



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



İLİMLİ HALOFİL *BACILLUS* TÜRLERİNDEN LİPAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU

BURCU SİNEM ŞİMŞEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2017



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



İLİMLİ HALOFİL *BACILLUS* TÜRLERİNDEN LİPAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU

BURCU SİNEM ŞİMŞEK
(520613003)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Burcu Sinem ŞİMŞEK'in "**İlimli Halofil *Bacillus* Türlerinden Lipaz Enziminin İzolasyonu**" başlıklı tez çalışması, 19.07.2017 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Ayşe OGAN (Danışman)

Marmara Ün. Fen Edebiyat Fak.(İMZA).....

Prof.Dr. Meral BİRBİR

Marmara Ün. Fen Edebiyat Fak.(İMZA).....

Prof. Dr. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

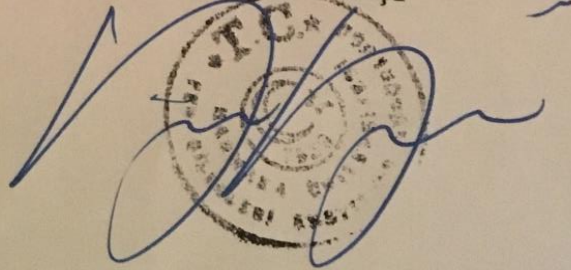
Yıldız Teknik Ün.Fen-Ed. Fak(İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24.07.2017 tarih ve 2017/07/02 sayılı kararı ile Burcu Sinem ŞİMŞEK Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur YAŞI



ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez süresince büyük desteğini gördüğüm tez danışmanım sevgili hocam Sayın Prof. Dr.

Ayşe OGAN'a,

Tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalındaki hocalarım Sayın Doç. Dr. Özkan DANIŞ'a, Doç. Dr. Serap DEMİR'e ve Yrd. Doç. Dr. Başak YÜCE DURSUN'a,

Mikrobiyoloji laboratuvarının imkanlarını bana açan ve bilgilerinden yararlandığım Biyoloji bölümünden Sayın Prof. Dr. Meral BİRBİR'e,

Bakterilerle ilgili bilgi ve becerilerini benimle sabırla paylaşan Biyoloji bölümü Araştırma Görevlisi Dr. Pınar ÇAĞLAYAN'a

Maddi ve manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen annem Gül ŞİMŞEK ve ablam Şenay ŞİMŞEK'e, yardıma ihtiyacımın olduğu her anda bana destek olan sevgili eşim Dinçer HOCAOĞLU'na

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım..

Burcu Sinem ŞİMŞEK

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
SEMBOLLER.....	viii
KISALTMALAR.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç.....	1
1.2 Lipaz Enziminin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	3
1.3 Lipazların Katalizledikleri Reaksiyonlar.....	4
1.3.1 Lipazların Kaynakları.....	5
1.3.2 Bakteriyel Lipazların Fermentasyon Şartları.....	6
1.4 Ekstremofil Canlılar.....	7
1.4.1 Ekstremofil Nedir?.....	7
1.4.2 Ekstremofillerden Gelen Enzimler: Ekstremozimler.....	7
1.4.3 Ekstremofil Canlılar ve Yaşadıkları Ortamları.....	9
1.5 Halofiller.....	11
1.5.1 Halofillerden Enzim Eldesi.....	12
1.6 <i>Bacillus</i> Türleri.....	13
1.7 Enzim Saflaştırma.....	15
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
2.1 Çalışma Araçları.....	22
2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	23
2.3 Yapılan Çalışmalar.....	23
2.3.1 Besiyerlerinin Hazırlanması ve Bakterilerin Çoğaltılması.....	23
2.3.2 Lipaz Üretimi.....	23

2.3.3 Lipaz Aktivite Tayini.....	24
2.4 Lipaz'ın Saflaştırılması.....	24
2.5 Lipazın Karakterizasyonu.....	26
2.5.1 Enzime pH'ın Etkisi ve Enzimin Termal Kararlılığı.....	26
2.5.2 Lipaz Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	26
2.5.3 Metal İyonlarının Deterjanların ve Organik Çözücülerin Enzim Üzerine Etkisi.....	26
3. BULGULAR	27
3.1 Lipaz Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	27
3.2 Lipaz Üretimine Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	27
3.3 Lipazın Saflaştırılması, Molekül Ağırlığının Tayini ve Aktivite Boyanması.....	28
3.4 pH ve Sıcaklığın Saflaştırılmış Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	30
3.4.1 Lipaz Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi.....	31
3.4.2 Metal İyonlarının, Deterjanların ve Organik Çözücülerin Enzim Üzerine Etkisi.....	32
4. TARTIŞMA-SONUÇ.....	34
5. KAYNAKLAR.....	40
6. ÖZGEÇMİŞ.....	49

ÖZET

Ilımlı Halofil *Bacillus* Türlerinden Lipaz Enziminin İzolasyonu

Trigliseridlerin diaçil, monoaçil gliserollere ve yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açilhidrolaz) endüstriyel enzim pazarında en büyük paya sahiptirler. Hidrolitik aktivitelerinin yanı sıra lipazlar aynı zamanda esterifikasyon ve transesterifikasyon gibi tersinir reaksiyonları da katalizlerler. Endüstride kullanılan lipazlar doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilirler. Lipaz üreticisi bakteriler arasında *Bacillus* cinsleri çok yaygındır ve bu cinsler lipaz üretimi için en bilinen kaynaklardır. Hızlı gelişmeleri ve toksik yan ürünlerinin az olması da bu mikroorganizmaların avantajlarıdır. *Bacillus* cinsinin ılımlı halofil üyeleri %3-15 NaCl (w/v) içeren besiyerinde optimum olarak gelişebilmektedir. Lipaz üretimi için pek çok değişik ortamdan izole edilen oldukça fazla sayıda *Bacillus* türü taranmasına rağmen yüksek veya düşük pH ve sıcaklıkta daha iyi lipolitik aktivite gösteren enzimlerin elde edilmesi için çok daha fazla sayıda suşun taranması gerekmektedir. Çalışmamızda kullandığımız *Bacillus siamensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis* ve *Bacillus licheniformis* test suşları, Biyoloji Bölümümüzde, daha önceden tuzlanmış küçükbaş hayvan derilerinden izole edilmiş ve moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Biyoteknolojik önemi olabilecek bu suşların lipaz üretim kapasitelerini belirlemek için substrat olarak zeytinyağı içeren besiyeri kullanılmış ve uygun inkübasyon süresini saptamak için suşlar bu besiyerinde 24, 48, 72, 96 ve 120 saat inkübe edilmişlerdir. *Bacillus safensis*'in en fazla lipaz üreten suş ve en uygun inkübasyon süresinin de 96 saat olduğu bulunmuştur. Tüm izolatların lipaz aktiviteleri kantitatif yöntemle ölçülmüştür. Tüm izolatların optimum karbon kaynağını saptamak ve lipaz üretim maliyetini düşürmek için, büyüme şartları ile inkübasyon süresini optimize ettikten sonra, düşük maliyetlerinden ve yüksek yağ içeriklerinden dolayı endüstriyel bitki yağları olan % 1 (a/h); fındık yağı (FY), hint yağı (HY), ayçiçek yağı (AY), mısırözü yağı (MY), zeytin yağı (ZY) gibi çeşitli bitkisel yağlar ve zeytin yağı fabrikası üretim atıkları olan % 1 (a/h); zeytinyağı üretimi üstü yağlı suyu (ZÜY) ve gliserol (G) substrat olarak kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, tüm çalıştığımız *Bacillus* suşları lipaz üretmektedir. Substratlar arasında en etkin substratın fındık yağı ve en iyi lipaz üreten suşun da *Bacillus safensis* suşu olduğu bulunmuştur. Bu suşun fındık yağı substrat olarak kullanıldığında ürettiği enzim, amonyum sülfat

doğunluğunda çöktürölmüş ve anyon değıştirici DEAE-sefaroze kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan lipazın moleköler kütesinin yaklaşık 59 kDa olduğu ve pH 8 ve 30-40°C de optimal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Enzim çalışma çözeltisine %1 NaCl eklenmesi ile enzim aktivitesinin oldukça fazla arttığı gözlenmiştir. Metal iyonları arasında 5 mM Mg²⁺ iyonlarının aktiviteyi %120 arttırdığı, Zn²⁺ iyonlarının düşürdüğü, yüzey aktif maddeler arasında PEG ve organik çözücüler arasında DMSO lipaz enzimi aktivitesi üzerinde çok önemli bir aktivite kaybına sebep olmamışlardır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, Lipaz, Saflaştırma, Karakterizasyon

