebilir doğal kaynaklardan üretilmeleri nedeniyle yeşil kimyanın büyüyen bir alanı haline gelmiştir.

Polimerizasyon koşullarının kontrol edilebilir olması ve saflaştırma maliyetinin azlığı, lipazlar tarafından katalize edilen biyobozunur polimer sentezini arttırmaktadır. Lipaz enziminin, stereo seçiciliğinin optik olarak aktif polimerlerin sentezi için faydalı olduğu bulunmuştur ve lipazların biyopolimer üretimindeki en büyük avantajı, yüksek seçicilikleridir (Ghosh *et al.* 1996; Gross *et al.* 2001; Einbu and Vårum 2008; Sandoval *et al.* 2010).

Fosil yakıtların çevreye olan zararlı etkileri ve azalan arzları nedeniyle; alternatif veya yeni enerji kaynaklarına olan ilgi artmaktadır. Biyodizel, toksik olmayan, yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen, alternatif bir enerji kaynağıdır. Genellikle katı ve bitkisel yağların alkol (genellikle metanol veya etanol) ile bir katalizör (kimyasal ya da biyokatalizör) varlığında transesterifikasyonu ile elde edilen bir biyoyakıttır (Luque *et al.* 2010; Almeida *et al.* 2012; Malekabadi *et al.* 2018). Biyodizel üretimi, enzimatik ve kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilir. Kolay üretimi ve saflaştırma yönteminin basit olması nedeniyle enzimatik üretim biyodizelde ilk tercih haline gelmiştir (Dizge *et al.* 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalar, lipaz katalizli transesterifikasyon ile üretilen biyodizelin daha avantajlı olduğunu, gliserolün kolay bir şekilde geri kazanıldığını ve saflaştırma işleminin daha kolay olduğunu ortaya koymuştur. Biyodizel üretiminde kullanılan lipaz enzimi; yağın su içeriğini tolere eder, sabun oluşumunu engeller ve biyodizel verimini artırır (Vicente *et al.* 1998; Arica *et al.* 2000).

Biyolojik bir komponenti bir detektörle birleştirerek, aranan maddenin varlığını saptamak amacıyla oluşturulan cihaza biyosensör denir. Biyosensör genellikle biyo-reseptör

(enzim/antikor/hücre/nükleik asit/aptamer), dönüştürücü bileşen, sinyal okuyucu, işlemci ve sonuçların okunabileceği ekranı içeren elektronik sistemden oluşmaktadır (Turner *et al.* 1987; Banica 2012; Dincer *et al.* 2019; Kaur and Shorie 2019). Lipazlar, trigliserolün nicel tespiti için sensör olarak verimli, hızlı ve doğru bir seçimdir. Biyosensör olarak lipaz enzimini kullanmanın nedeni, analitik örnekte bulunan trigliserolden gliserol üretmek ve üretilen gliserolü enzimatik bir yöntemle nicelleştirmektir. Örnek olarak lipaz ve glukoz oksidaz enzimi bir kombinasyon halinde pH/oksijen elektrotları üzerine immobilize edilerek, lipit biyosensörü olarak işlev görür ve trigliseritlerle kan kolesterol tayininde kullanılabilir (Hasan *et al.* 2006; Singh and Mukhopadhyay 2012).

### **Lipaz Enziminin Endüstriyel Uygulamaları**

Lipazlar, endüstride çeşitli kimyasalların üretiminde, sentez proseslerinde, modifikasyon işlemlerinde, kozmetikte, gıda sektöründe ve buna benzer farklı alanlarda kullanılmaktadır. Lipazların kullanıldığı endüstriyel uygulamalara örnek olarak;

- ❖ Kâğıt ve deri endüstrisinde kimyasal sentezde,
- ❖ Eczanede ilaç üretiminde,
- ❖ Kozmetik endüstrisinde ürün eldesinde,
- ❖ Sabun ve diğer temizlik maddelerinin üretiminde,
- ❖ Uçucu yağları işleyerek; koku ve aroma maddelerini sentezlemede,
- ❖ Yağ asiti ve gliserin üretiminde,
- ❖ Yağ işlemede,
- ❖ Yağın hidrolizinde,
- ❖ Organik çözücülerin kimyasal sentezinde,
- ❖ Yağ asiti ve trigliseritlerin modifikasyonunda,
- ❖ Yüksek kaliteli kimyasalların üretimi; terapötik ajanların, herbisitlerin, pestisitlerin ve gıda tatlandırıcı ajanların üretiminde,
- ❖ Deterjan endüstrisinde; çıkarılması zor olan yağlı lekelerin hidroliz reaksiyonlarıyla çıkarılması için soğuk aktif deterjanların üretilmesinde,
- ❖ Gıda sektöründe; ekmek yapımında (hacmini artırmak ve yumuşatmak için), tereyağında (aroma verici olarak) ve diğer gıdalarda,
- ❖ Meyve suları, çorbalar, soslar, peynirler ve pişmiş gıdaların raf ömrünü uzatmak ve lezzetini artırmak için de kullanılabilir (Ghosh *et al.* 1996; Jaeger and Eggert 2002; Saxena *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2009; Ray 2012; Parra *et al.* 2015).

## Enzimlerin Saflaştırılması

Enzim saflaştırmanın amacı; sadece enzimi diğer bileşenlerden ayırmak değil, aynı zamanda enzimlerin özelliklerini, yapı ve konformasyonel niteliklerini, aktivitesini, raf ömrünü ve çeşitli uygulama alanlarını belirlemektir (H. Nadeem *et al.* 2015; U. Nadeem *et al.* 2015). Endüstriyel amaçlar için kullanılan enzimlerin, arıtma prosesi hızlı, ucuz, verimli ve büyük ölçekte uygulanabilir olmalıdır. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin saflaştırılması, hücre dışı mı yoksa hücre içi mi olduklarına bağlıdır (Yang *et al.* 2016). Amonyum sülfat çöktürmesi, geleneksel saflaştırma yöntemi olarak bilinir ve alternatif yöntemlerin erken aşamalarında kısmi saflaştırma olarak kullanılmaktadır (Saxena *et al.* 2003). Hangi saflaştırma yönteminin uygulanacağı, enzim üreten mikroorganizmaya ve mikroorganizmanın ürettiği protein miktarına bağlıdır (Rathi *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2012; Unni *et al.* 2016).

Enzim saflaştırma için kullanılan yöntemler:

- ❖ Afinite kromatografisi
- ❖ İyon değişim kromatografisi
- ❖ Jel filtrasyon kromatografisi
- ❖ Su iki fazlı sistem (ATPS)
- ❖ Üç fazlı ayırma sistemi (TPP)
- ❖ Tersinir misel sistemi
- ❖ İmmünopürifikasyon

### Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi, moleküler konformasyona bağlı bir saflaştırma yöntemi olup protein saflaştırması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Farklı proteinler için farklı kromatografi reçineleri kullanılır ve en yaygın olarak kullanılan adsorbanlar, enzim substratları, koenzimler, inhibitörler, efektörler ve antijenler gibi doğal ligandlardır (Fang *et al.* 2018). Afinite kromatografisinde; kullanılan reçinelerin yüzeyinde, saflaştırılacak proteinlere özgül ligandlar bağlıdır. Bu ligandlara afinitesi olan proteinler kolona bağlanırken reçinede bağlı ligand için afinitesi olmayan tüm proteinler doğrudan kolondan geçerler. Daha sonra liganda bağlanan enzim pH'nın veya tuz konsantrasyonunun değiştirilmesiyle saflaştırılır (Cuatrecasas *et al.* 1968).

### İyon değişim kromatografisi

Gelişmiş bir saflaştırma yöntemi olan iyon değişim kromatografisiyle, proteinlerin yüksek oranda saflaştırılması sağlanmaktadır. Yöntem, sabit fazda taşınan, hareketli faz içerisinde yer alan enzimlerin farklı dağılım ilkesine göre çalışmaktadır. Enzimlerin

kromatografik ayrımı, enzim ile moleküler ağırlık, iyonik yük, hidrofobiklik ve afinite gibi sabit faz materyali arasındaki etkileşime bağlıdır (Saxena *et al.* 2003). Bu kromatografik yöntemde ise; kolon dolgusu ile saflaştırılacak numune arasında iyonik bir etkileşim vardır (Jungbauer and Hahn 2009). Proteinler, karakteristik olarak incelendiğinde; izoelektrik noktasındaki net yükleri sıfırken, izoelektrik noktasından daha asidik bir ortamda pozitif, daha alkali bir ortamda ise negatif yüklerle yüklendiği gözlenmiştir. İyon değişim kromatografisinde, saflaştırılmak istenen protein molekülü belirli bir pH ve tuz konsantrasyonunda iyonik etkileşimler yoluyla kolon dolgu materyaline bağlanmaktadır. Arttırılmış tuz konsantrasyonu, pH veya her iki parametre kullanılarak, kolon paketine bağlanan protein kademeli olarak kolondan ayrılmaktadır (Gallagher and Wiley 2010).

### **Jel filtrasyon kromatografisi**

Jel filtrasyon kromatografisi, farklı boyutlardaki molekülleri ayırmak için kullanılan boyut dışlama kromatografisi olarak da bilinen bir saflaştırma yöntemidir. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan kolonlar, belirli bir boyutta elekler içeren bir boncuk matriksidir ve bu matriks çapraz bağlı poliakrilamid, agaroz, dekstran veya bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşur (Scopes 1993). Polimerler ve proteinler gibi büyük moleküller, boyutlarına bağlı olarak boncuklara girebilir veya girmeyebilir küçük moleküller matriksin içindeki eleklerle girebildiklerinden tekrardan hareketli faza geçmeleri zaman alırken büyük moleküller eleklerle giremedikleri için hareketli faz ile hızlıca kolondan geçerler. Bu sayede boyuta göre saflaştırma gerçekleştirilir (Duong-Ly and Gabelli 2014).

### **Su İki fazlı sistem (ATPS) yöntemi**

Sulu iki fazlı sistem (ATPS), biyomoleküllerin geri kazanılması için hafif, kolay ölçeklenebilir, verimli bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemidir (Garcia *et al.* 2018). İki faz arasındaki ayrım, kullanılan malzemelerin yüzey özelliklerine ve konformasyonuna ve iki fazlı sistemin bileşimine bağlıdır. İki fazlı sistem genel olarak iki polimerin veya bir polimer ve bir tuzun su içinde karıştırılmasıyla oluşturulur. ATPS yöntemi, hücrel yüzeyler-biyomoleküller ve bunların etkileşimlerinin analizi, hücre popülasyonlarının fraksiyonlanması, biyoteknolojide ürün geri kazanımı için yararlı bir yöntemdir ve kolayca ölçeklenebildiğinden ve diğer ayırma tekniklerine kıyasla yüksek biyokütle yükünü tutabilir olduğundan ham hammaddelerden proteinlerin büyük ölçekli geri kazanımını sağlar (Hatti-Kaul 2001).

### **Üçlü faz ayırma (TPP)**

Basit ve düşük maliyetli saflaştırma yöntemlerinden olan TPP, proteinleri saflaştırmak için kullanılmaktadır. Üç fazlı ayırma hem ham süspansiyon için hem de enzim ihtiva eden

çözelti için kullanılabilir. Tuz ile çöktürme, izoionik çöktürme ile çözücü çöktürme ilkelerini içerdiğinden, biyolojik ayrıştırma yöntemlerine alternatif olmuştur (Pike and Dennison 1989; Dennison and Lovrien 1997; Roy and Gupta 2002). TPP; organik çözücü (*t*-bütanol), tuz (amonyum sülfat) ile ham protein özütünün karıştırılıp, orta fazdaki proteinlerin belirli bir sürede çökmesi esasına dayanmaktadır.

Pigment, lipid ve enzim inhibitörleri üst organik çözücü fazında daha konsantreyken, alt fazda polar bileşenler daha fazla bulunmaktadır (Kiss *et al.* 1998; Saxena *et al.* 2007). Bazı durumlarda, proteinlerin TPP yöntemi ile saflaştırılması, daha yüksek katalitik verimle sonuçlanabilmektedir. Yapısal değişiklikler nedeniyle protein, TPP enzim molekülünün işlenmesi sonucunda yüksek bir esnekliğe sahip olur ve artan konformasyonel esneklik, işlenmemiş proteine göre daha yüksek katalitik aktivite gösterir (Duman and Kaya 2013).

Saflaştırılmış bir enzim için yapılan biyokimyasal karakterizasyon, enzimin spesifik özelliklerinin tanımlanması, onun biyoteknoloji uygulaması ile endüstriyel üretim ve kullanım süreçlerinin belirlenmesi açısından önemlidir (Gupta *et al.* 2004; Singh and Mukhopadhyay 2012).

### **Tersinir misel sistemi**

Ters misel sistemi ile proteinleri saflaştırmak yüksek seçiciliği ve kolay hazırlanması nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir saflaştırma yöntemidir (Chen *et al.* 2019). Ters miseller, yüzey aktif bir maddenin organik çözücü içinde çözülerek oluşturduğu misellerdir (Tonova and Lazarova 2008; V Pérez *et al.* 2014). Ters miselde, yüzey aktif maddenin polar ucu dışarıda bulunur ve polar olmayan organik bir çözücü ile temas halindedir. Kutup başı ve kutup çekirdeği oluşturmak üzere organize olur. Oluşan çekirdek suda çözünür ve enzimler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyoaktif maddeleri çözen havuz oluşturularak biyoaktif maddelerin misellerin dışındaki organik çözücülerle doğrudan temasını önler ve bu sayede biyolojik inaktivasyon önlenmiş olunur (Gaikawari *et al.* 2012; Chen *et al.* 2017).

### **İmmünopürifikasyon**

İmmün saflaştırma, protein saflaştırması için en seçici ve güçlü afinite tekniklerinden biridir (Harlow and Lane 1988). Kullanılan spesifik antikolar, çok benzer antijenler arasında dahi ayırım yapabilir ve böylece diğer yöntemler kullanılarak saflaştırılmayacak proteinler saflaştırılabilir. Yöntem monoklonal antikolar kullanıldığında, en pahalı afinite yöntemlerinden biri olarak algılsa da monoklonal antikor teknolojisinin ilerlemesi, üretim ölçekli uygulamaların geliştirilmesine izin vererek immüno-saflaştırma maliyetlerini büyük ölçüde azaltmıştır (Hill *et al.* 1989). Genel olarak immünoafinite saflaştırması yönteminde

monoklonal antikorlar veya afinite ile saflaştırılmış poliklonal antikorlar kullanılır. Kullanılacak antikor seçimi, saflaştırılacak olan proteine karşı bir monoklonal antikorun mevcudiyetine ve ham çözeltinin bileşimine bağlıdır (Taipa *et al.* 1992).

### **Amonyum sülfat çöktürmesi**

Nötral tuzlarla çöktürme, kısmi saflaştırmada en sık kullanılan yöntemdir. Çoğunlukla suda iyi çözünmesi ve ekonomik olmasından dolayı amonyum sülfat tuzu tercih edilir. Amonyum sülfat, farklı konsantrasyonlarda su moleküllerine bağlanmak için ortamda bulunan proteinlerle yarışır ve su moleküllerine bağlanarak, proteinlerin çökmesine neden olur. Amonyum sülfat, proteinlerin denatürasyonunu değil, sudaki çözünürlüğünü azaltıp çökmesi (salting out) esasına dayanır (Yılmaz 2019).

### **Literatür Araştırması**

Mikroorganizmalar tarafından üretilen lipaz enzimi, endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Bakterilerin izolasyonu, lipaz üretimi ve enzimin saflaştırılmasını konu alan son yıllarda yapılan önemli çalışmalardan bazıları şunlardır:

D.-W. Lee *et al.* (1999), yaptıkları çalışmada, termofilik bir mikroorganizma olan *Bacillus thermoleovorans* ID-1'i kullanmışlardır. Endonezya'daki kaplıcalardan izole edilen *Bacillus thermoleovorans* ID-1, hücre dışı lipaz aktivitesi ve yüksek sıcaklıklarda lipit ihtiva eden substratlar üzerinde yüksek büyüme oranları göstermiştir. İzolat ID-1' in; tek karbon kaynağı olarak zeytinyağı kullanıldığında (%1,5, w/v), spesifik büyüme oranı ( $2.50 \text{ h}^{-1}$ ) ile  $65^\circ\text{C}$ 'de çok hızlı bir şekilde büyüdüğünü ve lipaz aktivitesinin  $U \text{ l}^{-1}$  geç üstel faz sırasında maksimum 520 değerine ulaştığını ve sonra azaldığını saptamışlardır. Buna ek olarak, izolat ID-1, yağlar (zeytinyağı, soya fasulyesi yağı ve mineral yağı), trigliseritler (triolein, tributirin) ve emülgatörler (Tween 20, Tween 40) gibi çeşitli lipid substratları üzerinde büyüebilir olduğunu belirtmişlerdir. ID-1'den salgılanan lipazı, amonyum sülfat çökeltmesi, DEAE-Sephacel iyon değişim kromatografisi ve Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi ile 223 kat saflaştırmışlardır. Sonuç olarak, lipazın moleküler kütlelerini, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile 34 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin  $70-75^\circ\text{C}$ 'de ve pH 7.5'te optimal aktivite gösterdiğini ve  $60^\circ\text{C}$ 'de 1 saat ve  $70^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika inkübasyondan sonra orijinal aktivitesinin %50'sini gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, enzim aktivitesinin  $\text{Ca}^{2+}$  veya  $\text{Zn}^{2+}$  varlığında arttığını belirtmişlerdir.

Kulkarni and Gadre (2002), yaptıkları çalışmada, toprak örneklerinden 18 bakteri suşunu izole etmişler ve bu izolatları alkali, termofilik lipaz üretimi için taramışlardır. İzolatlar içerisinde *Pseudomonas fluorescens* NS2W seçilmiş ve lipaz üretimini optimize

etmişlerdir. Hücre büyümesi ve lipaz üretimini, çalkalama şişelerinde ve optimize edilmiş ortamda 1 litrelik bir fermentörde incelenmişlerdir. Maksimum lipaz verimlerini sırasıyla 69,7 ve 68,7 U ml<sup>-1</sup> olarak saptamışlardır. Elde ettikleri lipazın, pH 9,0'da optimal bir aktiviteye sahip olduğunu ve 3-11 gibi geniş bir pH aralığında ise aktivitesini %70'ten daha fazla korunduğunu bildirmişlerdir. Lipaz ayrıca, 55°C'de optimal bir aktiviteye sahip olduğunu ve en az 2 saat boyunca %70'in üzerinde aktivitesini koruyarak 60°C'ye kadar stabil kaldığını belirtmişlerdir. Üretimi gerçekleştirilen lipazın belirtilen özellikleri ile, bu enzimin deterjan formülasyonlarında kullanım için uygun olacağını ve ayrıca daha yüksek sıcaklıkta ve alkali ortamlarda gerçekleştirilen reaksiyonlarda uygulama bulabileceğini önermişlerdir.

Kumar *et al.* (2005), yaptıkları çalışmada, bir termofilik izolat olan *Bacillus coagulans* BTS-3 ile bir hücre dışı alkalın lipaz üretmişlerdir. Bu lipazın üretimi aşamasında karbon kaynağı, azot kaynağı ve kültür ortamının başlangıç pH'sını optimize ederek lipaz üretimini arttırmışlardır. Lipaz aktivitesi 1,16 U/mL olan kültür ortamını, karbon kaynağı olarak rafine hardal yağı ve azot kaynakları olarak pepton ve maya özütü (1:1) kombinasyonu ile 55 °C'de ve pH 8,5'te 48 saatte elde etmişlerdir. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Sefaroz kolon kromatografisi ile 40 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 31 kDa olarak saptamışlardır. Enzimin, 55 °C ve pH 8,5'te maksimum aktivite gösterdiğini ve pH 8,0 ile 10,5 arasında ve 70 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda stabil olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca enzimin Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> iyonları tarafından inhibe edildiğini, K<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> iyonlarının ise enzim aktivitesini arttırdığını, Na<sup>+</sup> iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisi olmadığını saptamışlardır. Üretimi gerçekleştirilen lipazın, endüstriyle ilişkili bazı esterlerin sentezlenmesi için kullanılabilirliğini ve lipit açısından zengin endüstriyel atık su arıtma işlemleri için de uygulanabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Faiz *et al.* (2007), yaptıkları çalışmada, *Anoxybacillus gonensis* (A4) bakterisinin ürettiği lipaz enziminin, tribütirini parçalama kapasitesi ve karakterizasyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda Tributirin agar içeren besiyerinde, *Anoxybacillus gonensis* A4'ün esteraz salgıladığını göstererek, p-nitrofenil bütirat varlığında aktivitesinin V<sub>max</sub> ve K<sub>m</sub> değerlerinin, 800 U/L ve 176.5 µM olduğunu bulmuşlardır. *Anoxybacillus gonensis* A4'ün ürettiği esterazın moleküler ağırlığının SDS-PAGE ile 62 kDa olduğunu gözlemlemişlerdir. Üretilen esteraz için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 60-80°C ve 5,5 olduğunu ve 1 saatlik inkübasyon sonucunda 80°C'de enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğunu belirtmişlerdir. pH stabilitesi için yapılan deneyler sonucunda, orijinal ham esteraz aktivitesinin pH 6,0'da yaklaşık 2 kat arttığını gözlemleyen araştırmacılar bazı kimyasalların esteraz aktivitesi üzerindeki etkisinde, *A. gonensis* A4'ün aktif bölgesinde serin

kalıntısı olan bir esteraz ürettiğini ve aktivitesi için -SH gruplarının gerekli olduğunu tespit etmişlerdir.

Bora and Bora (2012), yaptıkları çalışmada lipaz üretimini, Hindistan, Arunachal Pradesh kaplıcasının toprak örneğinden izole edilen bir bakteri suşu olan *Bacillus sp* LBN2 ile gerçekleştirmişlerdir. Hücreleri, %1 yerfistığı yağında maksimum üretim gözlemlemişlerdir. Organizma tarafından lipaz üretimi için optimum sıcaklık ve başlangıç ortam pH'sını sırasıyla 50°C ve 9,0 olarak bulmuşlardır. %60 amonyum sülfat doygunluğunda 3,4 kat, %71 verimle ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile 10,3 kat %48 verimle saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE yöntemi ile 33 kDa olarak saptamışlardır. Aktivite için optimal pH ve sıcaklığı sırasıyla 10 ve 60°C olarak belirtmişlerdir. Enzimin pH 11'de %90 aktivitesinin korunması ile 8-11 pH aralığında stabil olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca enzimin 1 saat boyunca 60°C'de %90 aktiviteyi ve 70°C'de %70 aktiviteyi koruduğunu da bildirmişlerdir. Saflaştırılan lipazın aseton ve etanol içinde stabil olduğu belirtmişlerdir. Mevcut bulgularla, enzimin termofilik alkalın lipaz olduğunu göstermişlerdir. Üretilen lipazın, yüksek alkali koşullarda ve yüksek sıcaklıkta stabil kalabilen nadir lipazlardan olduğu belirtmişlerdir.

Sahoo *et al.* (2020), yaptıkları çalışmada Hindistan, Taptapani Hotspring'den izole ettikleri termokararlı *Anoxybacillus sp.* ARS-1 bakteri suşunu katı substrat fermantasyonu (SSF) ile dört değişken (sıcaklık, pH, % nem ve biyosümfaktan) altında optimum lipaz üretimi için karakterize etmişlerdir. Gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda endüstriyel olarak uygun termostabil (57,50 °C) ve alkali stabil (pH 8,31) *Anoxybacillus sp.* olduğunu belirtmişlerdir. *Anoxybacillus sp.* ARS-1 tarafından üretilen lipaz enziminin, neredeyse tüm kimyasal deterjanlara ve yaygın olarak kullanılan çamaşır deterjanlarına karşı direnç gösterdiğini ve bu bakteri suşunun dahil edilmek üzere olası bir katkı maddesi olduğunu kanıtlamışlardır.