ABSTRACT

Isolation of Lipase Enzyme from Moderately Halophile *Bacillus* Species

Lipases (EC.3.1.1.3, triacylglycerol acylhydrolases) which catalyze the hydrolysis of triglycerides to diacylglycerides, monoglycerides and fatty acids have the greatest share in the industrial enzyme market. In addition to their hydrolytic activity, lipases also catalyze reverse reactions such as esterification and transesterification reactions. Industrial lipases have been produced by native or genetically engineered organisms. Among the lipase producing bacteria, *Bacillus* species are diverse and the most popular source of lipases. Rapid growth and low level of toxic by-products are the other advantages of these microorganisms. Moderately halophilic members of the genus *Bacillus* can grow optimally in media containing 3–15% NaCl. Although numerous *Bacillus* species from many different environments have been screened for lipase production, more screening studies are needed for obtaining enzymes with better lipolytic activity and stability at high or low pH, salt concentration and temperature. This work screened 5 *Bacillus* strains; *Bacillus siamensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus safensis* and *Bacillus pumilus* which were previously isolated from salted sheep skins and molecularly characterized in our Biology Department for their potential to produce lipase. These strains were screened for their lipase production capacities using olive oil as substrate. They were incubated 24, 48, 72, 96 and 120 h to evaluate the optimum incubation period. *Bacillus safensis* was found to be best lipase producer strain and 96h was the optimum incubation time. The lipase activities of all isolates were quantitatively measured. After optimizing the growth conditions and incubation time, industrial plant oils; 1% (w/v); olive oil (OO), 1% corn oil (CO), 1% sunflower oil (SO), hazelnut oil (HO), castor oil (CasO) and wastes of an olive oil processing company; 1%; olive oil waste water (OWW) and glycerol (GP) were used as substrates due to low cost and high lipid contents. The lipase activities increased exponentially consistent with time, 96 h was the optimal incubation time. According to our results; the strains were all good lipase manufacturers but, *Bacillus safensis* displayed the highest lipase activity when hazel nut oil was used as substrate. When nut oil was used substrate, lipase from *Bacillus safensis* was further purified to homogeneity by ammonium sulphate precipitation and DEAE–Sephadex column chromatography. Its molecular weight was 59 kDa on SDS–PAGE. The enzyme showed maximum activity at pH 8.0 and was stable 30°C–40°C. Activity was considerably enhanced with

the addition of NaCl %1 and 5 mM Mg^{2+} but Zn^{+2} ions substantially decreased the activity. Among the surfactants; addition of PEG and organic solvents; DMSO did not decrease the lipase activity to a great extent.

Keywords: *Bacillus*, Lipase, Purification, Characterization



SEMBOLLER

%	: Yüzde
°C	: Santigrad derece
g	: Gram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
dk	: Dakika
A280	: 280 nm'deki absorbans
A405	: 405 nm'deki absorbans
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid jel elektroforezi
DEAE sepharose	: DEAE Sepharose
PK	: Pozitif kontrol
NK	: Negatif kontrol
pNPB	: p-Nitrofenil bütirat
dk	: Dakika
w/v	: Ağırlık/hacim
v/v	: Hacimce yüzde
w/w	: Ağırlıkça Yüzde
g/cm³	: Gram/santimetreküp
µm	: Mikrometre
M	: Molarite
L	: Litre

g

:Gram

rpm

:Dakikadaki devir sayısı



KISALTMALAR

UV	: Ultraviyole
ZÜY	: Zeytinyağı üretimi üstü yağlı suyu
AY	: Ayçiçek Yağı
ZY	: Zeytin Yağı
MY	: Mısır Yağı
HY	: Hint Yağı
G	: Gliserin
FY	: Fındık Yağı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Ekstremozimler ve Kullanım Alanları.....	8
Şekil 2. İzolatların İnkübasyon Süresine Göre Bağlı Aktiviteleri.....	27
Şekil 3. Karbon Kaynaklarına Göre İzolatlarda Lipaz Üretimi.....	28
Şekil 4. <i>B.safensis</i> 'ten saflaştırılan lipazın SDS-PAGE analizi.....	29
Şekil 5. <i>B.safensis</i> lipazının doğal-PAGE analizi ve lipazın aktivite boyaması.....	30
Şekil 6. pH (A) ve sıcaklığın (B) lipaz aktivitesi üzerine etkisi.	31
Şekil 7. Saflaştırılmış enzim üzerine % 0-15 NaCl konsantrasyonunun etkisi.....	31



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. En çok kullanılan iyon değişim reçineleri.....	19
Tablo 2. <i>Bacillus safensis</i> 'ten saflaştırılan lipazın saflaştırma basamakları.....	29
Tablo 3. Metal iyonlarının ve EDTA'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	32
Tablo 4. Yüzey aktif maddelerin ve organik çözücülerin saflaştırılmış lipaz aktivitesine etkisi.....	33



1.GİRİŞ

1.1. Amaç

Lipazların katalizlediği reaksiyonlar, metabolik reaksiyonlara benzediği için kimyasal reaksiyonlara göre daha çevre dostudur denilebilir. Düşük aktivasyon enerjilerinden dolayı lipazların katalizlediği reaksiyonlar nötral pH ve daha düşük sıcaklıkta gerçekleşir, substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir ve enerji ihtiyacı düşüktür. Bu yüksek aktivite, substrat yağ-su ara yüzeyinde en üst seviyeye yükselmektedir. Bu nedenle en yüksek aktiviteler, yüksek yüzey alanına ulaşılan emülsiyon sistemlerinde gözlenmektedir (Hult ve Berglund, 2007, Kapoor ve Gupta, 2012).

Endüstride kullanılan lipazlar doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalardan; örneğin bakteriler, mantarlar ve protozoa gibi mikroorganizmalardan elde edilirler (Sharma and Kanwar, 2014). Biyoteknolojik araştırmalarda çok işlevsel olmaları, kimyasal süreçlere spesifik yollar kazandırmaları, yan reaksiyonları engellemeleri ve reaksiyondan çıkan maddeleri ayırması ile ilgili sorunları kolaylaştırmaları gibi birden fazla özellikleri sebebiyle lipazlara gün geçtikçe yoğun bir ilgi bulunmaktadır (Hasan ve ark., 2006). Tek hücreli maya olan *Candida rugosa* genel olarak lipaz üretimi için tercih edilmektedir. *Candida rugosa* lipazı (CRL) substrat spesifikliğinin yüksek olması nedeniyle, lipazların kullanıldığı alanların çoğunda yer alır (Benjamin ve Pandey, 1998). Organik çözücüler, yüksek sıcaklıklar ve tuz, alkali veya asidik çözeltiler gibi ekstrem şartların kullanıldığı endüstrilerde bu şartlara dayanabilecek özelliklerde olan lipazların üretiminde *Candida rugosa* yeterli olmamaktadır. Ekstrem şartlara dayanıklı lipazları ekstremofilik mikroorganizmalar üretebilmektedir. *Bacteria* ve *Archaea* alemlerindeki bazı prokaryotik hücreler, aşırı tuzlu, asidik, bazik, aşırı soğuk veya sıcak, yüksek basınçlı, ağır metal, besinsiz, organik çözücü ve radyasyon içeren ortamlar gibi oldukça çetin şartlar altında yaşamlarını sürdürebilirler (Grant ve ark., 2001). Ekstremofillerden gelen enzimler günümüzde ticari açıdan çok önemli olmuştur (Casas-Godoy ve ark., 2012, Ratnaparkhe, ve Tiwari, 2011, Hasan ve ark., 2006). Örnek olarak, alkalik ve termo kararlı lipazları verebiliriz. Bu enzimler, alkalifilik türlerden üretilir ve enzimlerin önemli bir grubunu oluştururlar. En çok deterjan endüstrisinde kullanılırlar (Ray, 2012, Niyonzima ve More, 2014). Ekstremofilik enzimlerin sağlam yapısı göz önüne alındığında; yüksek sıcaklıkta, yüzey

aktif maddeler, ağartıcı ve kimyasal maddelerinin kullanıldığı sert operasyon şartlarına maruz kaldıkları halde aktivitelerini kaybetmezler (Hasan ve ark. 2006, Pandey ve ark., 1999). Ekstremofilik enzimler büyük ölçekli işlemlerden olan metal geri dönüşümünde, kömürde kükürt gidermede ve daha küçük ölçekli olarak da gıda ve içecek sanayinde, arıtma ve kağıt sanayinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Ratnaparkhe ve Tiwari, 2011, Van den Burg, 2003, Demirjian, 2001).

Yüksek miktarda tuz içeren ortamlarda yaşayabilen halofilik canlılar gezegenimizde oldukça yaygındır, tuzlu göller, diğer tuzlu su sistemleri ve tuzlu topraklarda yaşayabilirler. Halofiller, habitat olarak yüksek iyonik kompozisyonda yaşayabilen canlılardır (Oren 2002; Ventosa 2011). Farklı mikroorganizmaların tuzla ilişkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir ve bununla ilgili birkaç sınıflandırma önerilmiştir (Kushner ve Kamekura, 1988). Bu sınıflandırma, NaCl konsantrasyonuna göre mikroorganizmaların optimal büyümesini inceler. Bu nedenle halofiller, aşırı halofiller ve ılımlı halofiller olarak iki ana fizyolojik grup olarak yüksek tuzlu ortamlarda yaşayabilirler. %0.5-15 tuz konsantrasyonunda yaşayabilen ılımlı halofil bakterilerin çoğu türleri Gram-pozitif veya Gram-negatif aerob veya fakültatif anaeroblardır. Endospor oluşturabilen, aerobik, ılımlı halofiller, toprak veya sucul habitatlar gibi tuz içeren ya da yüksek oranda tuz içeren çevrelerden sıklıkla izole edilmiştir (Ventosa ve ark.,1998; Arahall ve Ventosa, 2002; Carrasco ve ark., 2007). Bu canlılar, lipazların da dahil olduğu pek çok hidrolitik enzimi sentezlerler. Bu mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar yüksek tuz konsantrasyonlarında çalışabildikleri gibi, yüksek sıcaklıklara da dayanıklıdır (40-75°C) ve geniş bir pH aralığında (5-10) aktiftirler. Ayrıca organik çözücü toleransı nedeniyle zorlu endüstriyel işlem koşulları için de uygundur ve endüstride oldukça ilgi görürler (Ventosa ve ark.,1989, Ratnaparkhe ve Tiwari, 2011; Kademi ve Leblanc, 2004, Jaeger ve Eggert, 2002). Özellikle *Bacillus* türleri, ticari olarak önemli alkali lipazların üreticisi olan mikroorganizmalardandır (Salihu ve Alam, 2015; Kim ve ark.,2002, Ghasemi ve ark., 2011, Lee ve ark., 2015, Sathishkumar ve ark., 2015). Hızlı büyümelerinin yanı sıra daha az toksik yan ürünler çıkarmaları da bu türlerin diğer bir avantajlarıdır (Sharma ve Kanwar, 2014 ve Kim ve ark., 2000). Çok sayıda *Bacillus* türü pek çok farklı ortamdan izole edilip, lipaz üretimi için taranmasına rağmen tuzlanmış koyun derilerinden izole edilmiş olan *Bacillus siamensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus safensis* ve *Bacillus pumilus* türleri ile

kantitatif olarak spektrofotometrik yöntemle lipaz üretimi saptanan bir çalışma yapılmamıştır. Kantitatif olarak lipaz enzimi ürettikleri saptanan izolatların enzim üretimini optimize etmek için zeytinyağı substratı kullanılarak uygun inkübasyon süresi saptanarak enzimin üretim şartları optimize edilmiştir. Enzim üretim verimliliğini ve maliyeti düşürme amaçlı olarak bitkisel yağlar, zeytinyağı fabrikası üretim atıkları olan zeytinyağı üretimi üstü yağlı suyu ve gliserol substrat gibi zirai atıklar substrat olarak kullanılmıştır. Üretim koşulları belirlendikten sonra en çok lipaz üreten suş belirlenmiş ve lipaz enzimi kromatografik yöntemlerle saflaştırılarak karakterize edilmiş; yüksek ve düşük pH, ısı, organik çözücüler, tuz kullanımı gibi endüstrinin istediği şartlar sağlanarak saflaştırılan enzimin dayanıklılığı saptanmış ve biyoteknolojik olarak kullanımı tartışılmıştır. Çalışmamız başarıya ulaştığı takdirde endüstriyel atıkların değerlendirilmesine yardımcı olacak ve lipaz enzimin karakterizasyonu ile elde edilecek bilgiler ileride yapmayı planladığımız lipaz geninin klonlaması ve gen transferi gibi çalışmalara kaynak olacaktır.

1.2 Lipaz Enziminin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Biyoteknolojik araştırmalarda kullanımlarının çok yönlü olması, kimyasal proseslere seçicilik vermeleri, yan reaksiyonları engellemeleri ve reaksiyonun ürünlerini ayırmakla ilgili sorunları basitleştirmeleri gibi önemli özellikleri sebebiyle lipazlara yoğun bir ilgi bulunmaktadır. Sanayide önemli pek çok tepkime, biyolojik ortamlarda daha ılımlı koşullarda ve kolay gerçekleşir. Yüksek sıcaklık ve basınç gibi yüksek enerjiye gereksinimi olan şartlara ihtiyaç duymadığından, enzimlerin sanayide kullanılması ekonomiktir ve pratiktir (Cheetham, 1995; Adrio ve Demain, 2014).

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açıl hidrolaz), bitkisel ve hayvansal yağların normal şartlarda tersinir hidrolizlerini kataliz eden enzimlerdir (Chauhan, 2002; Svendsen, 2000). Lipazlar; esterifikasyon, asidoliz, hidroliz, aminoliz, interesterifikasyon gibi çeşitli biyodönüşüm tepkimelerini oluşturan endüstriyel enzimlerdir (Amin ve ark., 2011) ve endüstriyel enzim pazarında proteazlar ve karbohidratazlardan sonra 3. gelirler (Adrio ve Demain, 2014). İlaç, pestisit, kozmetik, gıda, deterjan sanayi, biyosensörler ve biyodizel üretimi gibi birçok alanda lipaz enzimi kullanılmaktadır (Bassegoda ve ark., 2012). Yeni ve daha verimli lipaz kaynakları aranmakta ve bu konuda çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

1.3 Lipazların Katalizledikleri Reaksiyonlar

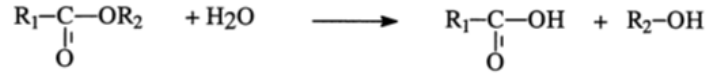
Lipazlar, ester ve lipitlerin hidrolizini, trans-esterleşme, esterleşme, ve tek kutuplu grup geçişi gibi tepkimeleri katalizlerler. Lipazlar; hidrolaz sınıfındadır ve yağ asidi esterlerinin hidrolizini ve sentezini katalizlerler. Katalizleme, suda çözünmeyen substrat tarafından oluşturulan ara yüzeyde meydana gelir ve enzim aktivitesinin yüksek olması için su ve yağ ara yüzeyi gereklidir (Eremeev ve Zaitse, 2016).

Lipazların en önemli özelliklerini aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

- Lipazlar enzimatik reaksiyonları yüksek substrat spesifikliğı, kararlılık, bölgesel ve enansiyo seçicilik ile katalizlerler.
- Bakteri, maya, mantar gibi mikroorganizmalar tarafından bolca üretilirler.
- Birçok lipazın kristal yapısı aydınlatılmıştır ve isteğe göre protein mühendisliğı ile dizaynları yapılabilir.
- Kofaktöre ihtiyaç duymazlar ve yan reaksiyonları kataliz edebilirler.
- Organik çözücüler içinde kararlı durumdadırlar.
- Substrat spesifikliğı oldukça geniştir.

Lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir (Villeneuve ve ark. 2000, Aouf ve ark., 214).

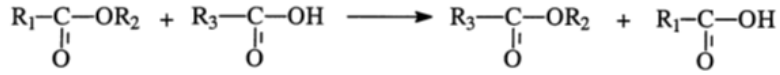
Ester hidroliz reaksiyonu



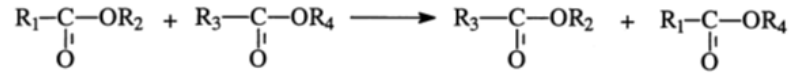
Ester sentez reaksiyonu



Asidoliz reaksiyonu



Trans-esterleşme reaksiyonu



Alkoliz reaksiyonu



Aminoliz reaksiyonu



1.3.1 Lipazların Kaynakları

Lipazlar doğada yaygın olarak bulunurlar ve pek çok bitki, hayvan ve mikroorganizma tarafından üretilirler. Mikrobiyal kaynaklı, özellikle bakteri ve mantarlardan elde edilen lipazlar, biyoteknolojik uygulamalarda oldukça fazla kullanılırlar. Büyük miktarlarda üretimleri kolay olduğu için, bakteriyel lipazlar ticari olarak önemlidir. Çok sayıda lipaz üreten bakteriler bulunmasına rağmen, bunların çok azı ticari olarak önemlidir. Bunlar arasında en önemlileri *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* ve *Pseudomonas*’tır. Özellikle *Pseudomonas* bakterisinden elde edilen lipazlar, pek çok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır (Jaeger ve ark., 1994; Pandey ve ark., 1999). Bu bakteriden elde edilen lipazlar “Lumafast” ve “Lipomax” ticari isimleri altında deterjan sanayinde, “Chiro CLEC-PC”, “Chirazyme L-1” ve “Amano P”, “P-30” ve “PS” organik sentezde büyük bir ticari başarı ile kullanılmaktadır.

1.3.2 Bakteriyel Lipazların Fermentasyon Şartları

Bakteriyel lipazlar genellikle ekstraselüler kaynaklıdır ve besin kaynakları ve sıcaklık, pH, azot ve karbon kaynakları, ortamda lipidlerin, çözünmüş oksijenin ve anorganik tuzların bulunması ve ajitasyon gibi çevre şartlarından oldukça çok etkilenirler (Gupta ve ark., 2004). Lipaz aktivitesinin ekspresyonu için en önemli faktör karbondur. Genellikle besiyerine triaçilgliserol, yağ asitleri, hidrolize edilebilen esterler, Tweenler, safra asitleri ve gliserol katılarak lipaz üretimi sağlanır (Ghosh ve ark, 1996). Yağların yanı sıra üretim için şekerler, şeker alkolü, polisakkaritler, peynir altı suyu, cas aminoasitler gibi karbon kaynakları da önemlidir. Uzun zincirli oleik, linoleik ve linolenik asitler gibi yağ asitlerinin de pek çok bakteride lipaz üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Karbon kaynaklarının yanı sıra, ortamdaki azotun çeşidi de lipaz üretimini etkilemektedir. Genellikle azot kaynağı olarak pepton ve maya ekstraktı tercih edilmektedir. Amonyum klorür ve diamonyum hidrojen fosfat gibi anorganik azot kaynaklarının da bazı mikroorganizmalarda etkin olduğu bildirilmiştir (Gilbert ve ark., 1991). İki değerlikli katyonların da mikroorganizmalarda enzim üretimini uyardığı veya inhibe ettiği bilinmektedir. Rathi ve ark., (2001), *Burkholderia* sp den elde edilen lipazın üretimini kalsiyum ve magnezyum tuzlarının uyardığını gözlemlemiştir. Sharma ve ark. (2002b) ise, *Bacillus* sp. RSJ1'in kalsiyum klorür varlığında lipaz üretimini arttırdığını bildirmişlerdir. Fakat genellikle diğer metal iyonları lipaz üretimini engellemektedir. Üretim ortamında bulunan çeşitli kimyasal bileşenlerin yanı sıra pH, sıcaklık, ajitasyon, havalandırma ve inkübasyon süresi gibi fizyolojik parametreler de lipaz üretimi üzerine çok etkilidir. Lipaz üretimi için büyüme ortamındaki başlangıç pH'ı önemlidir. Genellikle bakteriler üremek için ve lipaz üretmek için pH 7.0 civarını tercih ederler ve 7.0'nin üzerindeki pH'larda maksimum aktiviteye rastlanır (Sharma ve ark., 2002b). Çoğu zaman maksimum lipaz üretimi 72. ve 96. saatlerde gerçekleşir. Bakteriyel lipazlar genellikle lipid substratın karbon kaynağı olarak kullanıldığı ve herhangi bir kompleks azot kaynağının bulunduğu ortamlarda üretilirler. Metal iyonlarına gereksinim, organizmaya göre değişir fakat pH, sıcaklık, ajitasyon ve havalandırma gibi fiziksel parametreler, bakterinin gelişimini oldukça etkiler. Lipazlar, bakteriyel büyüme sırasında üretilirler ve pik üretim seviyesine geç logaritmik fazda ulaşılır. Lipazların üretimi için gerekli olan süre, birkaç saat ile birkaç gün arasında değişebilir.