Zhao *et al.* (2021), yaptıkları bu çalışmada yeni izole edilmiş *Staphylococcus caprae* bakteri suşundan lipaz enzimini (SCNL) sırasıyla %80 amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve ultrafiltrasyon yöntemleri ile saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları lipaz enziminin, %6,13 verim, 332,95 kat saflaştırdıklarını ve SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının yaklaşık 87 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Yüksek sıcaklık direnci ve pH stabilitesi sergileyen enzimin, geniş bir sıcaklık aralığı (20–50°C) ve pH değerlerinde (6-11) başlangıç aktivitesinin %80'ini muhafaza ettiğini tespit etmişlerdir. Enzim için optimum yüksek aktiviteyi sıcaklık 40°C ve pH: 9,0 substrat olarak p-nitrofenilpalmitat varlığında kaydetmişlerdir. Ayrıca enzimin, çeşitli endüstriyel organik çözücüler ve metal iyonlarının varlığında oldukça aktif olduğunu

belirlemişlerdir. Lipaz aktivitesinin, organik çözücüler (izoktan, gliserol, DMSO ve metanol) ve metal iyonları ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$ ) ile arttığını kaydetmişlerdir. SCNL'nin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,695 mM ve  $262,66 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  olduğunu ve yaygın enzim inhibitörleri, ticari deterjanların varlığında diğer stafilokokal lipazlardan daha yüksek bir kalıntı aktivite sergilediğini belirtmişlerdir. SCNL'nin belirtilen bu biyokimyasal özellikleri, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için mükemmel bir yeni lipaz adayı olabileceğini öne sürmüşlerdir.



## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Tez çalışması için kullanılan kaplıca suları, Türkiye'nin farklı illerinden (Yalova Termal, İstanbul Tuzla, Çanakkale Kestanbol, Erzurum Hasankale ve Pasinler kaplıcalarından) temin edilerek, termoslara konuldu ve laboratuvar ortamına getirildi.

### Çalışmalar İçin Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında, aşağıda verilen laboratuvar ekipmanları kullanılmıştır.

• Bloklü Isıtıcı	Lab-Line
• Buzdolabı	Vestel
• Çalkalamalı İnkübatör	ZHWY 2102C
• Deep-Freeze	Glacier
• Elektroforez Cihazı	Bio-Rad
• Elektroforez Tankı	Bio-Rad
• Etüv	Binder
• Görüntüleme Cihazı	Fusion
• Hassas Terazı	Ohaus Pioneer
• Kar Makinesi	Scotsman AF-20
• Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
• Mikroskop	BOECO
• Otoklav	HMC Hirayama
• Otomatik Pipet	Eppendorf
• PCR Cihazı	Sensoquest Labcyclers
• Peristaltik Pompa	Ismatec
• pH Metre	Mettler-Toledo
• Saf Su Cihazı	MP Minipure
• Santrifüj	Hettich
• Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
• Su Banyosu	Grant 6G
• UV-Spektrofotometre	Beckman Coulter
• Vortex	Wisemix VM-10

## Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar

Aseton(Sigma), Amonyum Sülfat(Sigma), Akrilamid(Sigma), Agaroz(Sigma), Amfisilin(Sigma), EDTA(Sigma), Etidyum Bromür(Sigma), Etil Alkol(Sigma), Bisakrilamid(Sigma),  $\beta$ -Merkaptoetanol(Sigma), Distile Su(Thermo), DNA Marker(Thermo), dNPT(Thermo), DNTP(Sigma), DMSO(Sigma), Lizozim(Sigma), FeSO<sub>4</sub>(Sigma), Fish Pepton(Sigma), Formaldehit(Sigma), Hidroklorik Asit(Sigma), Hidrojen Peroksit(Sigma), Fosforik Asit(Sigma), Gliserol(Sigma), IPTG(Sigma), İmmersiyon Yağı(Sigma), İzopropanol(Sigma), CaCl<sub>2</sub>(Sigma), Magnezyum Klorür(İnvitogen), MgSO<sub>4</sub>(Sigma), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Sigma), NaOH(Sigma), TEMED(Sigma), Paranitrofenol Palmitat(Sigma), Sodyum Asetat(Sigma), Sodyum thio-sulfat(Sigma), Q-Sefaroz Kolon Materyali(Sigma), *tert*-Bütanol(Ensure), X-Gal(Sigma), Triton X-100 (Sigma), Tris (Sigma), Tween 20 (Sigma), Tween 80(Sigma), 6X Yükleme Tamponu(Thermo), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(Merck), NaCl (Merck)

Kullanılan kitler; pGEM-T Easy Vector System: Promega-A1360; Wizard plus JV minipreps DNA purification System: Promega-A1330; Promega wizardR genomic DNA purification kit; Thermo AnaeroGen

## Tez Kapsamında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- ✓ **%0,9'luk Fizyolojik Su:** 1000 mL distile su içerisinde 9 g NaCl çözüldü ve otoklavlandı.
- ✓ **1XTAE Tamponu:** 100 mL 10XTAE tamponundan alındı, son hacim saf su ile 1L'ye tamamlandı. Agaroz jel elektroforezde kullanılmak üzere muhafaza edildi.
- ✓ **50 mM EDTA Solüsyonu:** 100 mL saf su içerisinde 1,46 g EDTA çözülerek, pH'sı 8,0 'e ayarlandı.
- ✓ **Kalsiyum Klorür Çözeltisi (100 mM):** 1,11 g CaCl<sub>2</sub> tartılıp 100 mL saf su içerisinde çözüldü. Otoklavlanıp, klonlama işlenminde kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.
- ✓ **Amfisilin Çözeltisi:** 20 mg/mL olacak şekilde steril saf su kullanılarak hazırlanan çözelti, 0,22  $\mu$ m çaplı milipor filtreden geçirilerek, steril edildi. Klonlama çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.
- ✓ **X-Gal Çözeltisi:** 40 mg X-Gal tartılarak 1 mL dimetilformamid içerisinde çözdürüldü. Alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde sarılarak, klonlama çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.
- ✓ **IPTG Çözeltisi:** 23,8 mg/mL olacak şekilde IPTG tartılarak steril saf su içerisinde çözünmesi sağlandı. Ardından 0,22  $\mu$ m çaplı milipor filtreden geçirildi, klonlama

çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de buzdolabının buzluk kısmında muhafaza edildi.

- ✓ **Substrat Çözeltisi:** 0,15 g paranitrofenol palmitat tartılarak, 50 mL izopropanol içerisinde homojen olacak şekilde çözüldü.
- ✓ **Bradford Çözeltisi:** Koyu renkli cam bir şişe içerisinde 0,1 g Commassie Brilliant Blue G-250 tartılarak, 50 mL %95'lik etanol ile çözüldü. Daha sonra karışım içerisine 100 mL %95'lik fosforik asit eklendi. Son hacim 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Çözelti kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında, karanlık ortamda muhafaza edildi.
- ✓ **Tris-HCl Tampon Çözeltisi (50 mM pH:8):** 3 g Tris tartılarak, bir miktar saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 8'e ayarlanarak son hacim saf su ile 500 mL'e tamamlandı.
- ✓ **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Çözeltisi:** 26,45 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartılarak, 500 mL saf su içerisinde çözüldü.
- ✓ **Asetat Tamponu (50 mM pH: 4-5):** İki ayrı cam şişe içinde 0,2 g sodyum asetat bir miktar saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 4,0 ve 5,0 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamladı.
- ✓ **Fosfat Tamponu (50 mM pH: 6-7):** İki ayrı şişe içinde 0,34 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bir miktar saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 6,0 ve 7,0 olacak şekilde ayarlandı ardından son hacim saf su ile 50 mL'e tamamlandı.
- ✓ **Tris-HCl Tamponu (50 mM pH:8):** 0,3 g Tris tartılarak bir miktar saf su içerisinde çözüldü. Daha sonra pH'sı 8,0 olacak şekilde ayarlanarak, son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
- ✓ **Glisin-NaOH Tamponu (50 mM pH:9-10-11-12):** 4 ayrı şişe içinde 0,187 g glisin-NaOH tartılarak belli bir miktar saf su içerisinde çözüldü. pH'sı 9,10,11,12 olacak şekilde ayrı ayrı ayarlandı. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
- ✓ **MgSO<sub>4</sub> Çözeltisi:** 0,06 g MgSO<sub>4</sub> tartılarak 10 mL Tris-HCl içerisinde çözümlenerek hazırlandı.
- ✓ **ZnSO<sub>4</sub> Çözeltisi:** 0,08 g ZnSO<sub>4</sub> tartılarak 10 mL Tris-HCl içerisinde çözümlenerek hazırlandı.
- ✓ **CuSO<sub>4</sub> Çözeltisi:** 0,079 g CuSO<sub>4</sub> tartılarak 10 mL Tris-HCl içerisinde çözümlenerek hazırlandı.
- ✓ **CoCl<sub>2</sub> Çözeltisi:** 0,064 g CoCl<sub>2</sub> tartılarak 10 mL Tris-HCl içerisinde çözümlenerek hazırlandı.
- ✓ **Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Çözeltisi:** 0,199 g Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tartılarak 10 mL Tris-HCl içerisinde çözümlenerek hazırlandı.
- ✓ **KCl Çözeltisi:** 0,037 g KCl tartılarak 10 mL Tris-HCl içerisinde çözümlenerek hazırlandı.

- ✓ **MnCl<sub>2</sub> Çözeltisi:** 0,055 g MnCl<sub>2</sub> tartılarak 10 mL Tris-HCl içerisinde çözülerek hazırlandı.
- ✓ **1M Tris-HCl Çözeltisi (pH:8,8):** 12,1 g Tris tartılarak, bir miktar saf su içerisinde çözülerek, pH:8,8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'e tamamlandı.
- ✓ **1M Tris-HCl Çözeltisi (pH:6,8):** 12,1 g Tris bir miktar saf su içerisinde çözülerek, pH:6,8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'e tamamlandı.
- ✓ **%30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid Çözeltisi:** 6 g akrilamid ve 0,16 g bisakrilamid tartılarak 13,84 mL saf su içerisinde çözüldü.
- ✓ **%10'luk SDS Çözeltisi:** Hassas terazide tartılan 1 g SDS, 9 mL saf suda çözüldü.
- ✓ **SDS-Page Yürütme Tamponu:** 1,5 g Tris, 7,2 g glisin tartılıp, bir miktar saf su içerisinde çözülüp 5 mL %10'luk SDS çözeltisi eklendi. Son hacim saf su ile 500 mL'e tamamlandı.
- ✓ **SDS-Page Numune Tamponu:** 650 µL pH:6,8 olan 1M Tris-HCl çözeltisi, 1000 µL %10'luk SDS çözeltisi, 1000 µL glisin çözeltisi ve 1000 µL %1'lik bromtimol mavisi homojen olacak şekilde karıştırılarak son hacim saf su ile 10 mL'e tamamlandı.
- ✓ **Tespit Çözeltisi:** %96'lık 30 mL etanol, 60 mL saf su ve 10 mL asetik asit bir beher içerisinde karıştırılarak hazırlandı.
- ✓ **PER Çözeltisi (%10):** 1 gram amonyum persülfat tartılarak 9 mL saf su içerisinde çözüldü.
- ✓ **Redüksiyon Çözeltisi:** 80 mL saf su ile 45 mL etanol karıştırılarak oluşturulan çözelti içerisinde 4,8 g sodyum asetat çözdürüldü. Daha sonra asetik asit ile pH'sı 6 olacak şekilde ayarlandı. 150 mg sodyum tiyosülfat ve 4 mL glutaraldehit eklenip, son hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
- ✓ **Boyama Çözeltisi:** 150 mg gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>), 30 µL formaldehit ile 150 mL saf su içerisinde çözdürüldü.
- ✓ **Yıkama-1 Çözeltisi:** 270 mL saf su içerisinde 3,75 g sodyum karbonat, 120 µL formaldehit ile çözdürülerek jel boyamadan sonra yıkama işlemi için kullanıldı.
- ✓ **Yıkama-2 Çözeltisi:** 12,5 mL asetik asit ve 1 mL gliserin bir miktar saf su ile karıştırılarak son hacim yine saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

#### **Tez Kapsamında Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanışı**

- ✓ **TSA (Tryptic Soy Agar) Katı Besiyeri:** Tryptic Soy Agar besiyerinden 37 g tartılarak 1 L distile su içerisinde çözüldü. Daha sonra 121°C'de 15 dk süre ile otoklavlanarak besiyeri hazırlandı.

- ✓ **TSB (Triptic Soy Broth) Sıvı Besiyeri:** Triptic Soy Broth besiyerinden 30 g tartıldı. Ardından 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlanarak besiyeri hazırlandı.
- ✓ **Luria Bertani (LB) Agar Besiyeri:** Luria Bertani Agar besiyerinden 35 g alındı. Ardından 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlanarak besiyeri hazırlandı.
- ✓ **LB (Luria Bertani Broth):** Luria Bertani Broth besiyerinden 20 g alınarak 1 L distile su içerisinde çözdürüldü. Otoklav cihazında 121°C’de 15 dk sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.
- ✓ **Tribütirin Agar Besiyeri:** 23 g tribütirin agar tartılarak 1L distile su içerisinde tamamen çözdürüldü. Daha sonra karışım içerisine 10 mL gliserol tribütirat eklendi, tamamen homojen olana kadar ısıtıldı. Otoklav cihazında 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlanarak steril edildi.
- ✓ **Lipaz Sıvı Besiyeri (1L)**
  - 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 0,5 g/L  $\text{MgSO}_4$
  - 2 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
  - 0,05 g/L  $\text{CaCl}_2$
  - 0,006 gr/L  $\text{FeSO}_4$
  - 3 gr/L Fish pepton

Verilen kimyasallar hassas terazi ile tartılarak, bir miktar saf su içerisinde çözdürüldü. Ardından pH metre ile besiyeri pH’sı 7,5 olacak şekilde ayarlanıp, son hacim 1 litreye tamamlandı. Daha sonra her bir erlende 100 mL besiyeri olacak şekilde ayarlandı. 100 mL besiyeri için 3 mL yağ ve 200  $\mu\text{L}$  Tween 80 eklendi. Otoklav cihazında steril edilerek, kullanıldı.

## **Yöntem**

Kaplıca sularından izole edilen bakterilerden, lipaz aktivitesine sahip olan suşlar belirlendi. En yüksek aktiviteye sahip izolat alınıp, enzim üretimi gerçekleştirildi. Daha sonra lipaz enzimi saflaştırılıp, karakterize edildi.

## **Termofilik Özellik Gösteren Bakterilerin İzolasyonu**

Toplanan örneklerden, içerisinde TSB sıvı besiyeri bulunan erlenlere bir miktar eklendi. Çalkalamalı inkübatörde 55°C’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Gelişen bakteriler %0,9’luk fizyolojik su ( $\text{NaCl}$ ) kullanılarak hazırlanan steril dilüsyon tüplerinde (10

<sup>1</sup> 'den 10<sup>-7</sup> 'ye kadar) dilüe edildi. Dilüe edilen bakteri solüsyonlarından 100'er µL alınarak, yayma ekim yöntemi ile TSA katı besiyerine ekim yapıldı. Etüvde 55°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Petrilerde gelişen farklı koloni morfolojisine sahip bakteriler 3 faz çizgi ekim yöntemiyle saf kültür haline getirildi. Her bir saf kültürden steril öze ile koloniler alınarak TSB sıvı besiyerine inoküle edilip, çalkalamalı inkübatörde 55°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda bakteri suşlarının bulunduğu tüpler inkübatörden çıkarılarak, stok kültürleri hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi (Pask-Hughes and Williams 1977; Adıgüzel 2006).

### **Elde Edilen Bakteri Suşlarından, Lipaz Enzimi Üreten İzolatların Belirlenmesi**

Hazırlanmış olan stok bakterilerden TSA besiyerine 3 faz çizgi ekim yöntemi ile ekim yapıldı, daha sonra 55°C'ye ayarlı etüvde 24 saat inkübasyona bırakılarak canlanmaları sağlandı. TSA besiyerinde saf olarak büyüyen bakteriler steril öze yardımı ile TSB sıvı besiyerinde ön kültüre alındı. TSB sıvı besiyerinde büyüyen kültürlerden 20 µL alınıp, tribütirin agar besiyerine ekim yapıldı. 55°C'de 2-3 gün süre inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tribütirin agar besiyerinde zon oluşup oluşmadığı gözlemlendi (Ertuğrul *et al.* 2007). Tribütirin agar besiyerinde gelişim gösteren suşlar, lipaz besiyerine inoküle edilip, aktiviteleri ölçüldü. Aktivitesi en yüksek olan suş belirlendi, daha sonra gerçekleşen deneylerde bu izolat kullanıldı.

### **Seçilen İzolatın Moleküler Teşhisi**

#### **Genomik DNA izolasyonu**

Seçilen izolat, stok kültürden TSA besiyerinde canlandırılıp, tek koloni alınarak TSB besiyerine inoküle edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda suşa ait genomik DNA Promega WizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolüne uygun olarak izole edildi (Arslan 2017).

#### **İzolasyon prosedürü**

- TSB besiyerinde gelişen bakteri hücrelerinden 2 mL alınarak ependorf tüp içerisinde 16000 rpm 2 dk süre ile çöktürüldü. Pellet üzerine pH'sı 8 olan 480 µL 50 mM EDTA ilave edildi.
- Hazırlanan homojenat üzerine 120 µL, 10 mg/mL lizozim eklenerek homojen bir hal alması sağlandı. 37°C'de 1 saat süre inkübe edildi.

- 1 saat sonunda, homojenat 2 dk süre boyunca 13000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve tüplerin üzerine 600 µL Nüklei Lizis Solüsyonu eklenip pipetajlandı.
- Pipetajlanan örnek önceden 80°C'ye ayarlı su banyosunda 5 dk inkübasyona bırakıldı, daha sonra oda ısısına gelinceye kadar beklendi. Oda sıcaklığına gelince üzerine 3 µL RNase A eklenip birkaç kez alt üst edildi ve 30 dk ve 37°C'de inkübe edildi.
- Oda sıcaklığına gelen karışım üzerine 200 µL Protein Presipitasyon solüsyonundan eklendi. 20 saniye süre ile vortexlenerek, 5 dk buzda bekletildi.
- Buzla inkübasyon sonrasında tüpler, 30 saniye 13000 rpm de santrifüjlendi. Süpernatant, içerisinde 600 µL izopropanol bulunan tüplere aktarılarak, pelet oluşuncaya kadar alt üst edildi.
- Tüpler 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlenerek süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Ependorflara 600 µL %70'lik EtOH'dan eklenerek, hafifçe alt üst edilerek 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Etanol tamamen uzaklaşmaya kadar 37°C'de 30-45 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda tüplerin üzerine 100 µL DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenerek 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İçlerinde genomik DNA bulunan ependorf tüpler kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

### **DNA Konsantrasyon Değerlerinin Ölçülmesi ve Solüsyonlarının Hazırlanması**

DNA'nın kantitatif miktarı, 260 nm'de absorbans ölçümüyle belirlenebilirken, 280 nm'de elde edilen absorbans değeriyle ise genetik materyalin temizliği (protein kirliliği taşıyıp taşımadığı) belirlenmektedir. Kuvarz küvetin içerisine 998 µL TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbans değeri ölçüldü ve çıkan değer kör olarak kaydedildi. Ölçüm yapıldıktan sonra küvet üzerine 2 µL DNA eklenerek, karışımın homojen hale gelmesi sağlandı. 260 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerinden köre ait olan değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulundu ve aynı işlemler 280 nm için de tekrarlandı.  $A_{260}/A_{280}=1-1,7$  arasında olan DNA örneklerinin çalışma solüsyonları hazırlanarak, kullanıldı.

## İzole Edilen DNA Örneğinin ve Örneğin Çalışma Solüsyonunun Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA Konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) =  $A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü (500)} \times 50$  formülü ile stok DNA'nın konsantrasyonu hesaplandı.

Çalışma solüsyonunun konsantrasyonu, İstenen Konsantrasyon ( $100\text{ng}/\mu\text{L}$ ) x İstenen Hacim ( $200 \mu\text{L}$ ) / Stok DNA Konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) formülüne göre çalışma solüsyonu hazırlandı.

Elde edilen miktar, TE çözeltilisi ile  $200 \mu\text{L}$ 'ye tamamlanarak  $100 \text{ng}/\mu\text{L}$  konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlandı ve kullanılıncaya kadar  $-86^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Di Pinto *et al.* 2007).

### 16S rRNA PCR analizi

Evrimsel olarak korunduğu bilinen 16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematığı açısından oldukça önemlidir. Bu gen bölgesi universal 16S rRNA primerleri kullanılarak, in vitro koşullar altında çoğaltıldı.

### PCR Reaksiyonu

Bakteri izolatından elde edilen genomik DNA örneğinin 16S rRNA gen bölgesini çoğaltmak için,  $30 \mu\text{L}$ 'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR tüpü için **Tablo 4**'te verilen reaktif maddeler, belirtilen miktarda hazırlandı.

**Tablo 4.** PCR Reaksiyonu Reaktif Madde İçerikleri

Reaktif Madde	Konsantrasyon	Miktar
PCR Buffer	10X	$3 \mu\text{L}$
dNTP	10 mM	$0,6 \mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	$1,8 \mu\text{L}$
27F	$5 \mu\text{M}$	$3 \mu\text{L}$
1492R	$5 \mu\text{M}$	$3 \mu\text{L}$
DMSO	%99	$1,2 \mu\text{L}$
Taq DNA Polimeraz	5 U/ $\mu\text{L}$	$0,3 \mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	-	$14,1 \mu\text{L}$
Kalıp DNA	100 ng	$3 \mu\text{L}$

## PCR Programı

Reaktif maddelerle hazırlanan PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilerek, istenilen DNA bölgesi amplifiye edildi.

**Tablo 5.** 16S rRNA PCR İşlemi İçin Uygun Sıcaklık, Süre ve Döngü Sayısı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	55	1	36
Uzama	72	1,30	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	

## 16S rRNA PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi

Jel elektroferez işlemi için; %1'lik agaroz jel hazırlandı, elde edilen karışım mikrodalga fırında homojen oluncaya kadar kaynatıldı. Mikrodalgadan alınan jel 50°C sıcaklığa ininceye kadar soğutulur ve 4 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür ilave edildi ve öncesinde tarak yerleştirilmiş olan elektroferez jel küvetine döküldü. Jel donunca taraklar dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Ardından içerisinde jel bulunan küvet, 1X TAE tamponu bulunan elektroferez tankının içine yerleştirildi. Tarak uçlarının oluşturdukları kuyucukların ilkine 4 µL 10 kb'lık DNA markırından ve diğer kuyucuklara ise, her bir örnek için 1 µL 6X yükleme tamponu ve 5 µL PCR ürünü karışımından yüklendi. Elektroferez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak, DNA örnekleri 100 dk boyunca yürütüldü. Jel içerisinde bulunan etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel görüntüleme cihazı ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi (Albayrak 2018).

## Klonlama

### Kompotent hücre hazırlama

Kompotent hücrenin hazırlanması

- Kompotent hücre hazırlamak için ilk önce *Escherichia coli* JM101 suşu 3 faz çizgi ekim yöntemiyle canlandırıldı. Petrilerde gelişen kolonilerden bir tane alınarak LB besiyeri bulunan erlene inoküle edildi ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- Bu kültürden 300 µL alınarak, 2700 µL steril saf su ile seyreltildi ve 600 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede ölçüm yapıldı. 30 (hazırlanacak ml cinsinden

miktar) X 0.1 (sabit değer) / çıkan değer X 10 (seyreltme oranı) formülünden elde edilen sonuç bize kültürden alınması gereken miktarı verir.

- 30 mL LB besiyerine hesaplama sonucu çıkan miktar kadar kültür eklendi. Optik yoğunluk (600 nm'de) değerleri 0,4-0,5'e oluncaya kadar kültür karışımı 37°C'de 60-90 dakika inkübe edildi.
- İstenilen optik yoğunluk elde edilince örnek inkübatörden alınarak 4 °C'de 4400 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Elde edilen hücre pelleti üzerine buzdolabında muhafaza edilen soğuk 100 mM CaCl<sub>2</sub> çözeltisinden 10 mL eklenerek pelletin çözünmesi sağlandı. Ardından 30-45 dakika buzda bekletildi (Arslan 2017).

### Ligasyon işlemleri

Ligasyon işlemleri, 0,2 mL'lik tüplerin içerisinde ligasyon karışımının bir araya getirilerek 16°C'de 13-15 saat boyunca inkübasyona bırakıldı, ardından kullanıncaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

**Tablo 6.** Ligasyon İşlemlerinde Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Miktar (µL)
2X Ligasyon Tamponu	5
PCR Ürünü	3
Vektör	1
T4 DNA Ligaz	1

### Transformasyon işlemleri

Buzdolabında bekletilen kompetent hale gelmiş hücrelerden her bir ependorf tüpe 200'er µL konuldu, üzerine 2,5 µL ligasyon ürünü eklenip, 30 dk buzda bekletildi. Süre sonunda 42°C'ye ayarlanmış olan su banyosuna alınan tüpler, 2 dk süreyle ısı şokuna tabi tutuldu. Daha sonra tüplerde bulunan solüsyon üzerine 200 µL LB besiyeri eklenerek 37°C'de 100 dk inkübe edildi. Buzdolabında muhafaza edilen 40 µL X-Gal ve 40 µL IPTG oda sıcaklığına getirilerek amfisilinli katı besiyerine yayıldı. İşlemler sonrası petri yüzeyleri kurutulmaya bırakıldı. Besiyeri X-Gal, IPTG çözeltilerini iyice emdikten sonra Ligasyon ürünü+Kompetent hücre karışımından 150 µL alınarak, drigalski özesi ile iyice yayıldı. İşlemler sonunda petriyerler 37°C'de yaklaşık 15 saat süre inkübasyona bırakıldı.