1.4 Ekstremofil Canlılar

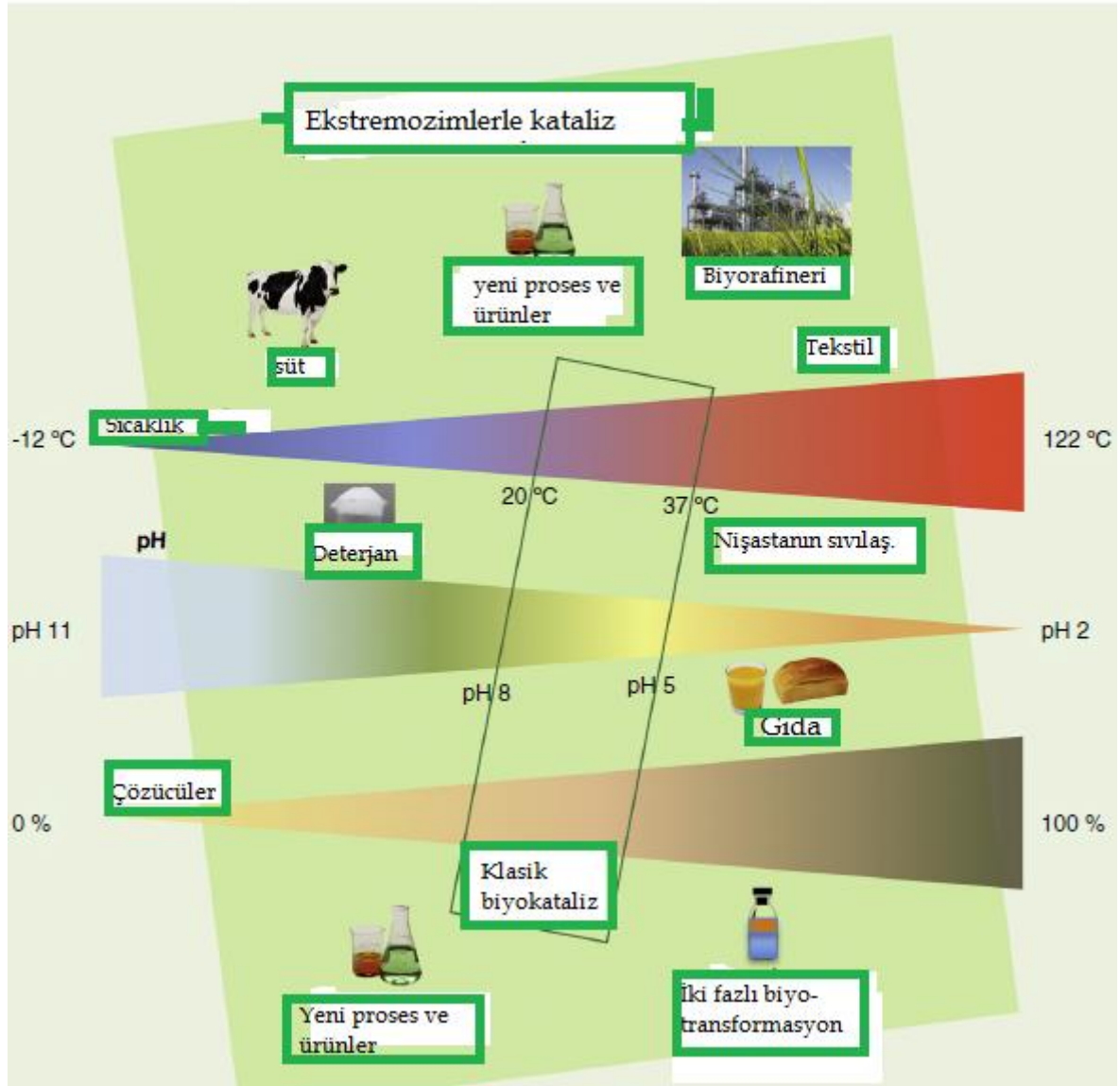
1.4.1 Ekstremofil Nedir?

Filogenetik ağaçta organizmaların *Bacteria*, *Archaea* ve *Eukarya* olmak üzere üç domaine ayrıldıkları, her bir domainin de kendi içinde birkaç gruba ayrıldığı görülmektedir. Bütün bakteriler, arkeler ve çoğu ökaryotlar mikroskobik organizmalardır (Moran ve ark., 2013). Ekstremofiller, aşırı uç çevresel koşullarda yaşamaya uyum sağlamış organizmalardır. *Bacteria* ve *Archaea* alemlerindeki prokaryotik hücreler, aşırı tuzlu, asidik, bazik, aşırı soğuk ve sıcak, basınçlı, ağır metal, besinsiz, organik çözücü ve radyasyon içeren ortamlar gibi oldukça çetin şartlar altında yaşamlarını sürdürebilirler (Grant ve ark., 2001). Mikroorganizmaların çeşitli grupları (bakteriler, algler, arkeler ve hatta mantarlar) yüksek tuzluluğa sahip ortamlarda yaşamaya adapte olmuşlardır (Ventosa, 2004). Ilımlı halofiller, *Bacteria* alemine, aşırı halofiller *Archaea* alemine aittirler (Russel, 1989). Literatürde, ekstremofilleri tanımlamak için ılımlı ve aşırı ekstremofil gibi alt tanımlar mevcuttur (Mueller ve ark., 2005).

1.4.2 Ekstremofillerden Gelen Enzimler: Ekstremozimler

Ekstremozimler, ekstremofilik mikroorganizmalardan elde edilen endüstriyel proseslerdeki proteinlere zarar veren zorlu koşullara dayanabilen enzimlerdir. Ekstremofiller, ekstremofilik mikroorganizmalardan elde edilirler ve endüstriyel uygulamalarda kimyasal katalizöre alternatif olarak sunulabilirler. Susuz ortamlarda, su/çözücü karışımlarında, yüksek basınçta, asidik ve alkali pH da 140°C'ye kadar çıkabilen veya suyun donma derecelerine yakın sıcaklıklarda katalizleme işlemini sürdürebilirler. Şekil 1 de ekstremozimlerin kullanım alanları gösterilmiştir. Isıya ve organik çözücülere dayanıklı ekstremozimler çözünmesi çok zor olan polimerleri sıvılaştırıp bozundurabilirken, soğukta aktif olanlar gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılırlar. Bu enzimlerin sağlam yapısı göz önüne alındığında, yüksek sıcaklıkta, yüzey aktif maddeler, ağartma ve kimyasal kenetleme maddelerinin kullanıldığı sert operasyon şartlarına maruz kalırlar. Dünya çapındaki enzim üretiminin yaklaşık %40'ı deterjan sanayiinde kullanılmaktadır. Bu kadar çok istenen özellikleri barındırmalarına rağmen günümüzde enzimler mantarlardan veya mezofilik bakterilerden elde

edilmektedirler. Günümüzde bu tür enzimlerin pazarda yerini alabilmesi için çalışmalar yoğun olarak sürmektedir (Elleuche ve ark., 2014).



Şekil1. Ekstremozimler ve kullanım alanları (Elleuche ve ark., 2014)

1.4.3 Ekstremofil Canlılar ve Yaşadıkları Ortamlar

Ekstrem şartlara dayanıklı olan enzimleri aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz.

Termo Kararlılık

Kimyasal reaksiyonlarda yüksek sıcaklıklar, reaktanlar daha çözünür ve daha fazla akışkan olacaklarından ve kolay karışıp hızlı reaksiyon verdiği için tercih edilir. Termo kararlı pek çok lipaz, proteaz, amilaz ve diğer enzimler gıda işlenmesinde, deterjan, kağıt, tekstil endüstrisinde, biyodizel üretiminde ve biyoteknolojik araştırmalarda kullanılmaktadır (Egorova ve Antranikian, 2005). Termokararlı enzimlerin *Thermotoga*, *Thermus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Bacillus*, ve *Sulfolobus* cinslerine ait türlerden elde edildiği bildirilmiştir (Hung ve ark., 2011). Derin deniz hidrotermal çıkışlarından elde edilen *Archaea* kaynaklı termokararlı enzimler, yüksek basınçlara, proteolitik yıkıma, organik çözücülere ve deterjanlara karşı oldukça dirençlidir.

Soğuğa Dayanıklılık

Soğuğa adapte olmuş enzimler düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi gerekli biyoproseslerde önemlidirler. Düşük sıcaklıklar metalik reaktörleri aşındırdığı için soğuğa dirençli enzimlerle çalışmak tercih edilir. Reaksiyonun durdurulması da sıcaklığı az yükseltmekle olur. Bu da ayrı bir avantaj sağlar. Tekstil endüstrisinde taşlama işlemi için kullanılan selüloz bu yöntemle kolaylıkla durdurulur ve aşırı aşınma engellenmiş olur. Moleküler biyolojide de bu enzimlerin kullanıldığı görmektediriz. Soğuğa adapte olmuş kuzey ve güney kutbu bakterilerinden elde edilen alkali fosfataz düşük sıcaklıkta oldukça aktif iken ısıyı hafif arttırmakla (55°C) aktivitesi biter ve DNA 'yı ortamdan uzaklaştırma zorunluluğu ortadan kalkar. Soğukta aktif olan lipolitik enzimler ve polisakkarolitik enzimlerin biyolojik temizlikte kullanımları yoğun şekilde araştırılmaktadır (Jeon ve ark., 2009; Zhang ve Zeng, 2006).

pH Değişimlerine Dayanıklılık

Genelde proteinler aşırı asidik veya bazik ortamlarda aktivitelerini kaybederler. Enzimler genellikle nötral pH civarında optimal aktivite gösterirler. Pek çok deniz mikroorganizması aşırı asidik veya bazik ortamda yaşayabilirler ve bunların enzimleri optimal aktivite gösterir. Deterjan endüstrisi, endüstriyel enzimlerin % 30'unu katkı maddesi olarak kullanır. Bunlar; termo kararlı alkalen proteazlar, lipazlar, amilazlar ve

sellülazlardır. Bu enzimler kontak lenslerin temizlenmesinde de yaygın olarak kullanılırlar. Asidofilik enzimler ise gıda ve ecza endüstrilerinde kullanılır. Pek çok deniz kaynaklı *Bacillus* türleri alkali enzimleri üretirken asidik enzimleri ise deniz mantarları üretir (Gouda, 2006; Kumar ve ark., 2005).

Tuz Toleransı ve Organik Çözücülere Dayanıklılık

Deniz mikroorganizmalarının karakteristik özelliği yüksek tuzlu ortamlarda yaşayabilmeleri ve bunlardan elde edilen enzimlerin de yüksek tuz konsantrasyonlarında aktivite göstermeleridir. Reaksiyon sistemlerinde tuz genellikle ortamda kirletici bir reaktif veya ürün olarak bulunur, bazen de tuz biyoproses sırasında proteinleri stabilize etmek için kullanılır. Peptid sentezinde genellikle halofilik proteazlar kullanılır. Reaksiyon ortamı örneğin deri veya gıda işlenmesi gibi ortamlarda yüksek tuz konsantrasyonu var ise tuza dayanıklı proteazlar kullanılır. Tuza dayanıklı enzimler kullanılarak deniz mikroalglerinden ve yosun biyokütlelerinden biyodizel üretimi üzerine çalışmalar sürmektedir. Bazı tuza dayanıklı enzimlerin hekzan ve eter gibi pek çok organik çözücüye dayanıklı olduğu saptanmıştır. Bu özellikten yararlanarak ilaç sanayinde sentez basamaklarındaki reaksiyonların katalizlenmesinde ve şirai ilaçların yapımında kullanılmaktadır. Biyodizel üretiminde de organik çözücülere dayanıklı esterazlar veya lipazlar deniz mikroorganizmalarından üretilmektedir (Chopade, 2009; Shakraorty ve ark., 2011).

Basınca Dayanıklılık

Büyük miktarlarda yapılan biyoproseslerde hacim dönüşümü çok olmakta ve ortam basıncını arttırmaktadır. Bu reaksiyonların biyokatalizinde basınca dayanıklı enzimlere gereksinim olmaktadır. Basınca dayanıklı enzimler gıda endüstrisinde gıda işlenmesi ve sterilizasyonunda kullanılmaktadırlar. 5000 m deniz derinliğinden elde edilen mantardan üretilen proteaz 300 bara kadar basınca dayanmaktadır ve *Mathanoccus jannaschii* de elde edilen bir proteaz çok yüksek basınca ve sıcaklığa (125°C, 500 bar) dayanabilmektedir (Hayashi, 1996). Yine aynı mikroorganizmadan elde edilen bir hidrojenaz da 260 bara kadar basınca dayanabilmektedir (Abe ve Horikoshi, 2001).

1.5 Halofiller

Hipersalin ortamlar gezegenimizde yaygındır, tuzlu göller, diğer tuzlu su sistemleri ve tuzlu topraklar bu ortamlara dahildir. Halofiller, habitat olarak yüksek iyonik kompozisyonda yaşayabilen canlılardır (Oren, 2002; Ventosa, 2006). Farklı mikroorganizmaların tuzla ilişkileri ayrıntılı olarak incelenmiştir ve bununla ilgili birkaç sınıflandırma önerilmiştir (Kushner ve Kamekura, 1988). Bu sınıflandırma, NaCl konsantrasyonuna göre mikroorganizmaların optimal büyümesini inceler. Bu nedenle, halofiller iki ana fizyolojik grup olarak yüksek tuzlu ortamlarda bulunabilir:

Aşırı Halofiller: % 15-30 (2.5-5.2 M) NaCl içeren ortamlarda yaşayabilen *Archaea* adı verilen organizmalardır. Farklı şekillere sahip olabilirler örneğin; küresel, çubuk, spiral, yumrulu, yassı kare şekilli veya dikdörtgen yapıda bulunabilirler (Boone ve ark., 2001).

Halofilik arkeler, *Euryarchaeota* Filumuna eklenmiştir. Haloarkealar, şu anda tek bir aile içinde yer almaktadır (Gibbons, 1969). Bunun yanında, bazı halofilik metan türleri tarif edilmiştir (Cavalier-Smith, 2002). *Haloarkea*'ların en önemli özelliği yüksek NaCl konsantrasyonuna mutlak gereksinim duymalarıdır.

İlımlı Halofiller: %3-15 (0.5-2.5 M) NaCl ortamında optimal büyüyenler (Kushner ve Kamekura, 1988). İlımlı halofil bakterilerin çoğu türleri Gram-pozitif veya Gram-negatif aerob veya fakültatif anaeroblardır. Endospor oluşturabilen, aerobik, ılımlı halofil, Gram-pozitif çomaklar, toprak veya sucul habitatlar gibi tuz içeren ya da yüksek oranda tuz içeren çevrelerden sıklıkla izole edilmiştir (Ventosa ve ark., 1995; Arahal ve Ventosa, 2002; Carrasco ve ark., 2007). Halobakterilerin ribozom yapısının bozulmaması için yüksek miktarda potasyum iyonuna ihtiyacı vardır. Dış ortamında ise bol miktarda sodyum iyonu bulunmalıdır çünkü sodyum iyonları hücre duvarına bağlanarak yapıyı korur. Yeterli sodyum iyonunun bulunmadığı durumlarda hücre duvarı dağılır ve hücre parçalanır. Bunun nedeni, hücre duvarı yapısında negatif yüklü aspartat ve glutamat gibi aminoasitler bulunmasıdır. Sodyum iyonu uzaklaşırsa bu negatif yükler birbirini iterek hücrenin patlamasına sebep olur (Madigan ve Martinko, 2006). Ülkemizde Van Gölü ve Tuz Gölü, Acıgöl, Salda Gölü, Seyfe Gölü, Tuzla Gölü, Bolluk Gölü ve çevresindeki topraklardan izole edilebilirler (Ozcan ve ark, 2007). İlımlı halofil bakterilerin gram pozitif cinslerinin *Bacillus*, *Alkalibacillus*, *Clostridium*,

Gracilibacillus, *Halobacillus*, *Lentibacillus*, *Marinococcus*, *Nocardiopsis*, *Pontibacillus*, *Prauserella*, *Saccharomonospora*, *Salinibacillus*, *Streptomonospora*, *Tenuibacillus*, *Tetragenococcus*, *Thalassobacillus*, *Virgibacillus*, *Yania*, *Microbacterium*, *Filobacillus*, *Dietzia*, *Marinibacillus*, *Desulfotomaculum*, *Salinicoccus*, *Nesterenkonia*, *Jeotgalibacillus*, *Natronincola* ve *Sporosarcina* olduğu bildirilmiştir. *Algoriphagus*, *Alteromonas*, *Arhodomonas*, *Chromohalobacter*, *Desulfocella*, *Desulfohalobium*, *Desulfovibrio*, *Halanaerobacter*, *Halanaerobium*, *Halochromatium*, *Haloicola*, *Halomonas*, *Halorhodospira*, *Halospina*, *Halothermothrix*, *Halothibacillus*, *Halovibrio*, *Idiomarina*, *Marinicola*, *Marinobacter*, *Methylococcus*, *Methylohalobius*, *Muricauda*, *Natroniella*, *Nitrincola*, *Orenia*, *Palleronia*, *Pseudoalteromonas*, *Psychroflexus*, *Psychrobacter*, *Rhodospirillum*, *Rhodothalassium*, *Rhodovibrio*, *Roseisalinus*, *Salegentibacter*, *Salinimonas*, *Salinisphaera*, *Salinivibrio*, *Salipiger*, *Selenihalanaerobacter*, *Spirochaeta*, *Sporohalobacter*, *Staleyia*, *Sulfitobacter* ve *Thiohalocapsa*'nın ise Gram-negatif cinsler olduğu belirtilmiştir (Ventosa, 2006).