## Koloni PCR

15 saatlik inkübasyon süresi sonunda petriler inkübatörden çıkarılarak buzdolabında +4°C’de bir gece bekletildi. Petri yüzeyinde oluşan mavi-beyaz kolonilerden, beyaz olanlar seçilerek koloni PCR işlemi gerçekleştirildi (**Tablo 7** ve **Tablo 8**).

**Tablo 7.** Koloni PCR Reaksiyonunun Bileşenleri

Kimyasallar	Miktarları (µL)
<b>Koloni</b>	
<b>Taq DNA Polimeraz</b>	0,3
<b>PCR Buffer (10X)</b>	3
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	1,8
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	16,1
<b>dNTP mix</b>	0,6
<b>DMSO</b>	0,2
<b>T7 Primer (5’__AATACGACTCACTATAG__3’)</b>	2
<b>SP6 Primer (5’__ATTTAGGTGACACTATAG__3’)</b>	2

**Tablo 8.** Koloni PCR Programı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
<b>Ön denatürasyon</b>	94	30 sn	1
<b>Denatürasyon</b>	94	30 sn	36
<b>Bağlanma</b>	55	30 sn	36
<b>Uzama</b>	72	2 dk	36
<b>Son Uzama</b>	72	10 dk	1
<b>Saklama</b>	4	∞	-

PCR işleminin ardından %1’lik agaroz jel hazırlandı. Hazırlanan jelde oluşturulan kuyulara; istenen genin bulunduğu pozitif kontrol, istenen genin bulunmadığı negatif kontrol, markır ve PCR ürünü yüklendi. Daha sonra 90 voltta 1 saat yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi bitince, jel görüntüleme sistemi yardımıyla bantlar görüntülendi. İstenilen aralıkta bant veren koloniler belirlenerek, kolonilerin bulunduğu kültür plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth sıvı besiyerine inoküle edildi.

## Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için, amfisilinli besiyerine inoküle edilen örnekler 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda alınan örnekler 10000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten

sonra, süpernatant kısmı atıldı ve elde edilen pelletteki plazmitler Promega markasına (A1330) ait izolasyon kiti kullanılarak saflaştırıldı.

### **Plazmitlerin Kontrol Edilmesi ve Konsantrasyonlarının Tespiti**

Bu basamakta plazmitler, EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilip (7 µL plazmit, 2 µl 5X tampon, 0,5 µL enzim ve 0,5 µL su ile 37 °C’de 3–12 saat), agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek, uygun bant ve plazmit tespit edildi. Pozitif çıkan plazmitlerin konsantrasyonları Baltacı (2015) tarafından belirtilen yöntemle göre ayarlandı ve sekans analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

### **DNA Dizi Analizi**

Sekans sonuçları FASTA formatına çevirilerek, BioEdit programı ile analiz edildi. İlk olarak primerler bulundu ve primerlerin önünde ve arkasında kalan vektöre ait olan kısımlar çıkarıldı. Daha sonra diziler birleştirilerek anlamlı hale getirildi.

### **Sonuçların Değerlendirilmesi**

Anlamlı hale getirilen sekans verilerinin Blast analizleri [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> internet adresleri kullanılarak gerçekleştirildi ve sonuç olarak % benzerlik oranı belirlendi. Daha sonra örneklerin NCBI’den Genbank numaraları alındı.

### **En İyi İzolat ile Lipaz Enzim Üretimi**

Bakteri izolatının -86°C’de bulunan stok kültürü, TSA besiyerine 3 faz çizgi ekimi yapılarak 55°C’ye ayarlanmış olan etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. TSA besiyerinde gelişen kolonilerden öze yardımıyla alınarak, 100 mL’lik otoklavlanmış steril TSB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 1 gece boyunca 55°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Önceden hazırlanıp steril edilen lipaz besiyerine, ön kültürden 1 mL inoküle edilerek, 55°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra inkübatörde bulunan besiyerinden 24, 48 ve 72. saatlerde örnekler alınarak, lipaz aktivitesine bakıldı (Hatzinikolaou *et al.* 1996; Koç 2013; Malekabadi *et al.* 2018).

### **Üretilen Enzim Homojenatının Hazırlanması**

Bakteri izolatımız tarafından hücre dışı olarak üretilen lipaz enzimi, en yüksek aktiviteyi verdiği 48.saatte inkübatörden çıkarılıp, falkonlara alınarak 6000 rpm’de 30 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonucu; kültür içerisinde enzim ile birlikte bulunan

hücrelerin çökmesi sağlandıktan sonra, içerisinde sadece lipaz enziminin bulunduğu süpernatant kısmı alınarak homojenat elde edildi (Hiol *et al.* 2000).

### Lipaz Enzim Aktivite Tayini

Lipaz enzim aktivitesi paranitrofenol palmitat (p-NPP) substratı kullanılarak, spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Enzimin içerisinde bulunduğu homojenat üzerine 1 mL Tris-HCl (pH:8.0, 50 mM) tamponu ve 1 mL substrat paranitrofenol palmitat (p-NPP) çözeltisi sırasıyla konuldu. 55°C'de 10-15 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüp içerisindeki enzim-substrat reaksiyonunu durdurmak amacıyla, 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklenerek 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra numunelerden 2 mL alınarak, santrifüjlendi (10000 rpm, 5 dk) ve spektrofotometre cihazı ile 410 nm'de verdiği absorbansa göre enzim aktivitesi tayin edildi (Chiou and Wu 2004; Hung *et al.* 2003; Thongekkaew and Boonchird 2007; Winkler and Stuckmann 1979). Bir birim (U) enzim aktivitesi, deney koşulları altında 1 dakikada 1 µmol p-nitrofenol üretimini katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Chiou and Wu 2004).

Lipaz enziminin aktivite tayini aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$EU / mL = [(\Delta_A / \Delta_t)] \times [V_t / (\epsilon \cdot d \times V_0)] \times (10^3)$$

$$EU / mL = \text{Enzim aktivitesi } (\mu\text{mol dk}^{-1} \text{ mL}^{-1})$$

$$\Delta_A = \text{Absorbans değışikliği (410 nm)}$$

$$\Delta_t = \text{İnkübasyon Süresi}$$

$$V_t = \text{Toplam hacim (mL)}$$

$$\epsilon = \text{p-NPP substratının molar ekstinksiyon katsayısı (13,290 M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{)}$$

$$d = \text{Küvetteki ışık yolu (cm)}$$

$$V_0 = \text{Enzim hacmi (mL)}$$

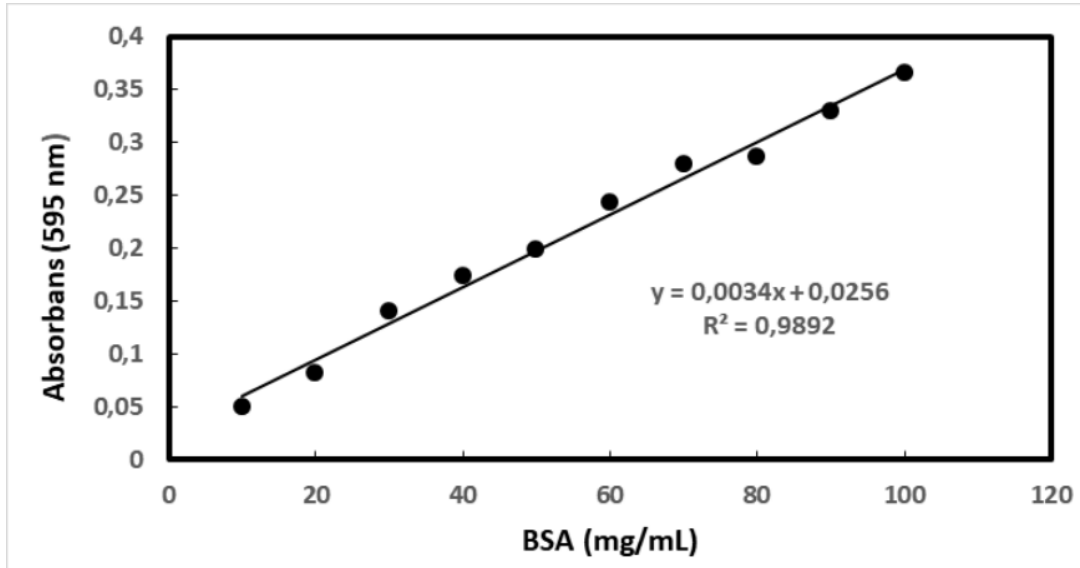
### Protein Tayini

Bradford yöntemi ile gerçekleştirilen kantitatif protein tayininde, Coomassie brilliant blue G250 boyası kullanılır. Bu boya, farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltilerin oluşumunu sağlar. Renk oluşumunda proteinin aminoasit bileşimi ve primer yapısı önemlidir. Boya özellikle bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğilimindedir. Boyaya bağlanmış olan protein kompleksi spektrofotometre cihazında 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerini verir ve yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Yapılan deneylerde; enzim ihtiva eden homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, iyon değişim kromatografisi ve TPP

saflaştırma yöntemlerinden elde edilen enzim çözelti örneklerinin her biri için Bradford protein tayini uygulandı.

Protein miktarını kantitatif olarak tayin etmek amacıyla oluşturulan standart grafik şu şekilde hazırlandı;

- 1:1 mg/mL olacak şekilde protein ihtiva eden standart BSA hazırlanarak 10 ayrı tüpe sırayla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Daha sonra tüplerin hacimleri saf su ile 0,1 mL'ye tamamlandı.
- Tüplerde bulunan karışımın üzerine 4,9 mL renklendirme reaktif maddesi eklenerek vorteksledi ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 595 nm'ye ayarlı spektrofotometre cihazında 3mL'lik küvetlerde önce kör daha sonra köre karşı örneklerin absorbans değerleri okundu (Kör olarak, BSA tamponu ve 4,9 mL renklendirme reaktif maddesinden oluşan karışım kullanıldı).
- Spektrofotometrede okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart bir grafik elde edildi.
- Protein tayini yapılmak istenen örnekler için 0,1 mL enzim çözeltisi üzerine 4,9 mL boya çözeltisi eklenerek 10 dk bekleme süresinin sonucunda 595 nm'de absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen değer ile önceden çizilmiş olunan standart grafiğin eğimi kullanılarak, protein miktarı hesaplandı(Forsman *et al.* 1997; Alçiçek 2017).



Şekil 3. Protein tayini için kullanılan standart grafik

### Kalitatif Protein Tayini

Yöntem spektrofotometre cihazında 280 nm'de absorbans ölçümüne dayanan protein varlığını belirleyen hızlı bir metottur. Proteinlerin yapısında bulunan triptofan, fenil alanin ve tirozin amino asitleri maksimum absorbans değerini vermesine dayanır. Ölçümü yapılmak

istenen örnekler kuvarz küvetlere 1 mL olacak şekilde alınarak 280 nm’de köre (50 mM, pH: 8,0 Tris-HCl tamponu) göre okutulmuş absorban değerleri ölçüldü (Chen and Segel 1968; J. C. Lee *et al.* 1999).

### **Lipaz Enziminin Saflaştırılması**

Enzim saflaştırmak için 2 farklı yöntem kullanıldı. İlk olarak geleneksel yöntemlere alternatif olan üçlü faz ayırma (TPP) yöntemiyle enzim saflaştırması gerçekleştirildi. Daha sonra geleneksel yöntemlerden oluşan amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve iyon değişim kromatografisi ile lipaz enzimi saflaştırıldı.

#### **Üçlü faz ayırma (TPP) yöntemiyle saflaştırma**

Yöntem, doğrudan ham süspansiyon için kullanılabilme, salting-out, izoionik çökeltme, ozmolitik ve kozmotropik presipitasyon yanında kosolvent presipitasyon gibi çeşitli teknikleri içeren, biyolojik ayırma yöntemlerine alternatiftir. Proteinleri saflaştırmada kullanılan TPP metodu, organik çözücü (*t*-bütanol), tuz (amonyum sülfat) ile ham protein ekstraktı karıştırılarak orta fazda bulunan proteinlerin farklı zaman aralıklarında çökmesine dayanan bir saflaştırma tekniğidir (Kiss *et al.* 1998; Saxena *et al.* 2007). Ham enzim çözeltisine sırasıyla tuz ve organik çözücü eklenip uygun ortam koşulları sağlanarak 1 saatlik inkübasyon sonrası alt, ara ve organik solventin bulunduğu üst faz olmak üzere oluşan üçlü faz esasına dayanır (Duman and Kaya 2013; Katı *et al.* 2016). Yapılan çalışmada, *t*-butanol konsantrasyonu, tuz ve pH gibi parametreler optimize edilerek üç fazlı bölme adı verilen hızlı ve ucuz bir yöntem kullanıldı. Bu metod lipaz enzim çözeltisinden lipaz enziminin saflaştırılmasını ve geri kazanılmasını içermektedir.

Bu tez çalışmasında yapılan TPP yönteminde; tuz olarak amonyum sülfat, organik çözücü olarak ise tert-bütanol kullanıldı. İşlemden saflaştırma için en yüksek verimi elde etmek için uygun amonyum sülfat yüzdesi ve uygun *t*-bütanol oranı optimize edilmiştir. Bunun için;

- İlk önce fermantasyon sıvısında lipaz enzimi ile bulunan bakteri hücreleri 25°C ‘de 6000 rpm de 25 dk santrifüjleme işlemi yapılarak uzaklaştırıldı.
- Elde edilen enzim çözeltisinden 2 mL alınarak farklı amonyum sülfat doygunluğunda (%20, %30, %40, %50, %60, %70, %80) 7 farklı tuz konsantrasyonları, yine farklı oranlarda *t*-bütanol (1,0:0,5- 1,0:1,0- 1,0:1,5- 1,0:2,0) olmak üzere 4 farklı oran ve her kombinasyon için farklı pH (5,0-12,0) aralıkları hazırlandı.
- 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 6000 rpm’de 5 dk santrifüj işlemi uygulandı.

- Oluşan 3 fazdan üstte bulunan organik çözücü fazı ayrıldı. Kalan iki faz dikkatli bir şekilde ayrılarak Bradford yöntemiyle protein miktarı ve aktivite ölçüm metoduyla enzim aktivitesi değerleri ölçüldü.
- Elde edilen değerler kullanılarak saflaştırma katsayısına karşı, % geri kazanım grafikleri oluşturuldu. Çıkarılan grafikler yorumlanarak uygun tuz yüzdesi ve organik çözücü miktarları belirlendi (Alçiçek 2017).

Daha sonra lipaz ihtiva eden başka bir homojenat çözeltisi ile geleneksel yöntemlerden (amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, iyon değişim kromatografisi) oluşan yeni bir saflaştırma deneyi gerçekleştirildi.

### **Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz uygulaması**

Enzim ihtiva eden homojenat içerisinde %0-20, %20-40, %40-60, %60-80, %80-90 oranlarında amonyum sülfat eklenerek, çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Yapılan işlemler +4°C’de buzun üzerinde gerçekleştirildi. Her amonyum sülfat çöktürmesi aralığında oluşan çökelti ve süpernatantta enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçümü yapılarak enzim aktivitesinin en yüksek olduğu aralık belirlendi. Çökeltinin aktivite ve protein miktarlarının ölçümü için öncesinde hazırlanan pH:8,0 50mM’lık Tris-HCl tamponu içerisinde çözünmesi sağlandı. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu aralık, enzimin amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak belirlendi. Daha sonra yapılacak olan tüm saflaştırma işlemleri belirlenen bu aralıkta gerçekleştirildi(Çiftçi *et al.* 2004).

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 1,77 \times V \times (S2 - S1) / (3,54 - S2)$$

$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : Eklenmesi gereken amonyum sülfat tuzunun gram miktarı

V: Enzim çözeltisinin (süpernatant) hacmi

S1: Başlangıçtaki amonyum sülfat doygunluğu

S2: İstenen amonyum sülfat doygunluğu

Nötral tuzlarla çöktürme işleminden sonra, elde edilen enzim çözeltisindeki fazla tuzu ve istenmeyen molekülleri uzaklaştırmak amacıyla diyaliz işlemi uygulanır. Bu işlemde yarı geçirgen, belirli büyüklükte porları olan diyaliz torbası adı verilen membranlar kullanılır. İşlemde, saflaştırılan enzim için uygun pH’da hazırlanan tampon çözelti kullanılır. Osmoz adı verilen olay sayesinde su diyaliz torbasının içine girerken torba içerisinde bulunan iyonlar ve tuzlar tampon çözelti ortamına geçmektedir. Elde edilen enzim çözeltisi için 50 mM pH:8,0 Tris-HCl tamponu kullanılarak 4°C’de tampon en az üç kez değiştirilerek diyaliz işlemi gerçekleştirildi (Yayalar 2019).

## İyon değişim kromotografisi

İyon değişim kromotografisinde kolon dolgu materyali olarak Q-Sefaroz kullanıldı. Kolona yerleştirilen dolgu materyali sırasıyla saf su ve 50 mM pH:8,0 Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Daha sonra içerisine dengeleme tamponu olan Tris-HCl (50 mM pH:8,0) kolona dökülerek jelin yatak hacmi sabit oluncaya kadar kolon paketlenildi. Akış hızı 3 mL/saat olacak şekilde peristaltik pompa yardımıyla kolonun dengelenme tamponu ile dengelenmesi sağlandıktan sonra dengeleme tamponu uzaklaştırıldı. Dengelenmiş kolona diyaliz sonunda elde edilen enzim çözeltilisi eklendi. İlk önce Tris-HCl (50 mM pH:8,0) tamponu ile kolon yıkandı. Yıkama işleminden sonra elüsyon için farklı tuz gradientlerinde (50-100-150-200-300-400-500-600-800-1000 mM NaCl) Tris-HCl 50 mM pH:8,0 ile hazırlanmış tamponlar kullanılarak kolon akış hızı 12 mL/saate ayarlandı. Daha sonra 3 mL'lik tüplerde elüatlar toplanarak spektrofotometrede 280 nm absorbands değerleri ölçüldü. Anlamalı değer gösteren her tüp için ayrı ayrı protein miktarı ve aktivite miktarı ölçüldü (Malekabadi *et al.* 2018).

## SDS- PAGE ile Enzimin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayırımına dayanan SDS-PAGE, proteinlerin molekül ağırlığının tespit edilmesi amacıyla kullanılan elektroforez tekniğidir. Kullanılması gereken bütün elektroforez malzemeleri distile su ile iyice temizlenip deneye başlandı. Kışalarla birleştirilen kalın ve ince cam, jel hazırlama kabinine yerleştirildi. İlk olarak ayırma jeli (%15'lik akrilamid içeren) hazırlanıp hızlıca iki cam plakanın arasına döküldü. Oluşan hava kabarcıklarını gidermek için üzerine izopropanol eklenerek jelin polimerleşmesi amacıyla 30 dk bekletildi. Polimerleşme gerçekleştikten sonra, jel üzerinde bulunan izopropanol uzaklaştırılarak hazırlanan yığma jeli ayırma jelinin üzerine döküldü ve taraklar yığma jeline dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Polimerleşmesi için 30 dk bekletilen jelden yine dikkatli bir şekilde taraklar çıkarılarak cam plakalar elektroforez tankı içerisine yerleştirildi. Tank içerisine önceden hazırlanmış olan yürütme tamponu dolduruldu. Jelde yürütülmesi istenilen örnekler numune çözeltilisiyle karıştırılarak su banyosunda 90°C'de 5 dk bekletildi ve denatüre olmaları sağlandı. Hazırlanan örnekler kuyulara yüklenerek ilk önce 60 voltta 30 dk yürütüldü. Yığma jelinden ayırma jeline geçen örnekler 120 voltta 90 dk olacak şekilde tekrar yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel boyama işleminden geçirilip, oluşan bantlar görüntülendi (Üstün 2019). Yükleme tamponunda bulunan brom-timol mavisi, örneklerin takibi ve kuyulara yükleme kolaylığı sağladığı için kullanılmaktadır (Laemmli 1970).

## **SDS-PAGE Jelinin Görüntülenmesi**

Jel elektroforezinde yürütülen örneklerin bulunduğu jel cam plakalardan çıkarılıp boyama kabına alındı. Boyama kabı folyo ile sarılarak karanlık bir ortam sağlandı ve öncesinde hazırlanan tespit çözeltisi ile 30 dk çalkalayıcıda muamele edildi. Tespit çözeltisiyle muameleden sonra jel saf su ile yıkanarak redüksiyon çözeltisi eklendi. Eklenen redüksiyon çözeltisi ile karanlık ortamda çalkalayıcıda 30 dk muamele edildi. Daha sonra saf su ile 3 kez 5'er dakika olacak şekilde jel yıkandı. Yıkama işlemi esnasında, boya solüsyonu hazırlandı, yıkama işlemi bitince jelin bulunduğu boyama kabına eklenerek karanlık ortamda 20 dk çalkalayıcıda muamele edildi. Süre sonunda, boyama solüsyonu uzaklaştırılıp bantlar belirginleşinceye kadar yıkama-1 solüsyonu ile çalkalandı. Jel üzerinde bantlar belirginleşince jel görüntüsü kaydedildi, yıkama-1 solüsyonu uzaklaştırılıp yıkama-2 solüsyonu eklendi jelin taban rengi açılınca gümüş boyama işlemi sonlandırıldı (Alçıçek 2017).

## **Saflaştırılan Lipaz Enziminin Karakterizasyonu**

### **Enzimin optimum ve stabil sıcaklığının belirlenmesi**

Saflaştırılan lipaz enziminin aktif olduğu optimum sıcaklık değerini bulmak için 2,5 mL tampon (Tris-HCl pH:8,0 50mM) içerisinde 500 µL enzim ve 2,5 mL substrat (0,03 g palmitat / 10 mL propanol) çözeltisi karıştırılarak 15 dk farklı sıcaklıklarda (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C) inkübe edildi. Süre sonunda her sıcaklık değeri için 3 tekrar olacak şekilde aktivite tayini ölçüldü. Aktivitenin en yüksek olduğu sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi. Diğer sıcaklık değerleri optimum sıcaklığa göre bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için ise enzim örneği 50 mM pH:8,0 Tris-HCl tamponunda 1:1 oran olacak şekilde 30°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklıklarda farklı sürelerde (30dk, 60dk, 90dk, 120dk) inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda lipaz aktivite tayin metodu kullanılarak enzim aktivitesi hesaplandı. İnkübasyon öncesi aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek farklı sıcaklık değerlerindeki kalan aktivite yüzdesi (%) hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

### **Enzimin optimum ve stabil pH'sının belirlenmesi**

Saflaştırılması gerçekleştirilen lipaz enziminden 200 µL alınarak 1 mL, 50 mM'lık farklı pH (sodyum asetat pH:4,0-5,0 – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH:6,0-7,0 – Tris-HCl pH:8,0 – glisin NaOH pH:9,0-10,0-11,0-12,0) değerlerindeki tampon çözeltiler içerisinde 1 mL substrat (palmitat) çözeltisi ile karıştırılarak 55°C'de 15 dk inkübe edildi. Süre sonunda her sıcaklık değeri için 3 tekrar olacak şekilde aktivite tayini yapıldı. Aktivitenin en yüksek olduğu pH optimum pH

olarak belirlendi. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden hesaplandı.

pH stabilitesinin belirlenmesi için 1 mL enzim 1 mL, farklı pH (sodyum asetat pH:4,0-5,0 – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH:6,0-7,0 – Tris-HCl pH:8,0 – glisin NaOH pH:9,0-10,0-11,0-12,0) değerlerindeki tampon çözeltiler içerisinde oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda enzim aktivite protokolü uygulanarak aktivite tayini yapıldı. İnkübasyon öncesi aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek farklı pH değerlerindeki kalan aktivite yüzdesi (%) hesaplandı (Zaliha *et al.* 2006; Venugopal and Saramma 2007).

### **Metal iyonlarının lipaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Lipaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin incelenmesi için, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> iyonlarının Tris-HCl 50 mM pH:8,0 tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanarak 2,5 mL metal iyonu çözeltisi içerisine 500 µL enzim eklendi. 30 dk'lık inkübasyon sonunda lipaz aktivite tayini gerçekleştirildi. Kontrol olarak kullanılan metal iyonları içermeyen çözeltinin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi, kalan aktivite olarak hesaplandı (Yang *et al.* 2016).

### **Çeşitli organik çözücülerin lipaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Organik çözücülerin lipaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için metanol, etanol, kloroform, izopropanol, bütanol, aseton ve DMSO gibi organik çözücülerinin %25'lik ve %50'lik konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Ağzı kapaklı cam tüpler içerisinde 1,5 mL organik çözücü- tampon çözeltisi ve 500 µL enzim konularak karıştırıldı. Kontrol tüpüne ise 2 mL saf enzim konuldu. 50°C'de 1 saat ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakılan çözeltiler inkübasyon süresi sonunda lipaz enzim aktivite tayini yapıldı. Kontrol örneğine göre kalan aktivite hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

### **Bazı inhibisyon ajanlarının lipaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

İnhibisyon ajanlarının lipaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için öncelikle 1 mM ve 10 mM olacak şekilde pH:8,0 50 mM Tris-HCl tamponu ile DNTB, EDTA çözeltileri, %1 ve %5 konsantrasyon olacak şekilde 50 mM pH:8,0 Tris-HCl tamponu ile β-Merkaptoetanol çözeltisi ve %96'lık etanol ile PMSF çözeltisi hazırlandı. Saf enzim örneği hazırlanan bu çözeltiler içerisinde 50°C 180 rpm'de 30 dk boyunca çalkalayıcıda bekletildikten sonra lipaz aktivite tayini yapıldı. Kontrol örneğine göre diğer örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı(Malekabadi *et al.* 2018).

### **Bazı sürfaktanların ve okside edici ajanın lipaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi**

Kullanılan kimyasallardan sürfaktan olarak; Triton X-100, Tween 20, Tween 80 ve SDS ile okside edici ajan olarak; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maddelerinin farklı % konsantrasyonlarda olacak şekilde 50 mM pH:8,0 Tris-HCl ile 10mL'lik zelteleri hazırlandı. Saf enzim rneği ile hazırlanan zeltelerde 30 dk boyunca 50°C'de 180 rpm'de alkalamalı inkübatöre yerleştirilerek inkübe edildi. Süre sonunda aktivitesi 100 olarak kabul edilen kontrol tüpünün değerine karşılık diğer örnekler kalan aktivite olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

### **Saflaştırılan lipaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi**

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek iin paranitrofenol palmitat, paranitrofenil asetat, paranitrofenil oktanat substratlarının izopropanol ile 20 mM'lık zelteleri hazırlandı. 1 mL 50 mM pH:8,0 Tris-HCl tamponu, 1 mL hazırlanan substrat zeltisi ve 200 µL saf enzim karıştırılarak enzim aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite sonucuna sahip olan substrat değeri 100 olarak kabul edilip diğer örneklerin vermiş olduğu aktivite ona göre hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### Termofilik Bakterilerin İzolasyonu

İzolasyon sonunda, morfolojik olarak incelenen kolonilerden farklı olduğu düşünülen toplam 64 bakteriyal izolat elde edildi. Bu izolatlar kodlanarak (UF), stok kültüre alındı ve kullanılıncaya kadar -86°C’de muhafaza edildi.

### Lipaz Enzimi Üreten Suşların Belirlenmesi

Stok kültürlerden alınan 64 bakteri, TSA besiyerinde çizgi ekim yöntemiyle canlandırıldı. Ardından TSB sıvı besiyerinde ön kültüre alınıp, tribütirin agar içeren katı besiyerine ekimi gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda 64 izolattan 14 (UF1-UF14)’ünün agar besiyerinde şeffaf zon oluşturduğu ve lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. En iyi enzim üreten suşun belirlenebilmesi için; TSB sıvı besiyerinde ön kültüre alınan suşlardan inokülüm OD’si 2,0 olacak şekilde lipaz sıvı besiyerine aşılandı. 55°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından lipaz aktivite tayin prosedürü ile suşların aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar **Tablo 9**’da verilmiştir.

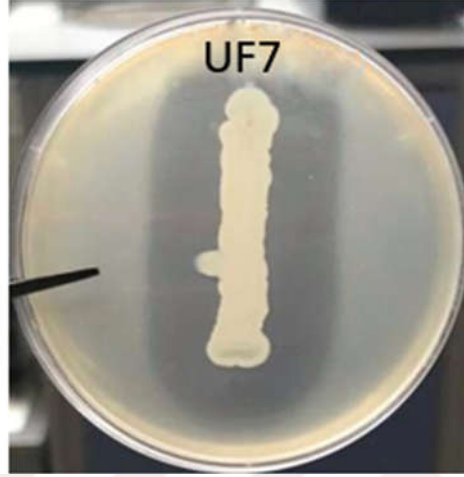
En yüksek aktivite gösteren UF7 kodlu mikroorganizma, Erzurum Hasankale kaplıcalarından izole edilmiştir. Kaplıca, 39°58'31.0"N 41°41'00.0"E (39.975263, 41.683336) enlem ve boylamlarında bulunmaktadır.

**Tablo 9.** Termofilik Bakterilerin Lipaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması

İzolat Kodu	Lipaz Aktivitesi (U/mL)
UF1	55,4
UF2	37,2
UF3	24,6
UF4	12,1
UF5	48
UF6	46,3
<b>UF7</b>	<b>61</b>
UF8	55
UF9	39,3
UF10	19,8
UF11	24,9
UF12	21,5
UF13	37,8
UF14	39,8

## Seçilen İzolatın Moleküler Teşhisi

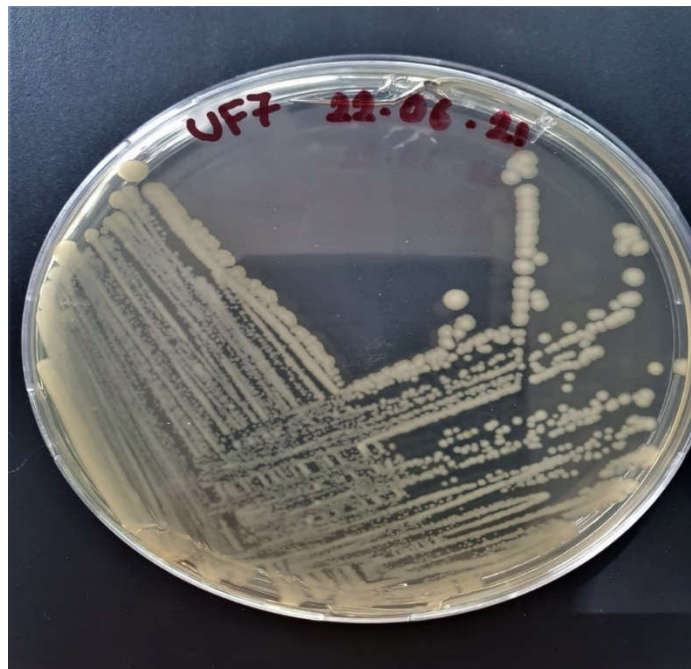
Petride oluşturduğu şeffaf zon çapı (Şekil 4) ve paralel olarak aktivitesi en yüksek olan suş UF7 olarak tespit edildi. Bundan sonraki tüm deneysel çalışmalarda bu izolat kullanıldı. Çalışılan bakterinin morfolojik (Şekil 5), fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir (Tablo 10).



Şekil 4. UF7 bakterisinin tribütirin agar besiyerinde görüntüsü

Tablo 10. Çalışılan Bakterinin Morfolojik Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

UF7	Hücre Morfolojisi	Fizyolojik			Morfolojik			Biyokimyasal	
		pH	Sıcaklık	Tuz	Gram	Endospor	Hareketlilik	Oksidaz	Katalaz
	Krem rengi/Çubuk	7-8	55-65°C	%4	+	+	+	+	Zayıf (+)



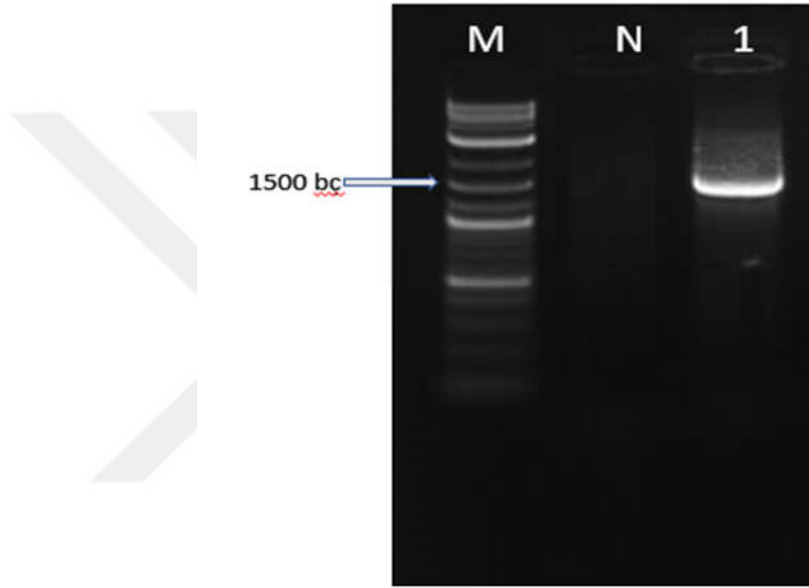
Şekil 5. UF7 bakterisinin TSA besiyerindeki görüntüsü

## Genomik DNA İzolasyonu

Çalışma için seçilen izolatın genomik DNA'sı Promega (A2360) Kit protokolüne uygun olarak izole edildi. Daha sonra %1'lik agaroz jelde yürütülerek, DNA'nın saflığı kontrol edildi.

## 16S rRNA PCR

Bakteride bulunan 16S rRNA gen bölgesi evrensel (27F ve 1492R) primerler kullanılarak PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Elde edilen PCR örneği, %1'lik agaroz jelde yürütülerek yaklaşık 1500 bp'lik tek bant profili elde edildi.



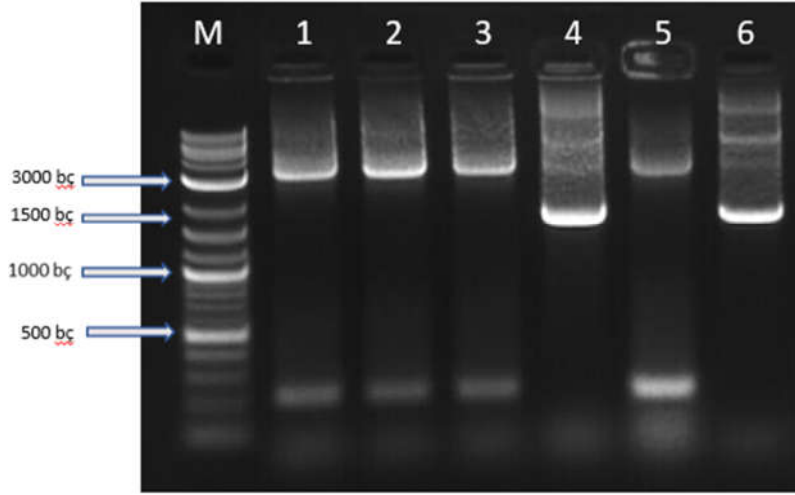
Şekil 6. *Anoxybacillus gonensis* UF7'nin 16SrRNA jel görüntüsü

## Klonlama

Seçilen uygun bir vektör sistemi ile 16S rRNA gen bölgesi klonlandı. Petriler, mavi-beyaz koloni oluşumu açısından incelendi.

## Koloni PCR

Petrilerde oluşan beyaz koloniler, koloni PCR işlemine tabii tutuldu. Elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jel üzerinde yürütülerek, 1500 bp'de bant veren koloni/koloniler pozitif olarak kabul edildi (Şekil 7).



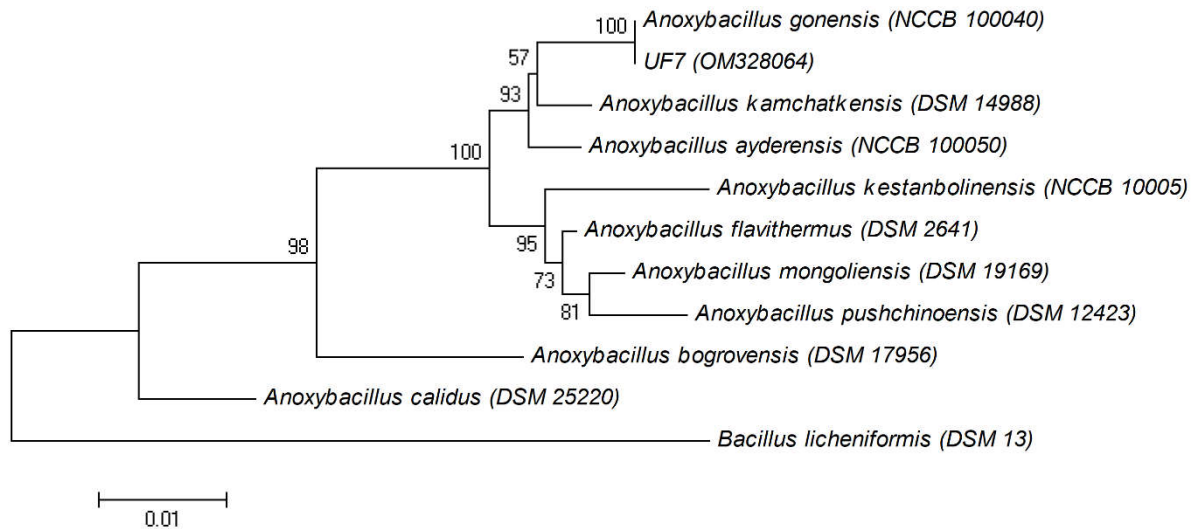
**Şekil 7.** Koloni PCR görüntüsü: (M: Markır (BioLabs N0550S) 4 ve 6 pozitif olarak kabul edilen örnekler)

### Plazmit İzolasyonu

İzole edilen plazmitlerde, istenen gen bölgesinin bulunup bulunmadığı *EcoRI* kesim enzimi kullanılarak incelendi. Uygun konsantrasyona sahip pozitif sonuç veren örnekler, Macrogen (Hollanda) firmasına sekans analizi için gönderildi.

### DNA Dizi Analizi

Firmadan gelen analiz sonuçları için, 16S rRNA sekans verileri anlamlı hale getirildi ve Eztaxon'daki diziler ile kıyaslama yapıldı. Elde edilen veriler sonucunda UF7 suşunun %99 oranında *Anoxybacillus gonensis* türüne benzediği tespit edildi ve OM328064 numarası ile Gen Bankasına girişi yapıldı. Daha sonra test suşunun, diğer termofilik türlerle olan taksonomik ilişkisini ortaya koymak için, NJ (Neighbor-joining) yöntemiyle filogenetik ağaç çizildi (**Şekil 8**).



**Şekil 8.** Filogenetik ağaç

### **A. *gonensis* UF7'den Lipaz Enziminin Saflaştırılması**

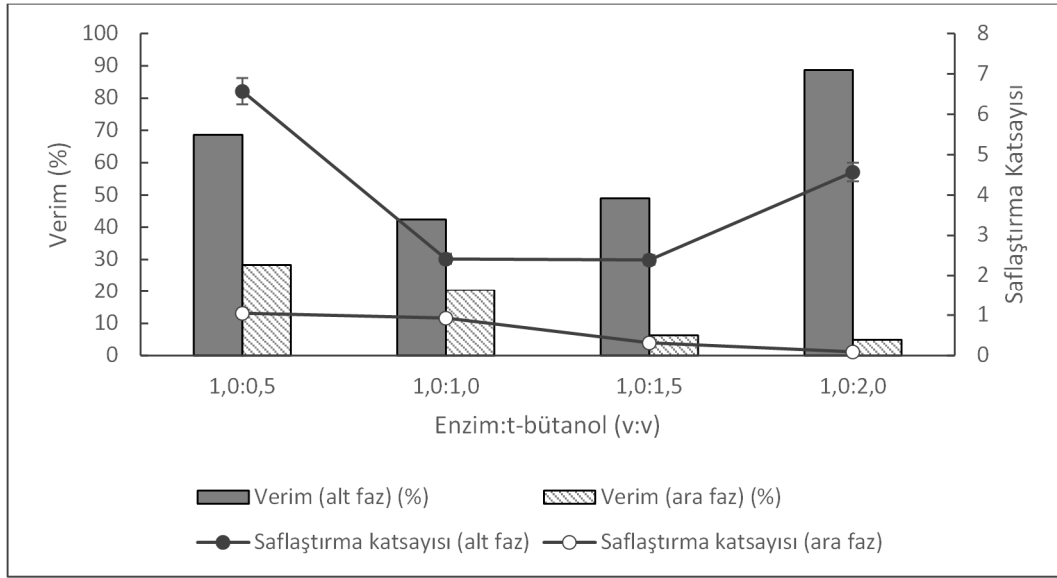
Saflaştırma işlemi için geleneksel saflaştırma yöntemlerine alternatif olarak kullanılan bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi olan üçlü faz ayırma (TPP) metodu kullanıldı. Daha sonra geleneksel bir yöntem olan amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve kromatografik yöntemden oluşan saflaştırma metodu uygulandı.

Saflaştırma işlemine başlamadan önce; 1L sıvı lipaz besiyeri hazırlandı, 250 mL'lik erlenlere 100'er ml olacak şekilde bölünüp otoklavlandı, ardından eşit miktarda (OD 2.0 olacak şekilde) ön kültürden aşılansak inkübasyona bırakıldı. Üretilen bu kültürün bir kısmı TPP de, diğer kısmı ise amonyum sülfat ve iyon değişim kromatografisinde homojenat olarak kullanıldı.

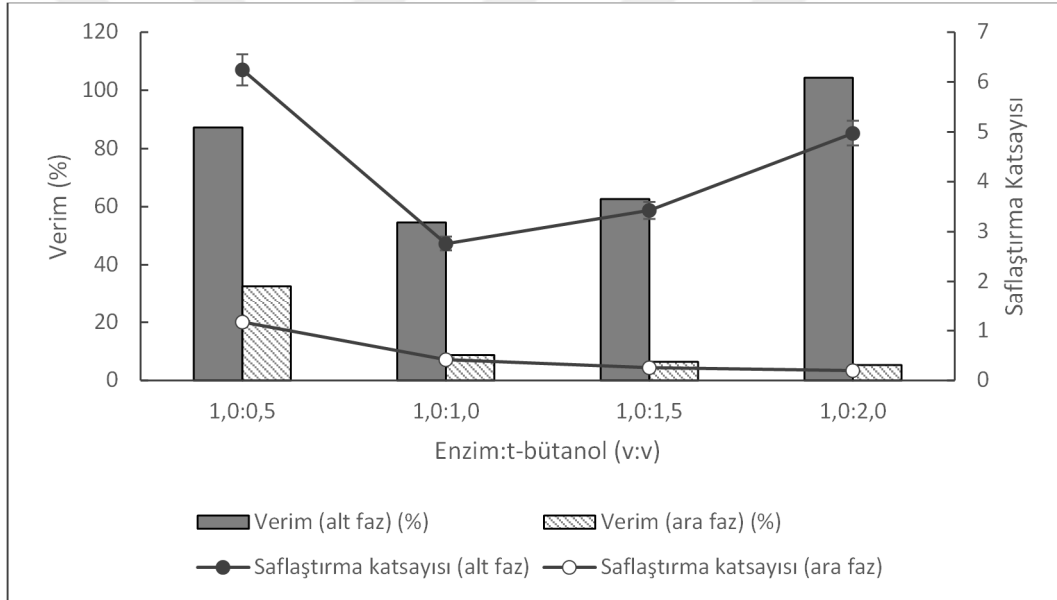
### **Lipaz Enziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Saflaştırılması**

#### **TPP sisteminde amonyum sülfat miktarı ve organik çözücü oranının belirlenmesi**

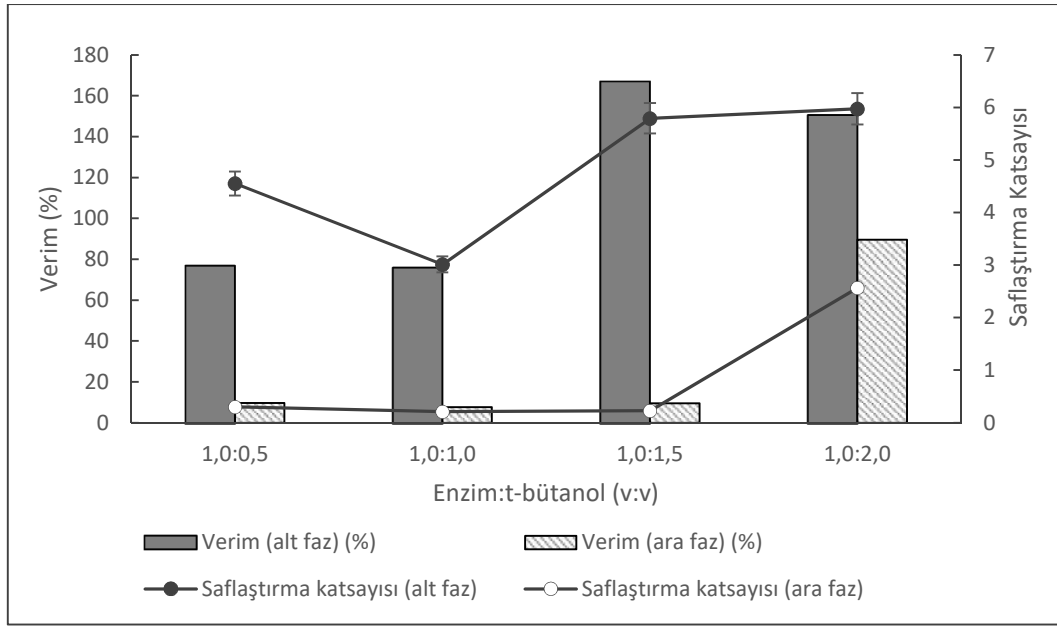
Literatür tarama sonucunda sabit bir tuz konsantrasyonu (%70) seçildi. Seçilen tuz konsantrasyonlarıyla farklı oranlarda homojenat:*t*-bütanol denenerek alkol oranı belirlendi. Daha sonra belirlenen alkol oranıyla, farklı tuz konsantrasyonları denenerek gerekli olan tuz miktarı tespit edildi. Optimizasyon işleminde her tuz konsantrasyonuna farklı olacak şekilde homojenat:*t*-bütanol oranları denendi. Bu çalışmada farklı amonyum sülfat konsantrasyonları (%20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80) ve farklı homojenat:*t*-bütanol oranları (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) kullanılarak 50°C'de optimizasyon çalışmaları yapıldı. Saflaştırılan lipazın alt fazda bulunduğu, en yüksek verimin ve saflaştırma katsayısının %70 amonyum sülfat uygunluğunda ve 1,0:1,0 homojenat:*t*-bütanol oranında elde edildiği tespit edildi. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı *t*-bütanol oranlarında hazırlanan grafikler gösterilmiştir (Şekil 9-15).