1.5.1 Halofillerden Enzim Eldesi

Halofilik bakterilerin hücre içi tuz konsantrasyonları, dış ortam tuz derişimine eşit kabul edilmektedir. Halofillerin üredikleri ortamdaki tuz derişimi o kadar yüksektir ki, normal bir hücrenin proteinlerinin bu derişimde çökmesi beklenir. Halofilik bakterilerin enzimleri de tuz toleransı gösterir (Larsen, 1973; Pundak, 1981). Aşırı halofillerin enzimleri yüksek tuz derişiminde aktiftir ve ortamda KCl'de varsa aktiviteleri daha da artar. Protein sentezleri de KCl'e gereksinim duyar (Kushner, 1978; Lanyi, 1979). Az halofilik bakterilerde protein sentezi için Na^+ iyonlarına gerek görülmekte olmasına karşın, halobakterilerdeki K^+ bağımlılığı görülmez.

Halofilik bakterilerin enzim ve proteinleri asidik karakter gösterirler. Bu nedenle bu bakteriler proteinlerinin işlevleri için yüksek tuzluluk talebinde bulunurlar. Çünkü yüksek tuz derişimi, asidik proteinlerin nötralizasyonunu sağlar. Halofilik bakterilerin tuz ihtiyacı bu yolla açıklanabilir (Larsen, 1973; Douglas, 1980).

Halofilik bakterilerin metabolizması: Laboratuvar koşullarında protein içeren besiyerinde iyi ürerler. Fermentatif karakter taşımazlar. Üreme için karmaşık yapıllı ortamlara gereksinim duyarlar. Pepton ve sülfattan H_2S oluşturur ve jelatini hidrolize

edebilirler. Bu bakterilerde oksidaz, katalaz ve arjinin dehidrolaz enzimleri yer alır (Breed, 1974).

Halofilik bakterilerin morfolojileri: Basil veya kok görünümündedirler. Üre varlığında, basil şeklindeki bir halofilik bakteri, morfolojisini değiştirerek sferik bir hal alır. (Larsen, 1967) Halofiller, kendi optimal tuz derişimlerinden farklı ortamlarda morfoloji değiştirebilirler (Kushner 1978, Hunter 1980). Halofilik bakterilerin üreme ortamlarında Na^+ veya K^+ iyonları yerine NH_4^+ , Li^+ veya iki değerlikli katyonlar bulunursa basil şekilli halofillerin sferik şekil aldığı gözlenmiştir (Mohr 1963).

1.6 *Bacillus* Türleri

Üst âlem: *Bacteria*

Âlem: *Eubacteria*

Şube: *Firmicutes*

Sınıf: *Bacilli*

Takım: *Bacillales*

Familya: *Bacillaceae*

Cins: *Bacillus*

Bacillus, *Bacillaceae* familyasına, *Firmicutes* şubesine aittir. Gram-pozitif, aerobik veya fakültatif anaerobik, sporlu, çubuk şekilli bakterilerdir. Çoğunluğu mezofilik olmasının yanında psikrotrof ve termofilik türleri de mevcuttur ve endosporla üremektedirler. Vejetatif hücrelerin çapı $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ ile $2,5 \times 10 \mu\text{m}$ civarındadır. *Bacillus*ların koloni morfolojisi çeşitlilik göstermektedir ve çoğunluğu beyaz ya da krem rengi kolonilere sahiptir.

Bacillus'ların pek çok türü, farklı endüstrilerde kullanılan enzimleri üretebilir. Bazı türleri, olumsuz çevre koşullarında; fosfor, azot, oksijen yokluğunda ortamda aşırı karbon kaynağı varsa polihidroksi alkanoatları hücre içinde biriktirebilir (Reddy ve ark., 2003). *Bacillus* türleri doğada çok yaygındır ve aynı zamanda yüksek pH (*B. alcalophilus*), sıcaklık (*B. thermophilus*) veya yüksek tuz konsantrasyonu (*B. halodurans*, *B. thuringiensis*) gibi ekstrem çevre koşullarında da yaşayabilen türleri vardır.

Çalışmamızda test suşları olarak kullandığımız *Bacillus* suşları ve özellikleri aşağıdaki gibidir:

Bacillus siamensis

Bacillus siamensis türü, Tayland'da tuzlanmış yengeçten izole edilmiştir. NaCl içermeyen ve 14% (w/v) NaCl içeren ortamlarda, 4-55 °C sıcaklıkta ve pH 4.5-9.0'da gelişebilmektedir. Toplam DNA'daki GC oranı %41.4'dür (Sumpavapol ve ark., 2010).

Bacillus tequilensis

Araştırmacılar, *Bacillus tequilensis* türünü Jalisco (Meksika) yakınlarındaki yaklaşık 2000 yıllık mezardan izole ederek tanımlamışlardır (Gatson ve ark., 2006). Çomak şeklindeki bu bakterilerin çapları 0.9 µm ve uzunlukları 4.0 µm'dir. Endosporları hücrenin merkezindedir. *Bacillus tequilensis*'in hücreleri hareketli, katalaz negatif ve oksidaz pozitifdir (Gatson ve ark., 2006).

Bacillus pumilus

Bacillus pumilus aerobik bir bakteridir. Toprakta ve bazı bitkilerin köklerinde kolonize olmaktadır. Sahip olduğu antifungal ve antibakteriyal aktivite sayesinde bitkilerle simbiyotik bir biçimde yaşar ve bitki gelişimini destekleyici olarak rol alır (Sari ve ark., 2007; Joo ve ark., 2004). *Bacillus pumilus*'tan elde edilen proteaz gıda, deterjan, kimya ve deri endüstrilerinde kullanılmaktadır (Pan ve ark., 2004). *Bacillus pumilus*'un ürettiği hücre dışı enzim olan alkalın serin proteaz Çin'de deri endüstrisinde kıl giderme işleminde kullanılmaktadır (Pan ve ark., 2004). *Bacillus pumilus* düşük besin içeriği olan şartlarda, H₂O₂'de, kimyasal dezenfeksiyonda ve diğer sert koşullarda endospor oluşturabildiği için dirençlidir (Parvathi ve ark., 2009).

Bacillus safensis

Bacillus safensis, gram pozitif, sporlu, çubuk bakteridir. Hücre çapı genellikle 0.5-0.7 µm uzunluğu 1.0-1.2µm arasındadır. Bakterinin *Firmicutes* filumuna ait bilinen birkaç suşu vardır. *Bacillus safensis*, aerobik kemoheterotroftur ve tuza, UV radyasyonuna ve gama radyasyonuna direnci yüksek bir suştur (Kumar, 2014). Bu özelliklerinden dolayı güçlü bir bitki hormonu üreticisidir. Yani bitkinin büyümesini artıran bir bakteridir. (Kotharive ark., 2013).

Bakterinin 13 yeni suşu, ilk defa Florida'daki Kennedy Space Center'dan ve California'daki NASA Jet Propulsion Laboratuvarı'ndan izole edilmiştir. Bakteri; adını Uzay aracı Montaj Tesisi (Spacecraft Assembly Facility)'nden (SAF) almıştır (Satomi, 2006).

Endospor oluşturabilen bu bakteri, hareketlidir. Hücreleri 0.5-0.7 µm çapında, 1.0-1.2 µm uzunluğundadır. Oksidaz, katalaz, esterase, jelatinaz üretebildiği halde, H₂S, triptofandan indol, amilaz, DNaz ve üreaz üretememektedir. Nitratı nitrite indirgeyemezler. % 10 NaCl varlığında, 30-37 °C'de optimum gelişme göstermektedir. DNA'daki GC oranı %41-41.4'dür (Satomi ve ark., 2006).

Bacillus licheniformis

Saito (1973), α-amilaz enzimi üreten, termofilik *Bacillus licheniformis*'i izole ettiğini açıklamıştır. Bu mikroorganizmanın uzun zamandan beri bazı enzimlerin ve antibiyotiklerin üretiminde kullanıldığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Rothstein ve ark., 1986; De Clerck ve ark., 2004).

1.7 Enzim Saflaştırma

Enzim saflaştırmanın amacı; saf protein elde etmenin yanı sıra, çalışmanın sonraki adımlarında kullanmak üzere protein preparatları hazırlamaktır. Bu çalışmalarda; proteinin aktivitesinin araştırılması, yapısının veya yapı fonksiyon ilişkisinin aydınlatılması gibi hedefler mevcuttur. En iyi saflaştırma yöntemi en kısa sürede en fazla miktarda protein elde edilen yöntemdir. Saflaştırma basamağı ne kadar çok ise verim o kadar düşük, ama saflık derecesi bir o kadar yüksek olur. Az sayıda saflaştırma basamağı ile, istenilen saflıkta protein preparatı hazırlamak oldukça önemlidir.

Protein Kaynağını Belirleme:

Seçilen kaynaktaki protein hem kararlı olmalı hem de bol bulunmalıdır. Mikroorganizmalar bu iş için iyi bir kaynaktır, büyük miktarda protein elde edilebilir. Hayvansal ve mikrobiyal kaynakların yanı sıra bitkiler de kullanılabilir ama mevsime ve iklime bağlılık, transport gibi sorunlardan ötürü bitkisel kaynakların kullanımı sınırlıdır.