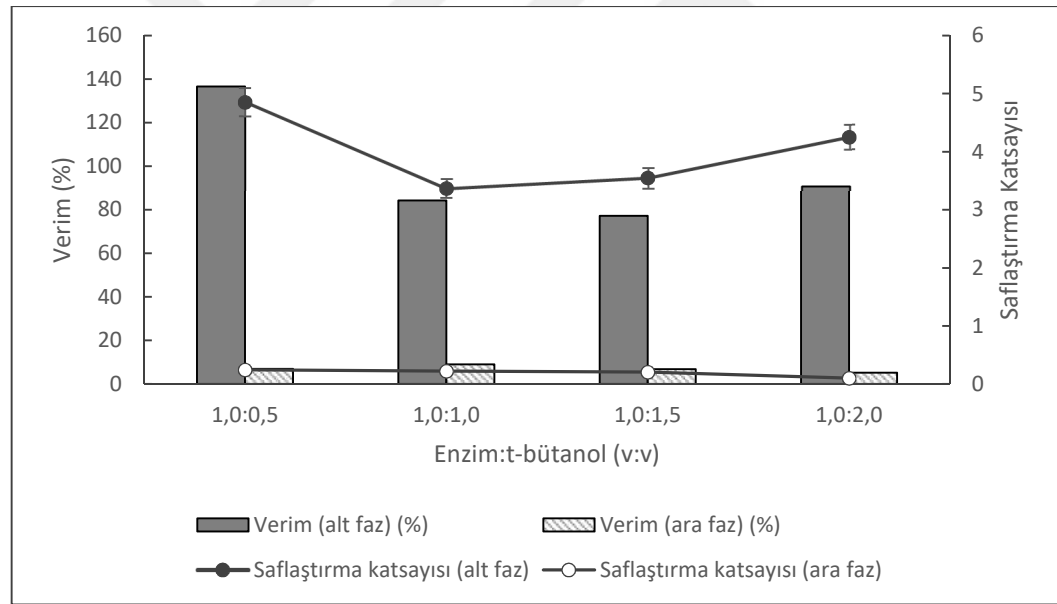
**Şekil 9.** TPP metodunda %20 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranlarının *Anoxybacillus gonensis* UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



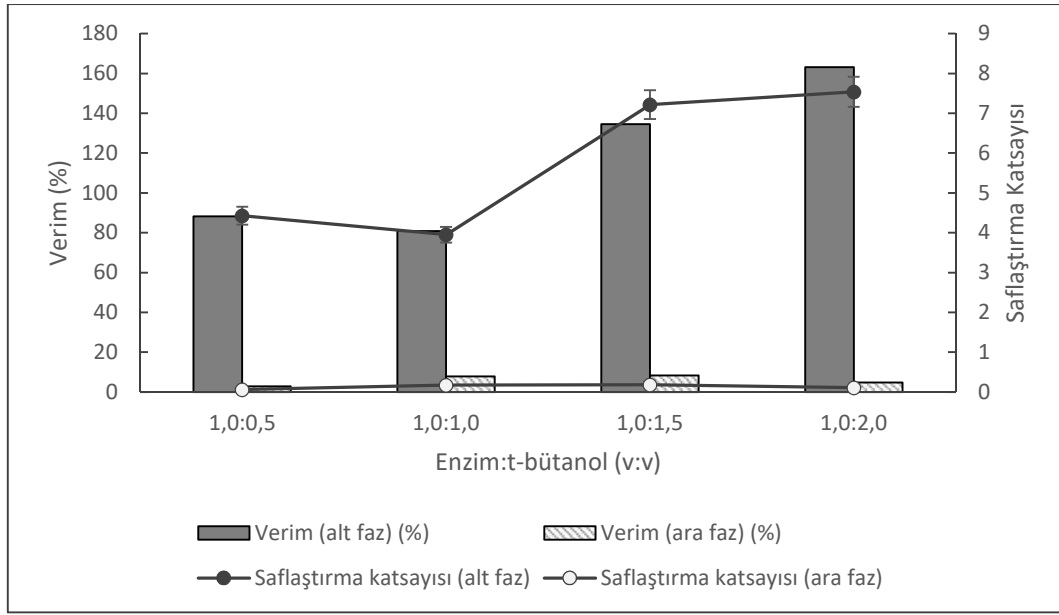
**Şekil 10.** TPP metodunda %30 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının *A. gonensis* UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



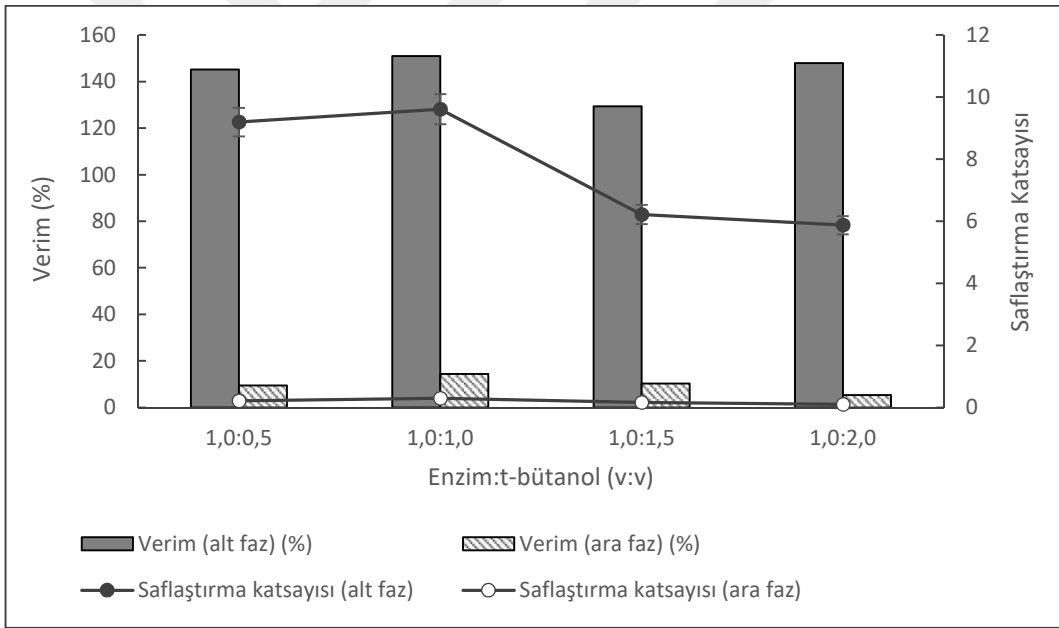
**Şekil 11.** TPP metodunda %40 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının *A. gonensis* UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



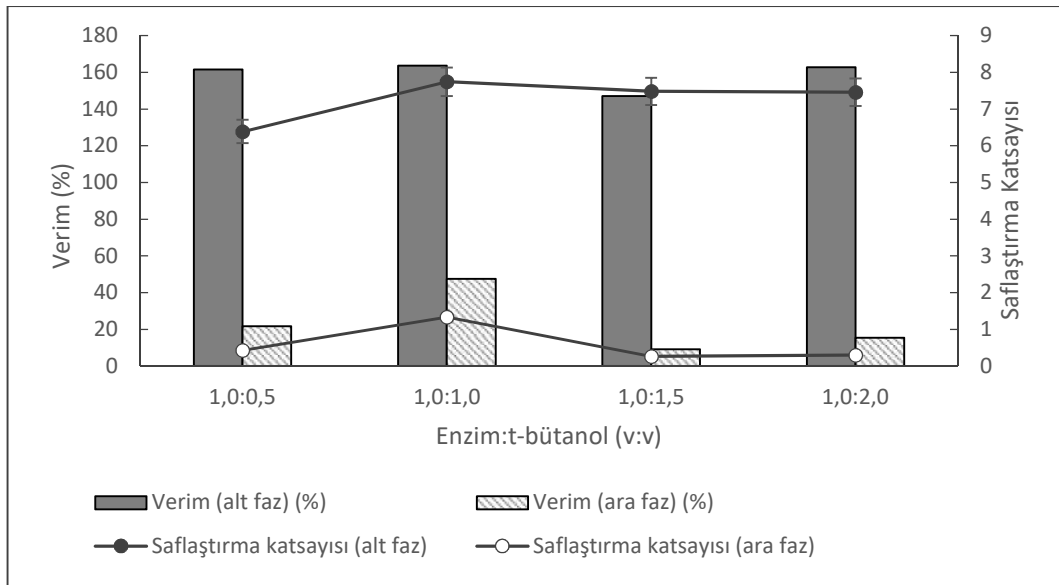
**Şekil 12.** TPP metodunda %50 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının *A. gonensis* UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



**Şekil 13.** TPP metodunda %60 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının *A. gonensis* UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



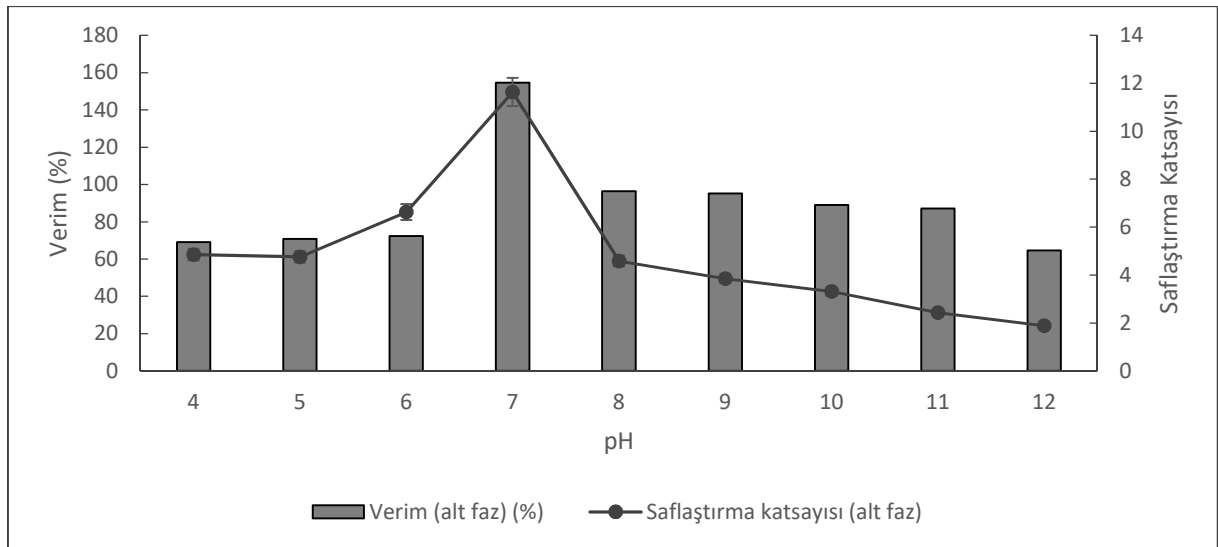
**Şekil 14.** TPP metodunda %70 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının *A. gonensis* UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



**Şekil 15.** TPP metodunda %80 amonyum sülfat konsantrasyonu ve farklı t-bütanol oranının *A. gonensis* UF7 lipaz enziminin saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi

### TPP Sisteminde pH'nın Belirlenmesi

Üçlü faz ayırma sisteminde (TPP) önemli olan diğer bir parametre ise sistemin pH'sıdır. pH değeri, saflaştırılması hedeflenen proteine ve proteinin iyon yüküne etki ederek, oluşacak olan fazlar arasında dağılımın farklılaşmasıyla ayırım sağlar (Katı 2013). TPP işleminde en uygun tuz miktarı ve organik çözücü oranı belirlendikten (%70 tuz konsantrasyonu ve 1,0:1,0 oranında t-bütanol) sonra farklı pH değerleri belirlenen oranlar üzerinde işlemler tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda pH değeri 7,0 olarak tespit edildi ve Şekil 16'da verilen grafikte gösterildi.



**Şekil 16.** *A. gonensis* UF7 lipaz enziminin saflaştırılmasında TPP metodunda pH'nın etkisi

TPP yöntemi ile saflaştırma işleminde yüksek verim elde edilmesi için gerekli olan tuz miktarı, organik çözücü oranı ve uygun pH gibi saflaştırma işlemini etkileyen faktörlerin

optimizasyonu yapıldıktan sonra belirlenen parametreler doğrultusunda enzim saflaştırma işlemi gerçekleştirildi (Saflaştırma sonuçları **Tablo 11**'de verildi). %70 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda; 1,0:1,0 homojenat:*t*-bütanol oranı ile lipaz enzimi, pH: 7,0'da %79,91 verimle 6,01 kat olarak TPP prosesindeki alt fazdan saflaştırıldı.

**Tablo 11.** TPP Yöntemi İle Lipaz Enzimi Saflaştırma Sonuçları

Numune	Toplam	Enzim aktivite	Enzim Protein	Toplam Aktivite	Toplam Protein	Spesifik Aktivite	Saflaştırma	Verim (%)
	Hacim(mL)	(U/mL)	(mg)	(U/100 mL)	(mg)	(U/mg)	katsayısı	
Homojenat	100	61	0,58	6100	58,36	104,52	1	100
TPP- Alt faz	40	121,87	0,19	4875	7,75	629,03	6,01	79,91
TPP- Ara faz	20	50,8	2,28	1016	45,65	22,25	0,21	16,65

Kuepethkaew *et al.* (2017), Pasifik beyaz karides hepatopankreasından TPP yöntemiyle %50 amonyumsülfat doygunluğunda 1,0:1,0 *t*-bütanol- homojenat oranında 3,49 kat %87,41 verimle, Dobrev *et al.* (2019), *Rhizopus arrhizus*'dan %30 amonyum sülfat doygunluğunda, pH:7,0'de 1,0:0,5 ham ekstrakt/*t*-bütanol oranı ile %71 verim ve 19,1 kat, Labuschagne *et al.* (1997), *Flavobacterium odoratum*'dan %7,7 verimle 1,5 kat, Kumar *et al.* (2015), *Thermomyces lanuginosa*'dan Triton X-100 deterjanlı ve deterjansız olmak üzere iki ayrı TPP yöntemi ile sırasıyla 17,8 spesifik aktivite, 2,1 kat ve 3,3 spesifik aktivite, 0,57 kat lipaz enzimi saflaştırmışlardır. Bu bakımdan verilerimiz literatür ile uyumludur.

### ***Anoxybacillus gonensis* İzolatından Lipaz Enziminin Geleneksel Saflaştırma Metotları ile Saflaştırılması**

#### **Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi**

*Anoxybacillus gonensis* UF7 bakterisinin hücre dışı ürettiği lipaz enzimi saflaştırılması için; lipaz üretim besiyeri ile oluşturulan kültür 6000 rpm'de 25 dk santrifüj edilerek daha sonra amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. %80 amonyum sülfat doygunluğunda %85,49 verimle 2,4 kat saflaştırıldı (**Tablo 12**). Enzimin bulunduğu çökelti 100 mM pH:8,0 Tris-HCl tampon çözeltisinde çözülerek diyaliz yapıldı.

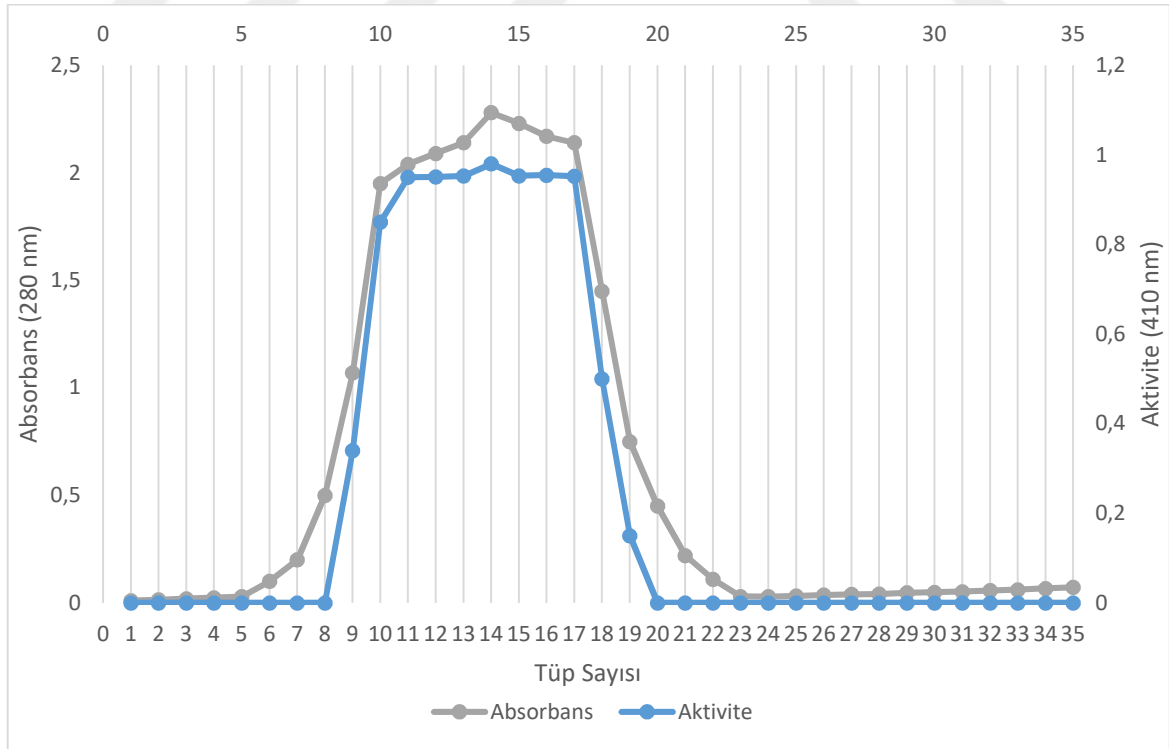
Literatür araştırması sonucu Raut *et al.* (2012), %30-80 amonyum sülfat aralığında %76,2 verimle 1,18 kat, Malekadi *et al.* (2018), *Bacillus licheniformis*'den %80 amonyum sülfat aralığında %63 verimle 10,06 kat, D.-W. Lee *et al.* (1999), *Bacillus thermoleovorans*'dan %30-80 amonyum sülfat aralığında %19 verimle 223 kat ve Zhao *et al.* (2021), *S. caprae*'den %80 amonyum sülfat çöktürmesiyle %54,67 verimle 3,75 kat enzim

saflaştırması yapmışlardır. Kısmi saflaştırma aşaması için, verilerimizin literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

### İyon değişim kromatografisi

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işleminin ardından elde edilen tampon içindeki enzim çözeltisi Q-Sefaroz iyon değişim kolonu ile saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Mikrobiyal kaynaklı üretilen lipaz enzimlerinin saflaştırılması için genellikle iyon değişim, jel filtrasyon kromatografisi gibi farklı kromatografik teknikler kullanılmaktadır (Scopes 1993). *A. gonensis* UF7 'den lipaz enzimi %40,65 verimle 13,10 kat saflaştırıldı (Tablo 12).

Kumar *et al.* (2005), *Bacillus coagulans*'dan DEAE-Sefaroz kolon kromatografisi ile %2,5 verim 40 kat, Kambourova *et al.* (2003), *Bacillus stearothermophilus*'dan ultrafiltrasyon işleminden sonra, Sefadex G-200 ve DEAE-Selüloz kolonları kullanılarak %10,2 verim 19,25 kat ve D.-W. Lee *et al.* (1999), *Bacillus thermoleovorans*'dan amonyum sülfat, DEAE-sephacel iyon kromatografisi ve Sephacryl S-200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile %19 verim 223 kat enzim saflaştırması yapmışlardır. Kromatografik yöntem ile saflaştırma aşaması için verilerimizin literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 17 ve Tablo 12'de gösterildi.



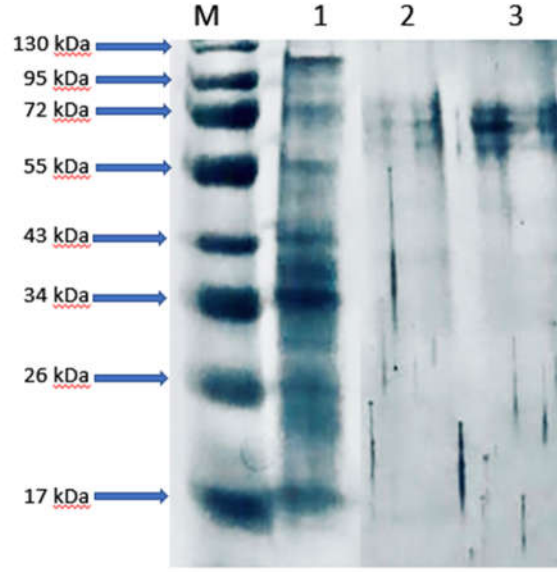
Şekil 17. Lipaz enziminin iyon değişim kromatografisi ile elüsyonu gösteren grafik

**Tablo 12.** Amonyum Sülfat ve İyon Değişim Kromatografisi Yöntemleri İle Saflaştırma Sonuçları

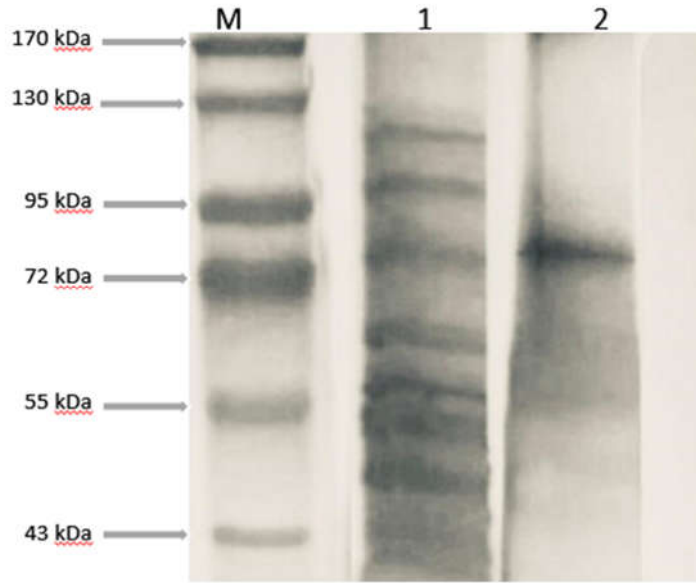
Numune	Toplam Hacim(mL)	Enzim aktivite (U/mL)	Enzim Protein (mg)	Toplam Aktivite (U/100 mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Homojenat	100	61	0,58	6100	58,36	104,52	1	100
Amonyum Sülfat	50	104,3	0,41	5215	20,79	250,8	2,4	85,49
İyon Değişim Kromotografisi	25	99,2	0,072	2480	1,81	1370	13,10	40,65

### SDS-PAGE ile Enzimin Molekül Kütlesinin Tayini

Saflaştırma işlemlerinden sonra *Anoxybacillus gonensis* UF7 izolatının ürettiği lipaz enziminin molekül kütlesini belirlemek için, SDS-PAGE yapıldı. **Şekil 18.** 'de TPP sonucu elde edilen alt faz ve ara faza ait 55-73 kDa arasında üç bant; **Şekil 19.** 'da iyon değişim kromatografisi sonucu ile ~73 kDa 'da tek bant gözlemlendi. İki SDS-PAGE 'de de ortak olan bu bantın, lipaz enzime ait olabileceği düşünülmektedir. Lipazların molekül ağırlıkları 11-92 kDa arasında değişmektedir (Lawson *et al.* 1994; Schmid and Verger 1998). Molekül kütlesi, 92 kDa olan lipaz enzimi *Pseudomonas gessardii* suşundan saflaştırılmıştır (Ramani *et al.* 2010). SDS-PAGE yöntemi ile molekül kütlesini belirleyen benzer çalışmalarda; Faiz *et al.* (2007), *Anoxybacillus gonensis*'den saflaştırdıkları esteraz enziminin molekül ağırlığını 62 kDa, Zhao *et al.* (2021), *Staphylococcus caprae*'den saflaştırdıkları lipaz enziminin molekül ağırlığını 87 kDa, Sangeetha *et al* (2010), *Bacillus licheniformis* lipazının 40 kDa, Dong *et al* (2020), bitki unu esterazının molekül ağırlığını 68 kDa, Oh *et al* (1999), *Staphylococcus haemolyticus* lipazının 45 kDa, Ramani *et al* (2010), *Pseudomonas gessardii*'den saflaştırılan asidik lipazın molekül ağırlığını 94 kDa olarak belirlenmiştir.