Ham Ekstraktın Hazırlanması

Doku veya hücrenin parçalanarak istenen proteinin çözelti içine alınması için birkaç yol bulunmaktadır: sonikasyon, tekrarlı dondurma ve eritme, yüksek basınçla

homojenizasyon, filtreleme, ve organik çözücülerle hücre zarını geçirgenleştirme. Seçilen yöntem, proteinin hassaslığına bağlıdır. Hücre membranı, hücre içeriğine zarar vermeyecek şekilde parçalanmalıdır. Yöntemler içinde en az zararlı olanları ozmotik lizis, cam homojenizatörde elle homojenize etme ve ultrasonik dalgalarla parçalamadır. Daha az nazik ama yaygın olarak kullanılan yöntem ise blender ile öğütmedir. Bu yöntem bitki ve hayvan dokuları için kullanılabilir fakat bakteri hücre duvarlarının yıkılması için uygun değildir.

Saflaştırma işlemi sırasında proteinin kararlılığının sağlanması çok önemlidir. Hücre duvarı yıkıldıktan sonra koruyucu mekanizmalar etkinliğini kaybeder bu yüzden hücre ortamını taklit etmemiz gerekir ki saflaştırma işlemi boyunca protein kimyasal bütünlüğünü ve fonksiyonlarını koruyabilsin.

Standart hücresel ortam suludur ve anorganik tuzlar içerir, yani iyonik kuvveti çok yüksektir. Hücre ekstreğine KCl, NaCl, MgCl₂ katarak iyonik kuvveti sağlayabiliriz. Hücrenin pH'ı doğal tamponlar ile korunur. Bu yüzden proteini stabilize etmek için mutlaka bir tampon sistemi kullanılmalıdır. Fizyolojik pH'ta tris ve fosfat tamponları oldukça yaygın kullanılır. Ayrıca pek çok protein oksitlenmeye açıktır. İndirgeyici bir ortam sağlamak için merkaptoetanol, sistein gibi bileşikler kullanabiliriz. Hücreler yıkıcı enzimler (proteazlar) içerirler ve bu enzimler peptit bağlarını hidrolizlerler. Hücre yıkıldığı anda bu proteazlar ortama salınırlar ve proteinleri sindirmeye başlarlar. Bu etki de spesifik proteaz inhibitörleri veya bazı biyoaktif peptitler kullanılarak önlenabilir. Kimyasal reaksiyonların hızları düşük sıcaklıklarda azalır. Bu yüzden protein saflaştırma işlemleri 0-4°C civarında yapılmalıdır.

Tuz ile Çöktürme

Saflaştırma işleminde öncelikle, amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) gibi çözünürlüğü yüksek bir tuz yardımıyla proteinler çöktürülmelidir. Amonyum sülfat tuzu ucuz, kolay bulunan ve kolay çözünen bir tuzdur, ayrıca proteinleri denatüre etmez, bu yüzden çok tercih edilir. Amonyum sülfat, suda çok çözünerek proteinle etkileşebilecek suyu azaltır. Ham hücre ekstraktına buz üzerinde yavaş yavaş ve kademeli olarak tuz eklenir. Çöktürme işlemi için soğuk aseton veya etanol de kullanılabilir. Organik çözücüler, proteinlerin suyunu alarak veya çözücünün dielektrik sabitini düşürerek iki yolla

proteinleri çöktürebilir. Organik çözücülerini çok dikkatli kullanmak gerekir çünkü proteinleri kolaylıkla denatüre edebilirler (Boyer, 1975).

Yüksek Devirli Santrifüj

Santrifüj, merkezkaç kuvveti kullanılarak, bir sıvıda süspansiyon şeklinde bulunan farklı kütlelerde veya yoğunluklardaki taneciklerin ayrılması için kullanılan bir yöntemdir. Numunenin santrifüj içinde döndürülmesinin sonucunda, düşük kütleli taneciklere kıyasla, kütlesi yoğun olan tanecikler dışa doğru daha hızlı hareket ederler. Bir süspansiyon santrifüjlendiğinde, kabın dibinde "pellet" denilen sıkışık bir çökelti meydana gelir. Sıvıdaki en yüksek kütleli ve en az sürüklenen bu tanecikler pellette bulunurlar. Kabın dibinde bulunan, sıkışmayan, çoğunlukla sıvı içinde kalan taneciklere de "süpernatant" (üst faz) denir. Santrifüj hızı, numuneye uygulanmış açısal ivmeyle belirtilir, g'nin katları ile ifade edilir (Boyer, 1975).

Diyaliz

Diyaliz; proteinlerin küçük moleküllerden ayrıştırılması için kullanılan bir ayırma yöntemidir. Tuz ile çöktürmenin ardından kullanılacak iyon değişimi kromatografisi için, tuzun giderilmesi gerekir, bunun için diyaliz yapılır. Diyaliz aynı zamanda biyomoleküllere zayıf bağlanan küçük iyonların ve moleküllerin uzaklaştırılmasında da kullanılırlar. Protein kofaktörleri NAD, FAD ve metal iyonları diyalizle uzaklaştırılabilir. Diyalizde, yarı geçirgen bir membran kullanılır, membrandaki porların genişliği, protein geçişine izin vermezken, tuz iyonları bu porlardan geçebilir. Numune, iki ucu açık olarak bulunan diyaliz membranına alt ucu bağlandıktan sonra doldurulup üst ucu da kapatılır, membran büyük hacimli bir kaba, tampon çözelti içine yerleştirilir. Molekül ağırlığı 1000'in üzerinde olan moleküller membrandan dışarı çıkamazken, küçük moleküller çıkabilir. 4-6 saat içinde denge durumuna ulaşılır. Birkaç saatte bir tampon çözelti değiştirilerek dengeye gelmesi sağlanır. Yüksek sıcaklıklarda biyomoleküller daha az stabildir bu yüzden diyaliz işlemi 3-4°C'de yapılmalıdır. En çok kullanılan membranlar; colloidon, selefon ve selülozdur (Boyer, 1975).

Kromatografi

Kromatografik yöntemler biyokimyada çok sık kullanılır. Bu yöntem ilk defa Rus botanikçi Tswett tarafından, bitki pigmentlerini ayırmak için kullanılmıştır. Kromatografinin temeli; protein içeren bir çözeltinin, içinde özel malzeme bulunan bir kolon (cam veya metal) içerisinden geçirilmesidir. Sistemde durgun ve hareketli olmak üzere iki faz vardır. Durgun faz katı, sıvı, katı-sıvı karışımı olabilir. Hareketli faz ise sıvı veya gazdır. Çözelti, kolonda ilerlediği sırada, proteinler kolon malzemesiyle farklı biçimlerde etkileşime geçer ve kolonda ilerleme süreleri arasında fark olur. Kolondan elde edilen elüatlar farklı zamanlara göre ayrı tüplerde toplanır ve karışım ayrılmış olur. Kromatografi sonunda genel olarak 280 nm dalga boyundaki ışığı soğurmaları ile enzimler tespit edilebilirler. Farklı kromatografi yöntemleri vardır. Bizim deneyimizde kullandığımız yöntem ise İyon Değişimi Kromatografisi'dir:

İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi; bileşikleri, iyon yüklerinin cinsi ve miktarına göre ayırır. Anyon değiştiriciler artı yüklüdür ve negatif yüklü tanecikleri tutmak için; katyon değiştiriciler de negatif yüklüdür ve pozitif yüklü tanecikleri ayırmak için kullanılır. Öncelikle kolon tampon çözelti ile yıkanır. Numune kolona verilir, çözeltide bulunan iyonlarla diğer çözünen tanecikler arasında, kolondaki materyale bağlanma yarışı başlar. Her çözünenin ne kadar sık bağlı kaldığı, taşıdığı elektrik yüküyle ilgilidir. Yükü en zayıf olan bileşikler kolondan ilk olarak çıkanlardır, ondan sonra çıkanlar giderek yükü artan bileşiklerdir. Ayrışmayı etkileyen faktörler; pH, tampon çözelti tipi, tampon çözelti konsantrasyonu ve sıcaklık gibi faktörlerdir. İyon değişimi kromatografisi; protein saflaştırmada çok etkin bir yöntemdir. Analitik ve preparatif saflaştırmalarda yaygın şekilde kullanılır.

Tablo 1. En çok kullanılan iyon değişim reçineleri (Boyer, 1975).

REĞİNE TİPİ	FONKSİYONEL GRUP	MATRİKS	SINIFI
Anyon Değiştiriciler:			
AG1	Tetrametilamonyum	Polistiren	Kuvvetli
AG3	Tersiyer Amin	Polistiren	Zayıf
DEAE-Selüloz	Dietilaminoetil	Selüloz	Zayıf
PEI Selüloz	Polietilenimin	Selüloz	Zayıf
DEAE-Sephadex	Dietilaminoetil	Dekstran	Zayıf
QAE-Sephadex	Dietil aminoetil	Dekstran	Kuvvetli
Kasyon değiştiriciler:			
AG 50	Sulfonik asit	Polistiren	Kuvvetli
Bio-Rex70	Karboksilik asit	Akrilik	Zayıf
CM-Selüloz	Karboksimetil	Selüloz	Zayıf
P-Selüloz	Fosfat	Selüloz	Orta
CM-Sephadex	Karboksimetil	Dekstran	Zayıf
SP-Sephadex	Sulfopropil	Dekstran	Kuvvetli

pH'taki değişimler, proteinler ve kolon iğeriği tarafından kompanse edilir. Tuzun iğerdiği zıt yük sayesinde tuz hiçbir engelle karşılaşmadan kolondan geçer. Gradyan oluşturmak için NaCl veya KCl kullanılır.