**Şekil 18.** *A. gonensis* UF7'den TPP yöntemiyle saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü, M: Marker, 1: Homojenat, 2: TPP ara faz, 3: TPP alt faz



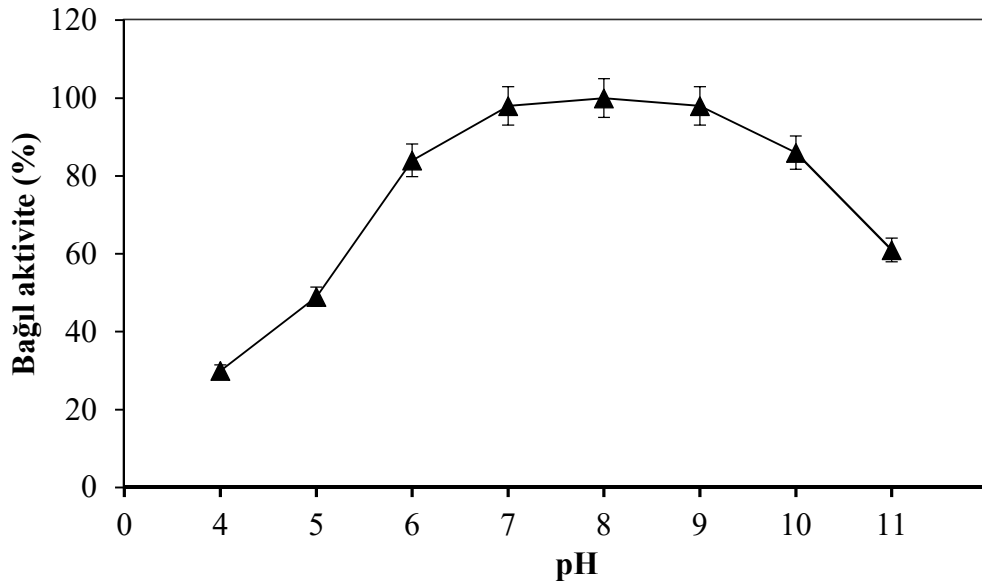
**Şekil 19.** *A. gonensis* UF7'den iyon değişim kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan lipaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü, M: Marker, 1: Homojenat, 2: İyon değişim saflaştırması

### Lipaz Enzimi İçin Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları

#### Saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH ve pH stabilitesinin bulunmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar

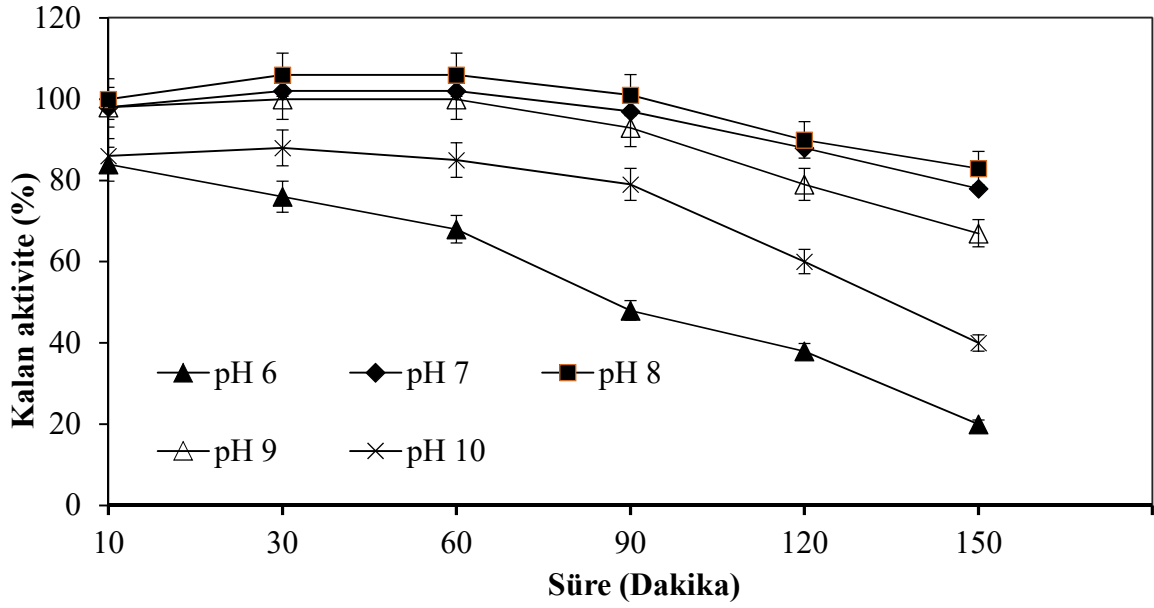
Bakteriyal lipazlar genellikle (pH 4.8 asidik bir optimum pH'ya sahip *P. fluorescens* SIK W1 lipazı hariç) alkali veya nötral pH'da aktivite gösterirler; *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *B. atrophaeus* SB-2 ve *B. licheniformis* SB-3 suşlarından elde edilen lipazlar pH 3-12 aralığında aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Bradoo *et al.* 1999; Litthauer *et al.* 2002). Elde

edilen sonuçlara göre çizilen grafikler incelendiğinde; *A. gonensis* UF7'den saflaştırılan lipaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 8,0 olarak belirlendi.



Şekil 20. Lipaz enziminin optimum pH 'sı için oluşturulan aktivite ölçüm grafiği

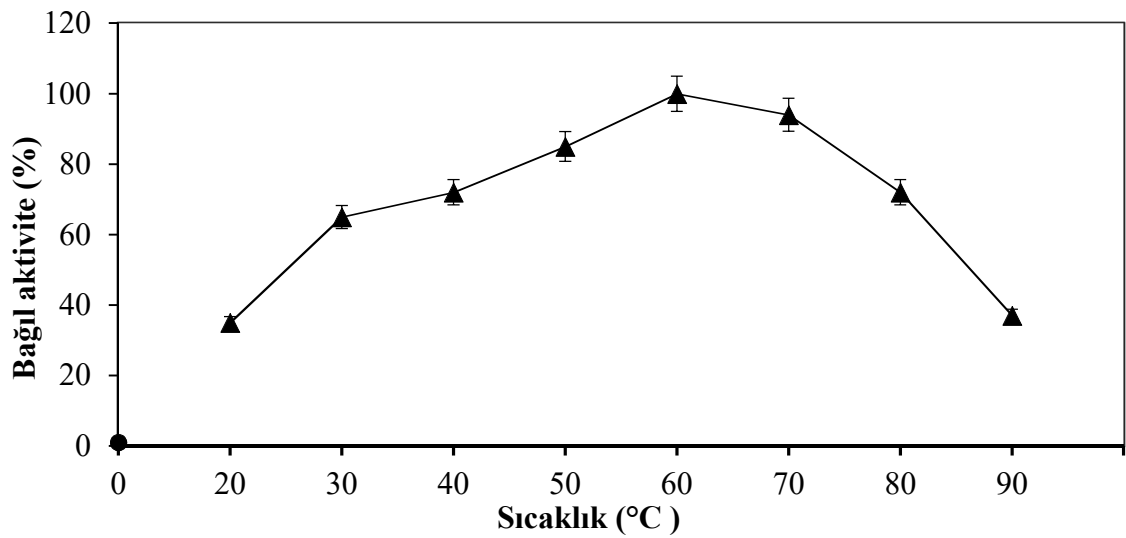
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda pH:7,0-8,0 ve 9,0'da 30 dakikalık inkübasyon sonucunda aktivitenin arttığı, ayrıca pH:7,0-8,0 ve 9,0 değerlerinde 90 dk'ya kadar aktivitesinin %90'dan fazlasını koruduğu, 90 dk sonunda tüm pH değerlerinde aktivitenin düştüğü tespit edilmiştir. Literatür araştırmaları doğrultusunda *Pseudomonas fluorescens*'den saflaştırılan lipaz enzimi pH 9,0'da optimum aktivite, pH 3,0-11,0 aralığında ise aktivitesinin %70'den fazlasını koruduğu bildirilmiştir (Kulkarni and Gadre 2002), *Bacillus coagulans*'den izole edilen lipaz enzimi pH 8,5'de optimum aktivite gösterirken pH 8,0-10,5 arasında aktivitesini korumuştur (Kumar *et al.* 2005), Malekabadi *et al.* (2018), *Bacillus licheniformis*'den saflaştırdıkları lipaz enzimi için optimum pH'nın 8,0 olduğunu ve pH 7,0-10,0 aralığında aktivitesinin %80'ini koruduğunu ve *Bacillus stearothermophilus* MC7'den saflaştırılan lipaz enzimi pH:8,0'da optimum aktivite gösterirken pH:7,0-11,0 aralığında stabilitesini koruduğunu bildirmişlerdir (Kambourova *et al.* 2003).



Şekil 21. Lipaz enzimi için oluşturulan stabil pH grafiği

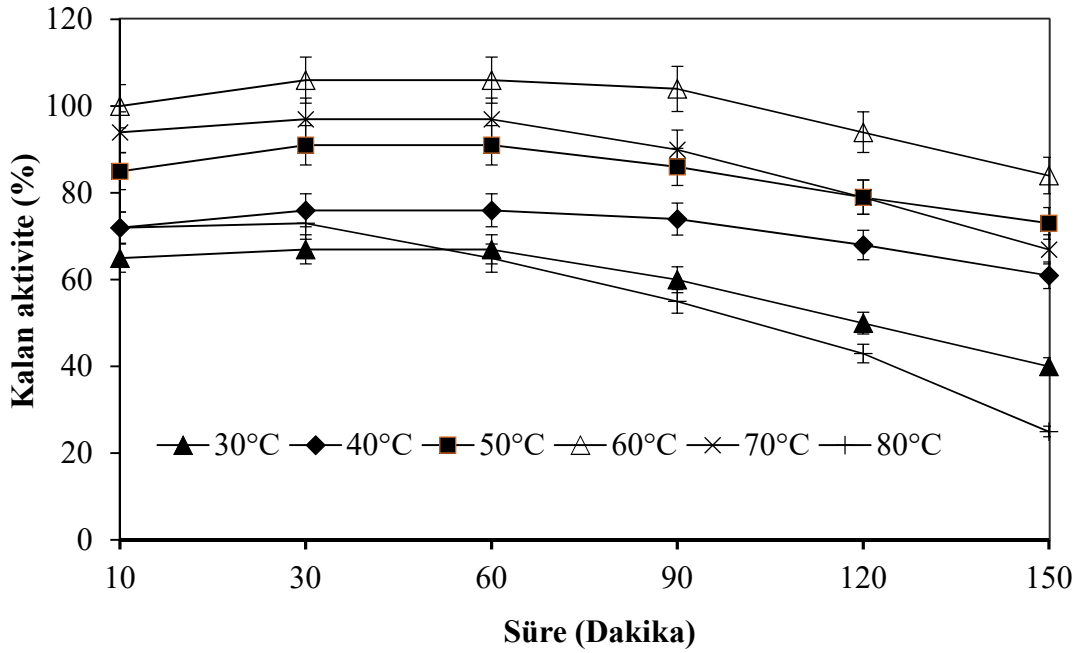
#### Safılaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin bulunmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar

Tez çalışması kapsamında *A. gonensis* UF7 suşundan safılaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklık profili ve sıcaklık stabilitesi belirlendi. Enzimin optimum ve stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla; 20-80°C arasındaki farklı sıcaklık değerleri çalışıldı ve enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 22’de gösterildi. Bakteri kaynaklı lipaz enzimlerinin optimum sıcaklığı genellikle 30-60°C arasında olmasına rağmen, literatür araştırmalarına göre aktivite gösterebilecekleri daha düşük veya daha yüksek sıcaklık aralıkları olduğu saptanmıştır (Kanwar *et al.* 2006).



Şekil 22. Lipaz enziminin optimum sıcaklığının ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği

*A. gonensis* UF7 suşundan saflaştırılan lipazın sıcaklık stabilitesini belirlemek için, 30°C-80°C sıcaklıkları aralıklarında 30, 60, 90 ve 120 dk'lık sürelerle enzim inkübe edilerek, belirli aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı.

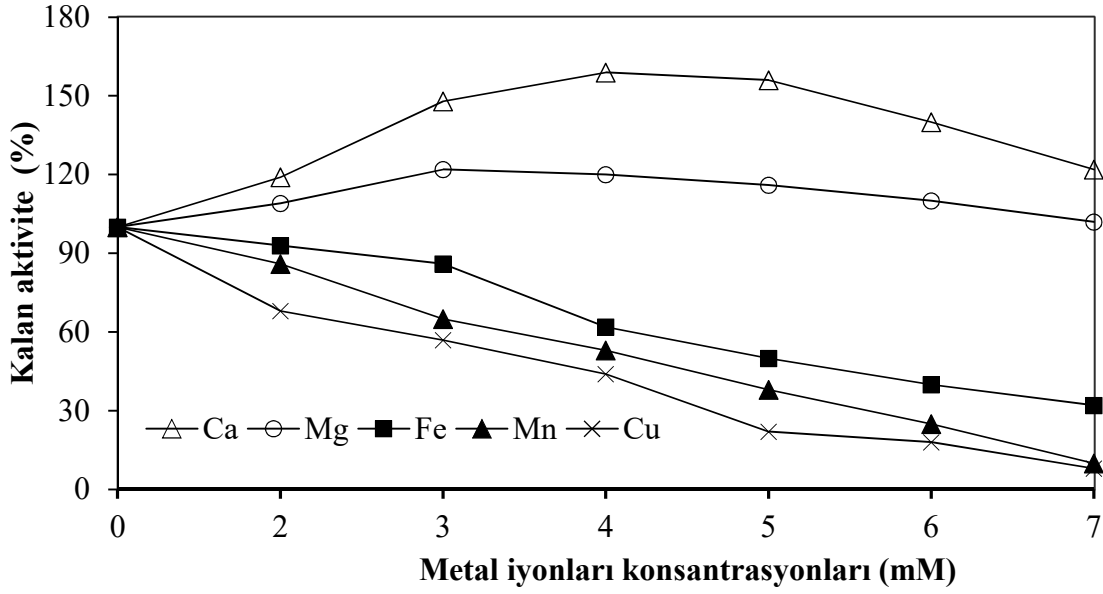


**Şekil 23.** Sıcaklığın lipaz enzimi kararlılığı üzerine etkisi

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; saflaştırılma işlemi gerçekleştirilen lipaz enzimi için, 30 dk süre sonunda tüm sıcaklık değerlerinde aktivitenin arttığı, 60 dk. kadar stabil kaldığı, bir saatin sonunda ise aktivite de azalmanın meydana geldiği görülmüştür. Tüm bu sıcaklık değerlerinde ise, 60°C'de 90 dk boyunca enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu kaydedildi (Şekil 23). Literatür araştırması sonucunda *Pseudomonas fluorescens* bakteri suşunda saflaştırılan lipaz enzimi 55°C'de optimum aktivite gösterirken, 60°C'ye kadar aktivitesinin %70'ten fazlasını koruyarak stabil kalmıştır (Kulkarni and Gadre 2002), *Bacillus coagulans* bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi ise aynı şekilde 55°C optimum sıcaklığa sahiptir ve 70°C'ye kadar olan sıcaklıklarda ise stabilitesini korumuştur (Kumar *et al.* 2005), *A. gonensis* bakterisinden saflaştırılan esteraz enziminin 60-80°C'de optimum aktiviteye sahipken 80°C'de 1 saatlik inkübasyonu sonucu aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir (Faiz *et al.* 2007), Bora and Bora (2012), yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. LBN2 bakteri suşunda saflaştırdıkları lipaz enziminin optimum sıcaklığı 60°C olduğunu ve 60°C'de 1 saatlik inkübasyon sonucu aktivitesinin %90'ını, 70°C'de ise %70'ini koruduğunu gözlemlemişlerdir.

## Farklı konsantrasyonlarda metal iyonlarının saflaştırılan lipaz enzimine etkisini belirlemeye yönelik elde edilen sonuçlar

Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> gibi farklı metal iyonlarının *A. gonensis* UF7 bakterisi suşundan saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesine etkileri incelendi. Metal iyonları, çoğu proteinin üç boyutlu yapılarının oluşumunda ve aktif merkezde substratların katalizinde önemli bir rol oynar. Bazı enzimler, aktiviteleri için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar ve enzim aktivitesini farklı şekilde etkileyebilirler (Bock *et al.* 1999; DiTusa *et al.* 2001). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> iyonlarının 4mM konsantrasyona kadar enzim aktivitesini arttırdığı, 6 ve 7 mM 'dan sonra aktivitede azalma meydana getirdiği. Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> iyonlarının enzim aktivitesini düşürdüğü, en büyük inhibitör etkinin Cu<sup>2+</sup> 'da olduğu kaydedilmiştir. Literatür araştırması sonucu D.-W. Lee *et al.* (1999), *Bacillus thermoleovorans* bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin Ca<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> metal iyonları ile katalitik fonksiyonu aktive ettiğini, Kumar *et al.* (2005), *Bacillus coagulans* bakterisinden saflaştırılan enzimin aktivitesini K<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> iyonları artırırken, Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> iyonlarının inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Mehta *et al.* (2012) izole ettikleri bakteri suşu olan TS-4 *Geobacillus* sp.'den izole ettiği lipaz enziminin denenen tüm metal iyonlarının 1mM'lık çözeltileri aktiviteyi artırdığını tespit etmişlerdir, yine Zhao *et al.* (2021), *Staphylococcus caprae* bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesinin Na<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> iyonları varlığında arttığını saptamışlardır. Kambourova *et al.* (2003), *Bacillus stearothermophilus* bakterisinde saflaştırılan lipaz enzimi aktivitesi Ca<sup>2+</sup> iyonu ile artarken, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> iyonlarının varlığında inhibe olmuştur. Malekabadı *et al.* (2018), *B. licheniformis* bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin; Ca<sup>2+</sup> iyonu 2,3 kat, Mn<sup>2+</sup> iyonu 1,3 kat, Sr<sup>2+</sup> iyonu 2 kat ve Ba<sup>2+</sup> iyonu 8 kat olacak şekilde aktivitesi artarken, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> iyonlarının 1 mM'lık çözeltileri aktiviteyi azaltırken, 10 mM'lık çözeltileri enzimi inhibe etmiştir. *G. stearothermophilus* AH22 lipazı Hg<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> iyonları varlığında inhibe olurken; Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Fe<sup>2+</sup> iyonları varlığında aktive olduğu bildirilmiştir (Ekinci 2015). Yang *et al.* (2016), *Burkholderia ubonensis* SL-4 lipazının Mg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> iyonlarının inhibisyona neden olduğunu, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> iyonlarının 1mM lık çözeltileri aktiviteyi çok az azaltırken 10Mm'lık çözeltilerinin inhibe ettiğini belirtmiştir (Şekil 24).

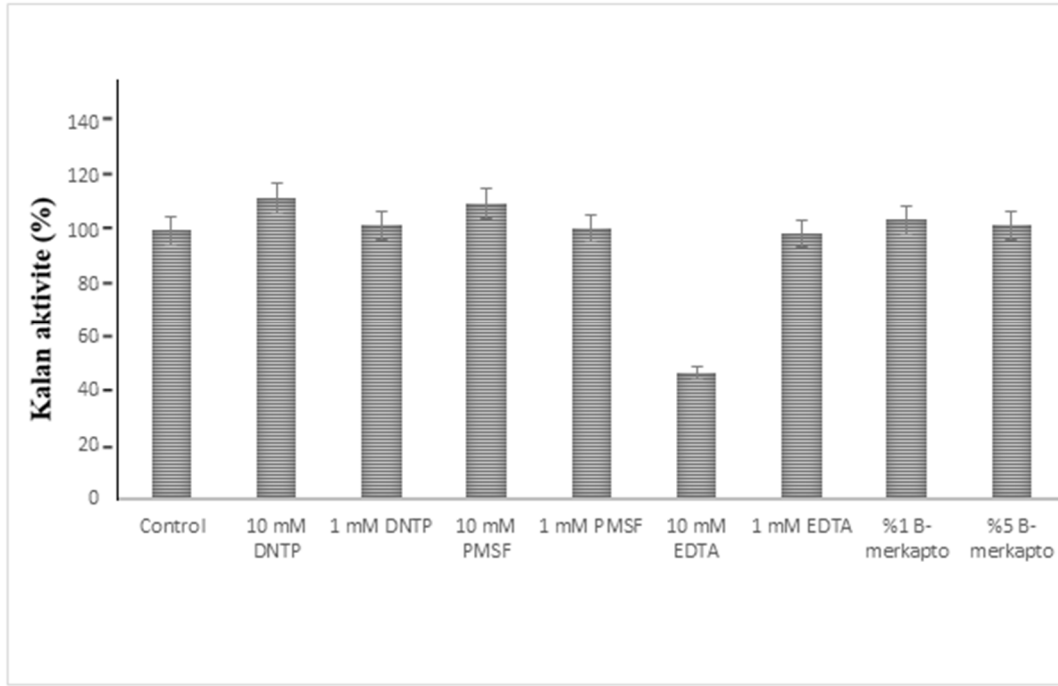


Şekil 24. Bazı metal iyonlarının lipaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

### Bazı inhibitör etkisi olan kimyasalların saflaştırılan lipaz enzimi aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar

*A. gonensis* UF7 bakteri suşundan saflaştırılmış lipaz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi olan kimyasalların etkisini belirlemek için yapılan çalışmada 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı ve enzim ile muamele edilmesi sonunda elde edilen veriler Şekil 25 ile gösterilmiştir. Lipaz enzimi ara-yüzey aktivasyonu ile ilgili aktif merkezlerini örten bir kapak yapısına sahiptirler ve bu yapı sayesinde bazı lipazlar PMSF tarafından inhibe olmaz veya çok az inhibisyon görülür (Snellman *et al.* 2002; Li and Zhang 2005; Gaur *et al.* 2008). *A. gonensis* UF7 kodlu bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin inhibisyon ajanları varlığında etkisinin belirlenmesi amacıyla; 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda EDTA, PMSF, DNTB ve %1- %5 konsantrasyonlarda  $\beta$ -Merkaptoetanol kullanıldı. 1 mM EDTA'nın varlığında enzim aktivitesi %1 oranında azalırken, 10 mM EDTA'nın %53 inhibisyona sebep olduğu, kullanılan diğer inhibisyon ajanlarının enzim aktivitesi üzerinde arttırıcı etki gösterdikleri tespit edildi. Literatür araştırması sonucu Ekinci (2015) tarafından yapılan çalışmada *Geobacillus stearothermophilus* lipazının  $\beta$ -merkaptoetanol varlığında aktive olduğu, Tarakçıoğlu (2016) tarafından yapılan çalışmada ise EDTA ve  $\beta$ -merkaptoetanol ile *B. thermoamylovorans* ST-10 lipazının aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir. Literatür kapsamında bulunan çalışmada  $\beta$ -Merkaptoetanol varlığında aktivitenin ortalama %70 oranında korunduğu, EDTA varlığında ise aktivitenin %54 oranında muhafaza edildiği ve PMSF'nin 1mM ve 10 mM'lık çözeltilerinin enzim inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Malekabadi *et al.* 2018). Yapılan başka bir çalışmada, Kambourova *et al.* (2003) ve Yang *et al.* (2016) sırasıyla *Bacillus stearothermophilus* ve *Burkholderia ubonensis*

bakterilerinden saflaştırılan lipaz enzimi için PMSF inhibisyon etkisi göstermiştir. Aynı şekilde *Aneurinibacillus thermoaerophilus* HZ bakteri suşundan saflaştırılan lipaz 1,0 mM ve 5,0 mM PMSF varlığında sırasıyla % 64.9 ve %41.4 oranında aktivitesininin korunduğunu (Masomian *et al.* 2013) ve *Aureobasidium pullulans* HN2.3 lipazı 1,0 mM ve 5,0 mM PMSF varlığında sırasıyla %73.1 ve 67.2 oranında aktivitesini koruduğunu saptamışlardır (Liu *et al.* 2008).

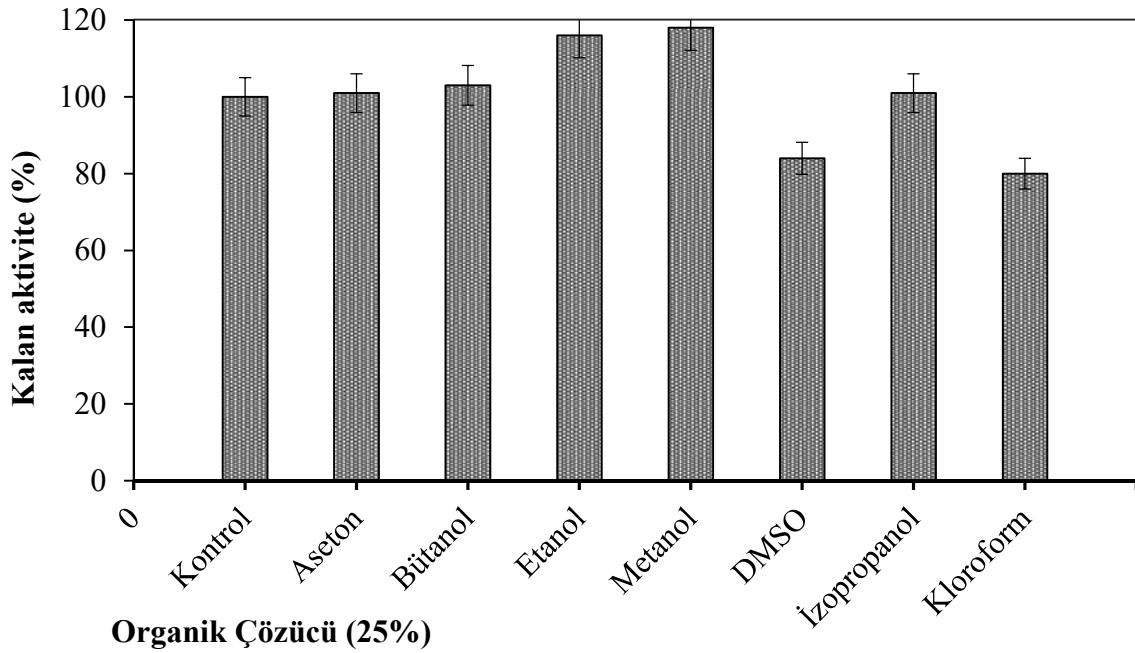


Şekil 25. Bazı inhibisyon ajanlarının lipaz aktivitesi üzerine etkisi

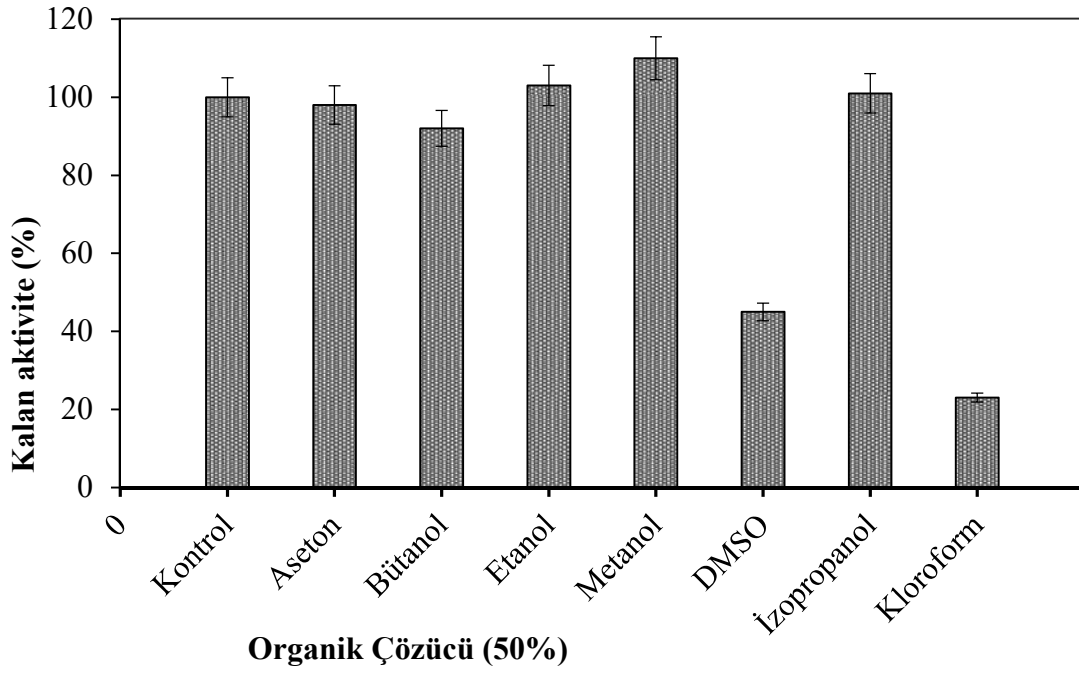
#### Farklı konsantrasyonlardaki organik çözücülerin saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar

*Anoxybacillus gonensis* UF7 bakteri suşundan saflaştırılan lipaz enziminin metanol, etanol, bütanol, DMSO, kloroform, izopropanol ve aseton gibi organik çözücülerin %25 ve %50 konsantrasyon olacak şekilde 60 dk'lık inkübasyonu için lipaz enzimi üzerine etkileri araştırıldı. Endüstriyel biyoteknolojide geniş substrat spesifitesine sahip olan lipaz enzimi önemli bir biyokatalizördür ve genellikle organik çözücülerde stabildir (Jaeger and Reetz 1998; Sharma *et al.* 2012). Elde edilen veriler doğrultusunda enzimin; %25 konsantrasyonluk organik çözücülerde inkübasyon sonucu aktivitenin, DMSO varlığında %16, kloroform varlığında ise %20 azalma görüldüğü, diğer organik çözücülerin aktiviteyi artırdığı tespit edilirken (Şekil 26), %50 konsantrasyonluk organik çözücülerde 1 saatlik inkübasyonu sonucunda aktivitesinde etanol, metanol ve izopropanol varlığında artma görülürken, kloroform varlığında %77, DMSO varlığında %55, bütanol varlığında %8 ve asetonunda %2 aktivite kaybı gözlenmiştir. (Şekil 27) Literatür araştırması sonucu Bora and Bora (2012)

*Bacillus* sp. bakterisinden saflaştırdıkları lipaz enziminin aseton ve etanol içerisinde aktivitesinin sabit kaldığını, Zhao *et al.* (2021) *Staphylococcus caprae* lipazının izooktan, gliserol, DMSO ve metanolde aktivitesinin arttığını, Kuepethkaew *et al.* (2017) *Litopenaeus vannamei* lipazının etanol ve metanolde yüksek aktivite gösterdiği, Kambourova *et al.* (2003) *Bacillus stearothermophilus* lipazını sorbitol aktive ederken, metanol, etanol, izopropanol, aseton, gliserole karşı tolerans gösterdiğini buna karşın bütanol, toluol, kloroform ve dietileter varlığında tam inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Yang *et al.* (2016) *Burkholderia ubonensis* SL-4 lipazının %15 izopropanol, asetonitril, aseton, tert bütanol, kloroform varlığında sabit/aktif olduğu, %30 ksilenin aktiviteyi azalttığı tetrahidrofuran, n-bütanol, 1-hekzan, izooktanolun %15-30'luk çözeltilerinin inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, SL-4 lipazı gliserol, etilen, glikol, DMSO, DMF, metanol, etanol, n-hekzan, n-heptan ve izooktan da aktif/kararlı olmuştur. *Acinetobacter* sp. ile yapılan başka bir çalışmada ise etanol, izopropanol ve asetonun lipaz aktivitesini bir miktar artırdığı, metanolün ise aktiviteyi değiştirmedeği bulunmuştur(Khoramnia *et al.* 2011).



Şekil 26. Organik çözücülerin (%25) lipaz enzimi üzerindeki etkisi

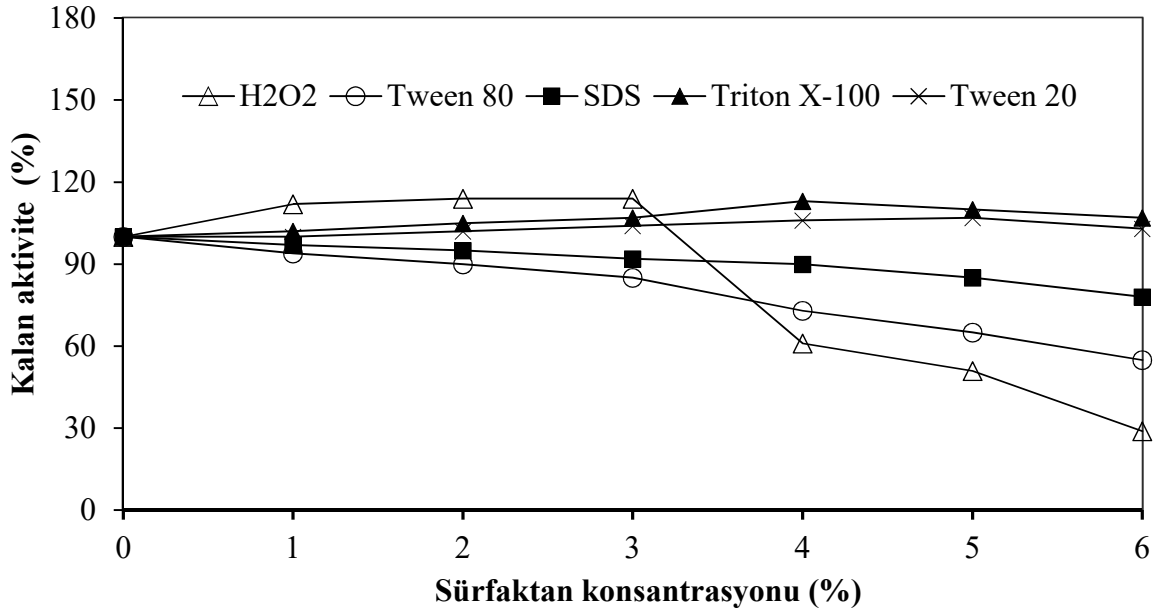


Şekil 27. Organik çözücülerin (%50) lipaz enzimi üzerindeki etkisi

***Anoxybacillus gonensis* UF7 bakteri suşundan saflaştırılan lipaz enzimi üzerine okside edici ajan ve sürfaktanların etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar**

Bakteri suşundan saflaştırılan lipaz enzimi üzerine sürfaktanların ve okside edici ajanın (SDS, Triton X-100, Tween 20, Tween 80 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) etkisini belirlemek için sırasıyla %1, %2, %3, %4, %5, %6'lık konsantrasyon olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. Deneysel sonuçlarına göre elde edilen veriler doğrultusunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin %1, %2 ve %3'lük konsantrasyonlarda aktiviteyi artırdığı, Tween 80 ve SDS'in %1, %2 ve %3'lük konsantrasyonlarında aktivitenin büyük oranda korunduğu belirlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Tween 80 ve SDS'in %4, %5 ve %6'lık konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi gösterdiği, Tween 20 ve Triton X-100'ün denenen tüm konsantrasyonlarında aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Literatür araştırmaları sonucunda; Zhao *et al.* (2019), *Penicillium camembertii*' den saflaştırılan lipaz enzimi ile yapılan başka bir çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında enzim katalitik aktivitesini korurken, Skouridou *et al.* (2003), yaptıkları çalışmada saflaştırdıkları lipaz enzimi 75 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye 30 dakika maruz kalınca aktivitesini %50'sini kaybettiğini belirtmişlerdir. Yine bu doğrultuda yapılan çalışmalarda; Tarakçıoğlu (2016), Tween-80, Tween-20, Triton X-100 ve SDS'nin ise *B. thermoamylovorans* ST-10 lipazının aktivitesini yüksek oranda düşürdüğü, Malekabadi *et al.* (2018), *B. licheniformis* KM12 lipazının aktivitesinin Tween 20'nin %0,1'lik konsantrasyonunda aktivite %10 artarken %1,0'lık konsantrasyonunda %4 oranında düştüğü, SDS'in %0,1'lik konsantrasyonu %6, %1'lik konsantrasyonu ise %35 aktivite kaybına yol açtığı, Triton X-100'ün ise aktiviteyi %0,1'lik konsantrasyonunda %8 artırırken %1'lik konsantrasyonunun aktivitede %5 düşüşüne neden

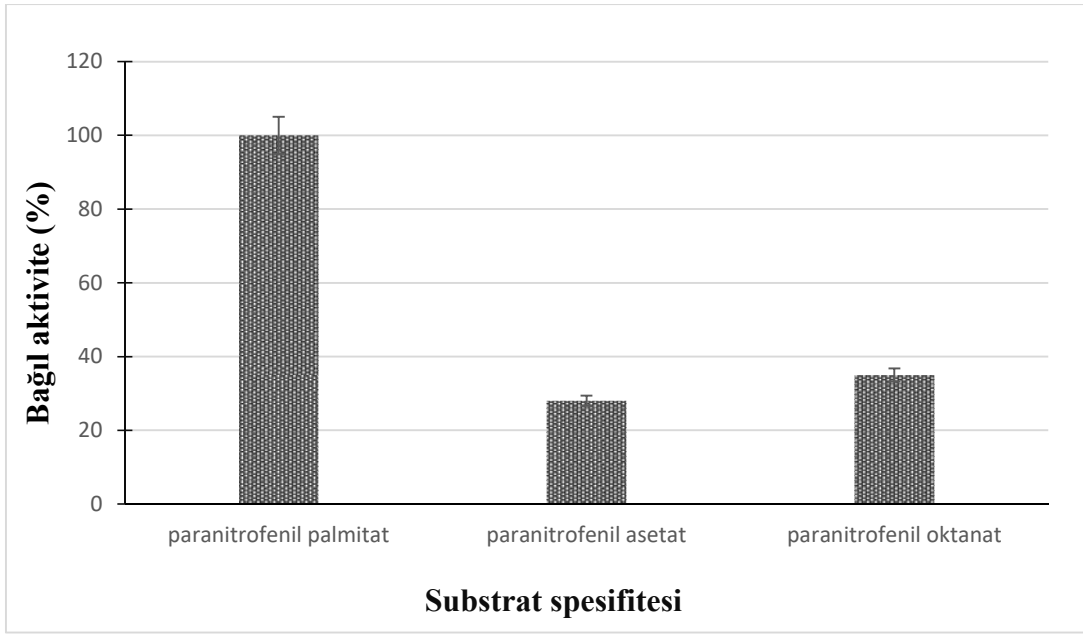
olduğu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında ise 1 mM konsantrasyonda aktivite %92 oranında korunurken, 10 mM konsantrasyonda ise, %78,6 oranında aktivite gösterdiği bildirilmiştir.



Şekil 28. Saflaştırılan lipaz enzimi üzerine okside edici ajan ve sümfaktanların etkisi

#### ***Anoxybacillus gonensis* UF7 bakterisi suşundan saflaştırılan lipaz enziminin substrat spesifitesini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar**

*Anoxybacillus gonensis* UF7 bakterisi suşundan saflaştırılan lipaz enzimin paranitrofenil palmitat, paranitrofenil asetat ve paranitrofenil oktanat gibi substratların varlığında aktivitesi lipaz enzimi aktivite tayini metodu ile incelendi. Enzimin en yüksek aktiviteyi paranitrofenol palmitat substratı ile gösterdiği belirlendi. Benzer olarak literatürde Mehta *et al.* (2012), yaptıkları çalışmada saflaştırdıkları lipaz enziminin en yüksek aktivitesini paranitrofenol palmitat varlığında, Malekabadi *et al.* (2018), yaptıkları çalışmada elde ettikleri lipaz enzimi için optimum aktivite gösteren substratın paranitrofenol palmitat olduğunu, Zhao *et al.* (2021), yaptıkları çalışmada *S. caprae* bakterisi suşundan saflaştırdıkları lipaz enziminin optimum aktiviteyi aynı şekilde paranitrofenol palmitat varlığında gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu doğrultuda elde ettiğimiz veriler literatür ile uyumludur.



Şekil 29. Lipaz enziminin substrat spesifitesinin belirlenmesi

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında, termal kaynaklardan elde edilen sıcak su örneklerinden 64 adet bakteri izole edildi. Elde edilen izolatlar arasından 14 bakterinin lipaz enzimi ürettiği tespit edildi. En yüksek lipaz aktivitesi gösteren UF7 kodlu suşun, *Anoxybacillus gonensis* türüne %99,9 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Bu suştan enzim üretilip, TPP, amonyum sülfat ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırıldı, karakterize edildi ve SDS-PAGE ile görüntülendi.

Sıvı lipaz besiyerinde geliştirilen *A. gonensis* UF7 suşunun ürettiği lipaz enzimini saflaştırmak için, kromatografik ve non-kromatografik olmak üzere iki farklı yöntem kullanıldı. İlk olarak kültürden santrifüjle çöktürülerek elde edilen homojenata, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz işlemi uygulandı; %80 amonyum sülfat doygunluğu ile enzim %85,49 verimle 2,4 kat saflaştırıldı. Daha sonra işleminin devamında; kromatografik yöntemlerden olan iyon değişim kromatografisi işlemi gerçekleştirildi. *A. gonensis* UF7'den elde edilen lipaz enzimi Q-sefaroze iyon değişim kolonuna tatbik edilerek %40,65 verimle 13,10 kat saflaştırıldı. Geleneksel yöntemlere alternatif olarak sunulan TPP yöntemi ile %79,91 verimle, 6,01 kat olarak alt fazdan saflaştırıldığı tespit edildi. Saflaştırma işlemlerinden sonra, SDS PAGE yöntemi ile lipaz enziminin molekül kütlesi ~73 kDa olarak belirlendi.

Molekül ağırlığı tespit edilen enzim için, karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Sonuçta, lipaz enziminin pH: 8'de maksimum aktiviteyi gösterdiği ve 90 dakikaya kadar aktivitesini koruduğu gözlemlendi. Enzimin, maksimum 60°C'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu, 90 dk. kadar aktiviteinin arttığı, 120. dk'dan sonra aktivitenin azaldığı belirlendi. Saflaştırılan enzim  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının 4 mM'lık konsantrasyona kadar olan çözeltileriyle aktivitesi artarken  $Cu^{+2}$  iyonu varlığında inhibe oldu. Okside edici ajan ve bazı sürfaktan maddeler varlığında belirli konsantrasyonlara kadar aktivite artmış/korunmuş, daha yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon gerçekleşmiştir. Ayrıca saflaştırılan lipaz enzimi metanol ve etanol gibi organik çözücüler varlığında yüksek aktivite göstermiştir. Enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda ise, en yüksek aktivite paranitrofenol palmitat varlığında görülmüştür.

Elde edilen veriler ışığında;

- Kaplıca sularından izole edilen mikroorganizmalarda lipaz aktivitesine sahip izolatların bulunduğu,
- İzolatların tribütirin agar da oluşturdukları zon çapı ile aktivitelerinin paralellik gösterdiği,
- Literatür verilerinde farklı kDA'larda SDS-PAGE bant görüntülerinin bulunduğu, bu çeşitliliğin izolatlar arasındaki farklılığa bağlı olarak gerçekleştiği,
- TPP'nin lipaz izolasyonu için uygun bir yöntem olduğu; bu yöntemin ekonomik, basit ve kısa zamanda gerçekleştirilebildiği,
- Literatürde ilk kez *A. gonensis* tarafından lipaz enzim üretiminin çalışıldığı sonucuna varılmıştır.

Lipaz enzimi üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Başta kâğıt yapımı, deterjan ve tekstil gibi birçok endüstrinin ihtiyaç duyduğu lipazlar için özellikle yüksek sıcaklık stabilitesine sahip ve ekstraselüler olması tercih edilmektedir. Bunun için de en yüksek enzim aktivitesine sahip yeni mikrobiyal suşların literatüre kazandırılması önem arz etmektedir.

Yeni üretilen lipazlardan endüstrideki en büyük beklenti; saflaştırılmalarının kolay olması, yüksek termal kararlılık göstermeleri ve pH'dan etkilenmemeleridir.

*A. gonensis* UF7 tarafından üretilip, saflaştırılan lipaz için daha sonraki dönemlerde endüstriyel uygulamalara yönelik araştırmalar yapılabilir. Birçok alanda kullanılabilen bu enzimin %13,10 saflaştırma katsayısı ile deterjan, tekstil gibi alanlarda rahatlıkla kullanılabileceği düşünülmektedir. İlaç endüstrisi gibi yüksek saflıkta enzim kullanılan alanlarda, üretim verimliliğini ve saflaştırma maliyetini azaltmak için rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, enzimin seri üretimi sağlanabilir. Ayrıca amonyum sülfat ve iyon değişim kromatografisine ek olarak jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak, daha yüksek saflıkta enzim üretilebilir.

Enzimlerin endüstriyelde sadece bir kez kullanımı ve pahalı olması yüksek maliyet doğurmaktadır. Bu nedenle enzimlerin immobilizasyonu ve tekrar tekrar kullanılması endüstriyel proseslerin maliyetini azaltacaktır. Ürettiğimiz enzim için de; daha kararlı olması ve ürün kaybedilmemesi gibi avantajları nedeniyle immobilizasyon çalışmalarında kullanılabilir.

İnhibitör araştırmaları da enzimlerin karakterizasyonunda oldukça önemlidir. Lipaz için inhibisyon çalışmalarının obezite önleme proseslerinde kullanılabilmesi bilinmektedir. Bu çalışmada kullanılan, bilinen inhibitör ve bileşiklerin yanı sıra mevcut veya yeni

sentezlenen bileşiklerin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri de incelenebilir. Ayrıca elektroforez ile tespit edilen enzimin bandı kesilerek, elde edilen saf lipazın amino asit dizisi ve üç boyutlu yapısı netleştirilebilir.



## KAYNAKLAR

- Abdollahi, P., Ghane, M., & Babaeekhou, L., (2021). Isolation and characterization of Thermophilic bacteria from Gavmesh Goli hot spring in Sabalan geothermal field, Iran: Thermomonas hydrothermalis and Bacillus altitudinis isolates as a potential source of Thermostable Protease. *Geomicrobiology Journal*, 38(1), 87-95.
- Abol Fotouh, D. M., Bayoumi, R. A., & Hassan, M. A., (2016). Production of thermoalkaliphilic lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and application in leather industry. *Enzyme Research*, 2016.
- Adıgüzel, A. (2006). Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. In: Atatürk.
- Akbar, A., Sitara, U., Ali, I., Muhammad, N., & Khan, S. A., (2014). Isolation and characterization of biotechnologically potent *Micrococcus luteus* strain from environment. *Pakistan journal of zoology*, 46(4).
- Albayrak, Ş., (2018). Türkiyenin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıçalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açından Önemli olan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniveristesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alçıçek, E., (2017). Van İlinden Alınan Sıcak su örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, *Bacillus licheniformis* E10'dan Proteaz Enziminin Üçlü Faz Sistemiyle (TPP) ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Almeida, J. R., Fávoro, L. C., & Quirino, B. F., (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 1-16.
- Ananthi, S., Ramasubburayan, R., Palavesam, A., & Immanuel, G., (2014). Optimization and purification of lipase through solid state fermentation by *Bacillus cereus* MSU as isolated from the gut of a marine fish *Sardinella longiceps*. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(5), 291-298.
- Arica, M. Y., Yavuz, H., Patir, S., & Denizli, A., (2000). Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly (methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(2-3), 127-138.
- Arora, N. K., Mishra, J., & Mishra, V., (2020). *Microbial enzymes: roles and applications in industries*. (Vol. 11). Springer Nature.
- Arpigny, J. L., & JAEGER, K.-E., (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical journal*, 343(1), 177-183.
- Arslan, S., (2017). Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, Türkiye.
- Ashfaq, M., (2014). Basmati rice a class apart (a review). *Rice Research: Open Access*.

- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M., (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource technology*, 280, 478-488.
- Aulakh, S. S., & Prakash, R., (2010). Optimization of medium and process parameters for the production of lipase from an oil-tolerant *Aspergillus sp.*(RBD-01). *Journal of basic microbiology*, 50(1), 37-42.
- Bailey, J., & Ollis, D., (1986). *Applied enzyme catalysis. Biochemical engineering fundamentals*, 2, 157-227.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., & Mehrotra, R., (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 9-14.
- Bakir, Z. B., & Metin, K., (2016). Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(6), 1087-1097.
- Baltacı, M., (2015). Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selüloolitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler ...].
- Banica, F.-G., (2012). *Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
- Başbülbül, G., (2001). Aydın yöresi jeotermal sularındaki termofilik bakterilerin incelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi.
- Belduz, A. O., Dulger, S., & Demirbag, Z., (2003). *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1315-1320.
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G., (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368.
- 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.
- Bhavani, M., David, M., & Ghanta, V. C., (2013). Identification and characterization of novel lipase producing soil bacterial isolates B3 and B4 using 16S rDNA analysis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(1), 149-160.
- Bock, C. W., Katz, A. K., Markham, G. D., & Glusker, J. P., (1999). Manganese as a replacement for magnesium and zinc: functional comparison of the divalent ions. *Journal of the American Chemical Society*, 121(32), 7360-7372.
- Bora, L., & Bora, M., (2012). Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus sp* isolated from hot spring of Arunachal Pradesh, India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 30-42.
- Bradoo, S., Saxena, R., & Gupta, R., (1999). Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, 35(1-2), 57-62.
- Chen, C., Tian, H., Xing, S., Li, C., Zeng, X., & He, L., (2019). Influence of different parameters on reverse micelle extraction combined with acetone precipitation to purify sn-1, 3 extracellular lipase from *Aspergillus niger* GZUF36. *Journal of food science and technology*, 56(6), 2899-2908.

- Chen, G. S., & Segel, I. H., (1968). Purification and properties of glycogen phosphorylase from *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 127, 175-186.
- Chen, L., Dong, J., & Guo, X., (2017). Extraction of bovine serum albumin with reverse micelles from glucosylammonium and lactosylammonium surfactants. *Process Biochemistry*, 60, 108-114.
- Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., & Sayadi, S., (2011). A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids in health and disease*, 10(1), 1-8.
- Chiou, S.-H., & Wu, W.-T., (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, 25(2), 197-204.
- Choi, J.-M., Han, S.-S., & Kim, H.-S., (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 33(7), 1443-1454.
- Choudhury, P., & Bhunia, B., (2015). Industrial application of lipase: a review. *Biopharm J*, 1(2), 41-47.
- Çiftçi, M., Adıgüzel, A., Mustafa, E., & Şahin, F., (2004). *Bacillus* sp.(BA-142) Bakterisinden Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi/Partially Purification Of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From *Bacillus* sp.(BA-142) And Investigation Of Som. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(3-4).
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., & Anfinsen, C. B., (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2), 636.
- Daniel, R. M., & Cowan, D. A., (2000). Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(2), 250-264.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., Gargouri, Y., Ali, Y. B., & Aloulou, A., (2013). Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International journal of biological macromolecules*, 57, 232-237.
- Davranov, K., (1994). Microbial lipases in biotechnology. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, 30(4), 527-534.
- Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M.-A., & Roosens, N. H., (2020). Genetically modified micro-organisms for industrial food enzyme production: An overview. *Foods*, 9(3), 326.
- Demain, A., & Solomon, N., (1981). In industrial microbiology and the advent of genetic engineering. *Scientific American, Freeman & Comp.*, San Francisco, 3-14.
- Dennison, C., & Lovrien, R., (1997). Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein expression and purification*, 11(2), 149-161.
- Destain, J., Fickers, P., Weekers, F., Moreau, B., & Thonart, P. (2005). Utilization of methyloleate in production of microbial lipase. *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*,
- Di Pinto, A., Forte, V., Guastadisegni, M. C., Martino, C., Schena, F. P., & Tantillo, G., (2007). A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food control*, 18(1), 76-80.

- Dincer, C., Bruch, R., Costa-Rama, E., Fernández-Abedul, M. T., Merkoçi, A., Manz, A., Urban, G. A., & Güder, F., (2019). Disposable sensors in diagnostics, food, and environmental monitoring. *Advanced Materials*, 31(30), 1806739.
- DiTusa, C. A., Christensen, T., McCall, K. A., Fierke, C. A., & Toone, E. J., (2001). Thermodynamics of metal ion binding. 1. Metal ion binding by wild-type carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 40(18), 5338-5344.
- Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D. Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., & Keskinler, B., (2009). Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource technology*, 100(6), 1983-1991.
- Dobrova, V., Zhekova, B., & Dobrev, G., (2019). Use of aqueous two-phase and three-phase partitioning systems for purification of lipase obtained in solid-state fermentation by *Rhizopus arrhizus*. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1).
- Dong, L., He, L., & Huo, D., (2020). Three phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of plant-esterase from wheat flour. *Polish Journal of Chemical Technology*, 22(2), 42-49.
- Doukyu, N., & Ogino, H., (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical engineering journal*, 48(3), 270-282.
- Dror, A., Kanteev, M., Kagan, I., Gihaz, S., Shahar, A., & Fishman, A., (2015). Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(22), 9449-9461.
- Duman, Y. A., & Kaya, E., (2013). Three-phase partitioning as a rapid and easy method for the purification and recovery of catalase from sweet potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(5), 1119-1126.
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B., (2014). Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. In *Methods in enzymology*, (Vol. 541, pp. 105-114). Elsevier.
- Einbu, A., & Vårum, K. M., (2008). Characterization of chitin and its hydrolysis to GlcNAc and GlcN. *Biomacromolecules*, 9(7), 1870-1875.
- Ekinci, A. P., (2015). *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşundan lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu.
- 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.
- Faiz, O., Colak, A., Saglam, N., Çanakçı, S., & Belduz, A. O., (2007). Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4. *BMB Reports*, 40(4), 588-594.
- Fang, X.-W., Golden, B., Littrell, K., Shelton, V., Thiyagarajan, P., Pan, T., & Sosnick, T., (2001). The thermodynamic origin of the stability of a thermophilic ribozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4355-4360.
- Fang, Y.-M., Lin, D.-Q., & Yao, S.-J., (2018). Review on biomimetic affinity chromatography with short peptide ligands and its application to protein purification. *Journal of Chromatography A*, 1571, 1-15.
- Forsman, P., Tilsaia-Timisjrvi, A., & Alatossava, T., (1997). Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology*, 143(11), 3491-3500.

- Gaikaiwari, R. P., Wagh, S. A., & Kulkarni, B. D., (2012). Efficient lipase purification using reverse micellar extraction. *Bioresource technology*, 108, 224-230.
- Gallagher, S. R., & Wiley, E. A., (2010). *Current protocols essential laboratory techniques*. John Wiley & Sons.
- Garcia, E. S., Ruiz, C. A. S., Tilaye, T., Eppink, M. H., Wijffels, R. H., & van den Berg, C., (2018). Fractionation of proteins and carbohydrates from crude microalgae extracts using an ionic liquid based-aqueous two phase system. *Separation and Purification Technology*, 204, 56-65.
- Gaur, D., Jain, P. K., Sisodia, Y. S., & Bajapai, V., (2021). Estimation of Extracellular Lipolytic Enzyme Activity By Thermophilic Bacillus Sp. Isolated From Arid And Semi-Arid Region of Rajasthan, India. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 619-633.
- Gaur, R., Gupta, A., & Khare, S., (2008). Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*, 43(10), 1040-1046.
- Ghosh, P., Saxena, R., Gupta, R., Yadav, R., & Davidson, S., (1996). Microbial lipases: production and applications. *Science Progress (1933-)*, 119-157.
- Gross, R., Kalra, B., & Kumar, A., (2001). Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(6), 655-660.
- Gulmus, E. O., & Gormez, A., (2020). Identification and characterization of novel thermophilic bacteria from hot Springs, Erzurum, Turkey. *Current microbiology*, 77(6), 979-987.
- Guncheva, M., & Zhiryakova, D., (2011). Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 1-21.
- Gupta, C., Prakash, D., & Gupta, S., (2015). A biotechnological approach to microbial based perfumes and flavours. *J. Microbiol. Exp*, 3(1).
- 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.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V., (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013.
- Gül, Ü. D., (2013). Fungal Lipazlar ve Endüstride Kullanım Alanları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 13(1), 1-8.
- Gündoğdu, S., & Ayşe, U., Bitkisel Lipaz Kaynakları ve Kullanım Alanları. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 35-44.
- Haki, G., & Rakshit, S., (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
- Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Antibodies* Cold Spring Harbour Publications. In: USA.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A., (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and microbial technology*, 39(2), 235-251.
- Hatti-Kaul, R., (2001). Aqueous two-phase systems. *Molecular biotechnology*, 19(3), 269-277.

- Hatzinikolaou, D. G., Macris, J. B., Christakopoulos, P., Kekos, D., Kolisis, F. N., & Fountoukidis, G., (1996). Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters*, 18(5), 547-552.
- Hill, C., Thompson, L., & Kenney, A., (1989). Immunopurification. *Protein Purification Methods*. IRL Press, New York, 282-292.
- 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.
- Hung, T.-C., Giridhar, R., Chiou, S.-H., & Wu, W.-T., (2003). Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2), 69-78.
- Iizumi, T., Nakamura, K., & Fukase, T., (1990). Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(5), 1253-1258.
- Inan, K., (2011). İzmir ve Aydın illerindeki bazı kaplıca-lardan izole edilen termofilik bakteri izolatlarının moleküler taksonomisi ve D1021 izolatının glu-koz izomerazının karakterizasyonu. Doktora te-zi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jaeger, K.-E., & Eggert, T., (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 390-397.
- Jaeger, K.-E., & Reetz, M. T., (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16(9), 396-403.
- Jaeger, K., Dijkstra, B., & Reetz, M., (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 315-351.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H., (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34.
- Ji, X., Chen, G., Zhang, Q., Lin, L., & Wei, Y., (2015). Purification and characterization of an extracellular cold-adapted alkaline lipase produced by psychrotrophic bacterium *Yersinia enterocolitica* strain KM1. *Journal of basic microbiology*, 55(6), 718-728.
- Jungbauer, A., & Hahn, R., (2009). Ion-exchange chromatography. *Methods in enzymology*, 463, 349-371.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., & Derekova, A., (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(5-6), 307-313.
- Kanwar, L., & Goswami, P., (2002). Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 727-735.
- Kanwar, S., Ghazi, I., Chimni, S., Joshi, G., Rao, G., Kaushal, R., Gupta, R., & Punj, V., (2006). Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein expression and purification*, 46(2), 421-428.
- Kapoor, M., & Gupta, M. N., (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.

- Katı, H., Karaca, B., & Gülşen, Ş. H., (2016). Identification of *Bacillus* species isolated from soil and investigation of their biological properties. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 281-290.
- Kaur, H., & Shorie, M., (2019). Nanomaterial based aptasensors for clinical and environmental diagnostic applications. *Nanoscale Advances*, 1(6), 2123-2138.
- 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.
- Kim, H.-K., Sung, M.-H., Kim, H.-M., & Oh, T.-K., (1994). Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(5), 961-962.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçiöğlü, U., & Dostbil, N., (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Kiss, E., Szamos, J., Tamas, B., & Borbas, R., (1998). Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water/tert-butanol systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 142(2-3), 295-302.
- Koç, M., *Geobacillus* türlerinde termostabil lipaz üretimi Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Konkit, M., Choi, W. J., & Kim, W., (2016). Aldehyde dehydrogenase activity in *Lactococcus chungangensis*: Application in cream cheese to reduce aldehyde in alcohol metabolism. *Journal of dairy science*, 99(3), 1755-1761.
- Kuepethkaew, S., Sangkharak, K., Benjakul, S., & Klomklao, S., (2017). Use of TPP and ATPS for partitioning and recovery of lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas. *Journal of food science and technology*, 54(12), 3880-3891.
- Kulkarni, N., & Gadre, R., (2002). Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 344-348.
- Kumar, M., Mukherjee, J., Sinha, M., Kaur, P., Sharma, S., Gupta, M. N., & Singh, T. P., (2015). Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP): structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Sustainable Chemical Processes*, 3(1), 1-10.
- 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.
- Kumar, S., & Nussinov, R., (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(9), 1216-1233.
- Labuschagne, R. B., van Tonder, A., & Litthauer, D., (1997). *Flavobacterium odoratum* lipase: Isolation and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(1), 52-58.
- Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.

- Lailaja, V., & Chandrasekaran, M., (2013). Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1349-1360.
- Lawson, D. M., Brzozowski, A. M., Rety, S., Verma, C., & Dodson, G. G., (1994). Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(4), 543-550.
- Lee, D.-W., Koh, Y.-S., Kim, K.-J., Kim, B.-C., Choi, H.-J., Kim, D.-S., Suhartono, M. T., & Pyun, Y.-R., (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 179(2), 393-400.
- Lee, J. C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A., & Adams, J. L., (1999). p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors—mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacology & therapeutics*, 82(2-3), 389-397.
- Li, H., & Zhang, X., (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein expression and purification*, 42(1), 153-159.
- Li, J., & Liu, X., (2017). Identification and characterization of a novel thermophilic, organic solvent stable lipase of *Bacillus* from a hot spring. *Lipids*, 52(7), 619-627.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X., (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), e201209017.
- Litthauer, D., Ginster, A., & van Eeden Skein, E., (2002). *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2), 209-215.
- Liu, Y., Shao, X., Kong, D., Li, G., & Li, Q., (2021). Immobilization of thermophilic lipase in inorganic hybrid nanoflower through biomimetic mineralization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197, 111450.
- Liu, Z., Chi, Z., Wang, L., & Li, J., (2008). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2. 3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical engineering journal*, 40(3), 445-451.
- Lopes, M. d. F. S., Leitão, A. L., Regalla, M., Marques, J. F., Carrondo, M. J. T., & Crespo, M. T. B., (2002). Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *International journal of food microbiology*, 76(1-2), 107-115.
- López-García, P., (1999). DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life? *Journal of molecular evolution*, 49(4), 439-452.
- Luque, R., Lovett, J. C., Datta, B., Clancy, J., Campelo, J. M., & Romero, A. A., (2010). Biodiesel as feasible petrol fuel replacement: a multidisciplinary overview. *Energy & Environmental Science*, 3(11), 1706-1721.
- Macario, A. J., & de Macario, E. C., (2002). Sick chaperones and ageing: a perspective. *Ageing research reviews*, 1(2), 295-311.
- Malekabi, S., Badoei-Dalfard, A., & Karami, Z., (2018). Biochemical characterization of a novel cold-active, halophilic and organic solvent-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production. *International journal of biological macromolecules*, 109, 389-398.
- 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.

- Masomian, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., & Basri, M., (2016). Analysis of comparative sequence and genomic data to verify phylogenetic relationship and explore a new subfamily of bacterial lipases. *PLoS one*, 11(3), e0149851.
- Mehta, A., Kumar, R., & Gupta, R., (2012). Isolation of lipase producing thermophilic bacteria: Optimization of production and reaction conditions for lipase from *Geobacillus* sp. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 59(4), 435-450.
- Mo, Q., Liu, A., Guo, H., Zhang, Y., & Li, M., (2016). A novel thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* YB103: screening, purification and characterization. *Extremophiles*, 20(2), 157-165.
- 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.
- Muthazhagan, K., & Thangaraj, M., (2014). Production and partial characterization of lipase by *Bacillus* sp. isolated from vellar estuary sediment. *IJSIT*, 3, 639-653.
- Nadeem, H., Rashid, M. H., Siddique, M. H., Azeem, F., Muzammil, S., Javed, M. R., Ali, M. A., Rasul, I., & Riaz, M., (2015). Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physicochemical properties. *Process biochemistry*, 50(8), 1202-1210.
- Nadeem, U., Muhammad, D., Muhammad, S., Özkan, A., Sami, U., & Muhammad, Q., (2015). Screening identification and characterization of lipase producing soil bacteria from Upper Dir and Mardan Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 6(2), 49-55.
- Nagarajan, S., (2012). New tools for exploring “old friends—microbial lipases”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(5), 1163-1196.
- Odera, M., Takeuchi, K., & Toh-e, A., (1986). Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation Technology*, 64(5), 363-371.
- Oh, B.-C., Kim, H.-K., Lee, J.-K., Kang, S.-C., & Oh, T.-K., (1999). *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiology Letters*, 179(2), 385-392.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., & Soccol, V. T., (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry*, 29(2), 119-131.
- Pandey, N., Dhakar, K., Jain, R., & Pandey, A., (2016). Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. *Mycosphere*, 7(10), 1533-1545.
- Parra, L. P., Espina, G., Devia, J., Salazar, O., Andrews, B., & Asenjo, J. A., (2015). Identification of lipase encoding genes from Antarctic seawater bacteria using degenerate primers: expression of a cold-active lipase with high specific activity. *Enzyme and microbial technology*, 68, 56-61.
- Pask-Hughes, R., & Williams, R. A. D., (1977). Yellow-pigmented strains of *Thermus* spp. from Icelandic hot springs. *Microbiology*, 102(2), 375-383.

- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G., & Laurinavichius, K., (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2109-2117.
- Pike, R., & Dennison, C., (1989). Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. *Biotechnology and bioengineering*, 33(2), 221-228.
- Ramakrishnan, V., Goveas, L. C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P. M., & Narayan, B., (2016). Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 6, 19-27.
- Ramani, K., Chockalingam, E., & Sekaran, G., (2010). Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 531-535.
- Ramani, K., Kennedy, L. J., Ramakrishnan, M., & Sekaran, G., (2010). Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochemistry*, 45(10), 1683-1691.
- Ramos-Sánchez, L. B., Cujilema-Quitio, M. C., Julian-Ricardo, M. C., Cordova, J., & Fickers, P., (2015). Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(2), 1.
- Rathi, P., Saxena, R., & Gupta, R., (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37(2), 187-192.
- Raut, S., Sen, S. K., Kabir, N. A., Satpathy, S., & Raut, S., (2012). Isolation and characterization of protease producing bacteria from upper respiratory tract of wild chicken. *Bioinformation*, 8(7), 326.
- Ray, A., (2012). Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and technology*, 2(2), 33-37.
- Ribeiro, B. D., Castro, A. M. d., Coelho, M. A. Z., & Freire, D. M. G., (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, 2011.
- Roy, I., & Gupta, M. N., (2002). Three-phase affinity partitioning of proteins. *Analytical Biochemistry*, 300(1), 11-14.
- Roy, M., Kumar, R., Ramteke, A., & Sit, N., (2021). Identification of lipase producing fungus isolated from dairy waste contaminated soil and optimization of culture conditions for lipase production by the isolated fungus. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 698-704.
- Rúa, M. L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A., & Schmid, R. D., (1997). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of biotechnology*, 56(2), 89-102.
- Sahoo, R. K., Das, A., Gaur, M., Sahu, A., Sahoo, S., Dey, S., Rahman, P. K., & Subudhi, E., (2020). Parameter optimization for thermostable lipase production and performance evaluation as prospective detergent additive. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 50(6), 578-584.

- Sandoval, G., Rivera, I., Barrera-Rivera, K. A., & Martínez-Richa, A. (2010). Biopolymer synthesis catalyzed by tailored lipases. *Macromolecular symposia*,
- Sangeetha, R., Geetha, A., & Arulpandi, I., (2010). Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 179-185.
- Saun, N. K., Narwal, S. K., Dogra, P., Chauhan, G. S., & Gupta, R., (2014). Comparative study of free and immobilized lipase from *Bacillus aerius* and its application in synthesis of ethyl ferulate. *Journal of oleo science*, 63(9), 911-919.
- Savitha, J., Srividya, S., Jagat, R., Payal, P., Priyanki, S., Rashmi, G., Roshini, K., & Shantala, Y., (2007). Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *African journal of biotechnology*, 6(5), 564-568.
- Saxena, L., Iyer, B. K., & Ananthanarayan, L., (2007). Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor. *Process biochemistry*, 42(3), 491-495.
- Saxena, R., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S., (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of microbiological methods*, 52(1), 1-18.
- Schmid, R. D., & Verger, R., (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(12), 1608-1633.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., & Schmid, R. D., (1994). Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1214(1), 43-53.
- Scopes, R. K., (1993). *Protein purification: principles and practice*. Springer Science & Business Media.
- Sevinç, N., (2010). Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. suşlarından proteaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. [Uludağ Üniversitesi].
- Shahinyan, G., Margaryan, A., Panosyan, H., & Trchounian, A., (2017). Identification and sequence analyses of novel lipase encoding novel thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. *BMC microbiology*, 17(1), 1-11.
- Sharma, A., Pandey, A., Shouche, Y. S., Kumar, B., & Kulkarni, G., (2009). Characterization and identification of *Geobacillus* spp. isolated from Soldhar hot spring site of Garhwal Himalaya, India. *Journal of basic microbiology*, 49(2), 187-194.
- Sharma, P. K., Singh, K., Singh, R., Capalash, N., Ali, A., Mohammad, O., & Kaur, J., (2012). Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. *Molecular biology reports*, 39(3), 2795-2804.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C., (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662.
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M., (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2), 486-520.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K., (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 1-15.
- Skouridou, V., Stamatis, H., & Kolisis, F. N., (2003). A study on the process of lipase-catalyzed synthesis of  $\alpha$ -pinene oxide in organic solvents. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(6), 285-290.

- 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.
- 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*,
- Suddin, S., Mokosuli, Y. S., Marcelina, W., Orbanus, N., & Ardi, K. (2019). Molecular Barcoding Based 16S rRNA Gene of Thermophilic Bacteria from Vulcanic Sites, Linow Lake, Tomohon. *Materials Science Forum*,
- Taipa, M., Aires-Barros, M., & Cabral, J., (1992). Purification of lipases. *Journal of biotechnology*, 26(2-3), 111-142.
- Tarakçıoğlu, S., (2016). Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus thermoamylovorans* ST10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Thongekkaew, J., & Boonchird, C., (2007). Molecular cloning and functional expression of a novel extracellular lipase from the thermotolerant yeast *Candida thermophila*. *FEMS yeast research*, 7(2), 232-243.
- Tipton, K., & McDonald, A. (2018). A brief guide to enzyme nomenclature and classification. In: IUBMB.
- Todar, K. (2015). Textbook of bacteriology. Madison, Wisconsin, [http://www.textbookofbacteriology.net/kt\\_contact.html](http://www.textbookofbacteriology.net/kt_contact.html).
- Tonova, K., & Lazarova, Z., (2008). Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion. *Biotechnology advances*, 26(6), 516-532.
- Tripathi, R., Singh, J., kumar Bharti, R., & Thakur, I. S., (2014). Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia*, 54, 518-529.
- Turner, A., Karube, I., & Wilson, G. S., (1987). *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford university press.
- Unni, K. N., Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., & Benjamin, S., (2016). *Pseudomonas aeruginosa* strain BUP2, a novel bacterium inhabiting the rumen of Malabari goat, produces an efficient lipase. *Biologia*, 71(4), 378-387.
- V Pérez, S., F Olea, A., & Pilar Gárate, M., (2014). Formation and morphology of reverse micelles formed by nonionic surfactants in “dry” organic solvents. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(6), 774-780.
- Vasudevan, P. T., (2004). Purification of lipase. *Lipases and phospholipases in drug development: from biochemistry to molecular pharmacology*. Wiley on-line library, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG.
- Venugopal, M., & Saramma, A., (2007). An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. *Indian journal of microbiology*, 47(4), 298.
- Verma, M., & Kanwar, S., (2008). Properties and application of Poly (MAc-co-DMA-cl-MBA<sub>m</sub>) hydrogel immobilized *Bacillus cereus* MTCC 8372 lipase for synthesis of geranyl acetate. *J. Appl. Polym. Sci*, 110, 837-846.

- Vicente, G., Coteron, A., Martinez, M., & Aracil, J., (1998). Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production. *Industrial crops and products*, 8(1), 29-35.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B., (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Wang, B., Wang, A., Cao, Z., & Zhu, G., (2016). Characterization of a novel highly thermostable esterase from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans* TK64. *Biotechnology and applied biochemistry*, 63(3), 334-343.
- Whitford, D., (2013). *Proteins: structure and function*. John Wiley & Sons.
- Winkler, U. K., & Stuckmann, M., (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 138(3), 663-670.
- Wiseman, A., (1975). *Handbook of enzyme biotechnology*. E. Horwood.
- Woese, C. R., & Wolfe, R. S., (1985). *The bacteria: a treatise on structure and function*.
- Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H., & Yan, Y., (2016). A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126, 76-89.
- Yayalar, Ö. İ., (2019). *Beauveria Bassiana İzolatlarından Kitinaz Enzimi Eldesi ve Bazı Zararlı Böceklere Etkisinin Araştırılması*.
- Yele, V. U., & Desai, K., (2015). A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri*; optimization of media and production conditions using statistical methods. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(2), 855-869.
- Yılmaz, G. (2019). Antifungal ajan adayı olarak bakteriyal kitinaz üretimi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, 76, Tokat.
- Yılmaz, M., (2006). Bazı *Bacillus* Türlerinin Ekzopolisakkarid (Eps) Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bil. Ens., Niğde Üniversitesi, Niğde, Türkiye.
- Zaliha, R. N., Rahman, R. A., Baharum, S. N., Salleh, A. B., & Basri, M., (2006). S5 lipase: an organic solvent tolerant enzyme. *Journal of Microbiology*, 44(6), 583-590.
- Zhao, J., Ma, M., Zeng, Z., Yu, P., Gong, D., & Deng, S., (2021). Production, purification and biochemical characterisation of a novel lipase from a newly identified lipolytic bacterium *Staphylococcus caprae* NCU S6. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 248-256.
- Zhao, Z., Lan, D., Tan, X., Hollmann, F., Bornscheuer, U. T., Yang, B., & Wang, Y., (2019). How to break the Janus effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in biocatalysis? Understanding inactivation mechanisms to generate more robust enzymes. *ACS Catalysis*, 9(4), 2916-2921.
- Zheng, J., Xu, L., Liu, Y., Zhang, X., & Yan, Y., (2012). Lipase-coated K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> microcrystals: preparation, characterization, and application in biodiesel production using various oil feedstocks. *Bioresource technology*, 110, 224-231.
- Zhou, J., Chen, W., Jia, Z., Huang, G., Hong, Y., Tao, J., & Luo, X., (2012). Purification and characterization of lipase produced by *Aspergillus oryzae* CJLU-31 isolated from waste cooking oily soil. *American journal of food technology*, 7(10), 596-608.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
<b>Adı Soyadı:</b>	Fatma ALTINOK
<b>Doğum tarihi:</b>	
<b>Doğum Yeri:</b>	
<b>Medeni Hali:</b>	
<b>Uyruğu:</b>	
<b>Adres:</b>	
<b>Tel:</b>	
<b>Faks:</b>	
<b>E-mail:</b>	
Eğitim	
<b>Lise:</b>	
<b>Lisans:</b>	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
<b>Yüksek lisans:</b>	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı
<b>Doktora:</b>	-
Yabancı Dil Bilgisi	
<b>İngilizce:</b>	İyi
<b>Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar</b>	
	-