İyon değiştirici reğinelere tutunma, deneme yanılma yöntemiyle saptanır. Önce DEAE seğilecek olursa, 0.02M Tris HCl pH=8 tamponu seğilmelidir. Örnek kolondan geğirilir ve proteinin tutunup tutunmadığına bakılır. Eğer kolona tutunmadıysa CM Selüloz'a tutunacak demektir. Protein kolona tutunduysa da, 0.1-1.0 M KCl ile elüe edilmelidir (Boyer, 1993).

Elektroforez

Elektroforez, bir elektrik alan içinde iyonların hareketi esasına dayanır. Anyonlar anoda, katyonlar katoda doğru hareket ederler. Göç hızı ve hareketlilik çeşitli faktörlerden etkilenir:

- 1) Yükün büyüklüğü: Net yük arttıkça moleküller daha hızlı hareket eder.
- 2) Molekülün büyüklüğü: Büyük moleküller daha yavaş hareket eder.
- 3) Destek ortamının özellikleri: Destek ortamının artan viskozitesi hareketliliği ve adsorpsiyonu yavaşlatır.
- 4) Elektrik alanın büyüklüğü: Voltajın artması göç hızını artırır.
- 5) Endosmos: Destek ortamına özgü özellikte, ayrılan molekülün akışına ters yönde çözülmüş ve çözücü taneciklerin akışı ile sonuçlanır.
- 6) Tamponun iyonik gücü: Tamponun düşük iyonik gücü daha hızlı göç sağlar.
- 7) Sıcaklık: Sıcaklık arttıkça göç hızı artar.

En çok kullanılan elektroforez çeşidi, sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezidir (SDS-PAGE). Sodyum dodesil sülfat bir deterjandır ve alifatik uç, polipeptidi sarar, polipeptid negatif yüklenmiş olur.

Ayrırma işleminde temel faktör proteinin boyutudur. Kullanılan jel, akrilamid polimerlerinden meydana gelmiştir. Uzun polimerik zincir, aktif akrilamid moleküllerinin reaksiyonuyla meydana gelir. Jel oluşumunda zincirlerin çapraz bağlanması için N-N'-metilen-bis-akrilamid kullanılır. Çapraz polimer boyunca hareket eden numunedeki proteinler elektrik akımı yardımıyla göç ederler. Molekül boyutu ne kadar büyük olursa, jel boyunca hareketi o kadar az olur (Oucterlony ve Nilson, 1973).

Denatürasyonlu elektroforez

Oldukça yaygın kullanılan bir yöntem olan SDS PAGE ‘de proteinler SDS deterjanı ile denatüre edilirler. Katlanmış hallerini kaybeden proteinler, negatif yüklenmiş deterjan molekülleriyle kaplanırlar. Elektrik alan içinde, deterjanla kaplı olan proteinler, boylarıyla ters orantılı hızda hareket ederler ve büyüklüklerine göre ayrılmış olurlar. Jel içinde ayrıştırılan proteinlerin yerleri, Coomassie Brilliant Blue (CBB-G250) boyası ile tespit edilir.

Denatürasyonsuz elektroforez

Proteinler, SDS deterjanı ile denatüre olmadan, jel içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılabilirler ama SDS-PAGE yöntemindeki gibi, yükleri ile boyları orantılı değildir, hızları kütlelerine ve taşıdıkları elektrik yüküne, ayrıca şekillerine de bağlı olur (Ehle ve Horn, 1990; Regnier, 1983).

Bradford Metodu

Bu yöntemde, Coomassie Brilliant Blue boyasının asidik bir çözeltideki proteine bağlanması, boyanın 465 nm’deki maksimum absorpsiyonunu 595 nm’ye kaydırmaktadır. 595nm’deki absorpsiyon proteinin konsantrasyonuna aittir. Sığır plazma gamma globülini ve sığır serum albümini ile bir standart eğri hazırlanır, boya reaktifinin protein örneğine katılmasıyla 2 dk gibi çok kısa bir zamanda renklenme oluşur ve bu renklenme 1 saate kadar sabit şekilde kalır. Bradford metodu çok hızlıdır, protein olmayan maddelerden kolay kolay etkilenmez, avantajlı bir metoddur (Bradford, 1976).

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Çalışma Araçları

-80°C DERİN DONDURUCU: Thermo Electron Corp., Forma (A.B.D.)

Santrifüj: SIGMA 3K 30 Yüksek devirli soğutmalı labortuvar santrifüjü (ABD)

Spektrofotometre: SHIMADZU UV-VisDoublebeam UV-1601 (Japonya)

Su banyosu: CLIFTON Digitalshakerbath (İngiltere)

Derin dondurucu: VESTEL çekmeceli (Türkiye)

Buzdolabı: ARÇELİK (Türkiye)

Vorteks: FISONS Whirlimixer (İngiltere)

Isıtıcı-Manyetik karıştırıcı: CHILTREN ısıtıcılı manyetik karıştırıcı HS31 (İngiltere)

pH metre: LCS LD 108 Digital (Almanya)

Etüv: NUVE EN500 etüv

Otomatik pipetler: VOLAC digitalmicropipet (ABD)

Otoklav: WEB MLW Otoklav (Almanya)

2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

MOPS, Tween 80, N,N-Dimetilformamid, p-nitrofenil laurat (p-NPL), DEAE-Sefaroz, jel elektroforez reaktifleri ve protein standart karışımı Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA)'dan, maya ekstraktı ve agar Merck (Darmstadt, Germany)'ten satın alınmış olup, Bradford reaktifi ve ovalbümin Biorad (Biorad Laboratories, Hercules CA, USA) Firmasından temin edilmiştir. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Bitkisel yağlar; fındık yağı, hint yağı, ayçiçek yağı, mısırözü yağı, marketlerden; zeytin yağı, gliserol ve zeytinyağı üretimi üstü yağı su Emre Düşmez Zeytincilik A. Ş.'den temin edilmiştir.

2.3 Yapılan Çalışmalar

2.3.1 Besiyerlerinin Hazırlanması ve Bakterilerin Çoğaltılması

Tuzlanmış koyun derilerinden izole edilen ve moleküler yöntemlerle tanımlanan *Bacillus siamensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus safensis* ve *Bacillus pumilus* Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Çağlayan, 2015). 10 ml, %0.5 maya ekstraktı, % 10 tuzlu su (TS 10: %8.1 (a/h) NaCl, %0.7 (a/h) MgCl₂, %0.96 (a/h) MgSO₄, %0.036 (a/h) CaCl₂, %0.2 (w/v) KCl, %0.006 (a/h) NaHCO₃, ve %0.0026 (a/h)) içeren kompleks besiyerine ekildi. Ortamın pH' 7.5 e ayarlandı ve 37°C'de 24 saat boyunca çalkalamalı etüvde inkübe edildi (Caglayan ve ark., 2015, Ventosa ve ark., 1989).

2.3.2 Lipaz Üretimi:

İnkübasyon sonrasında tüm bakteri kültürlerinden 30 µl, 10 ml test ortamına (%1 zeytinyağı (a/h), %0.5 maya ekstraktı (a/h) ve SW10) aktarılmış olup 24 saat boyunca 37°C'de sabit çalkalandı. Zeytinyağı besiyerine otoklavdan sonra emülsifier olarak Tween 80 eklenmiştir. Fermantasyon sonunda, tüm kültür sıvı ortamı 10.000 g 4°C'de, 20 dk boyunca santrifüjlenip, lipaz aktivitesi için üst faz alındı ve çöken tüm hücreler ortamdaki uzaklaştırıldı (Caglayan ve ark., 2015).

2.3.3 Lipaz Aktivite Tayini

Lipolitik aktivite 405 nm’de p-NPL’nin p-nitrofenol’e hidrolizlenmesiyle ölçülmüştür. İlk olarak Tris tamponu (100 mM Tris-HCl ve 5 mM CaCl₂) enzim tamponu hazırlanmış olup pH’ı 8.0’a ayarlandı. 30 µL hücrelerden arındırılmış üst faz 950 µL enzim tamponu ile karıştırılıp 37°C’de 15 dk boyunca su banyosunda inkübe edildi. Hemen ardından 20 µL substrat çözeltisi [10 mM p-NPB (p-nitrofenil laurat) dimetil formamit içinde] çözeltiye eklenip 15 dakika boyunca 37°C’de su banyosunda bekletildi. Kontrol olarak *Candida* lipaz enzim (10mg/mL) çözeltisi hazırlandı ve 30 µL alınarak örneklerle birlikte çalışıldı. Reaksiyonu durdurmak için tüpler -20°C’de 8 dakika boyunca soğutuldu. Lipaz aktivitesi Helios Zeta UV-Vis/Thermo, Waltham, MA, USA) spektrometresi kullanılarak 405 nm’de p-NPB hidrolizinin ölçülmesiyle saptandı. Tüm örnekler ve kontroller üçlü çalışıldı. 1 ünite lipaz aktivitesi, 15 dakikada 1 µmol pNP’ü serbest bırakan enzim miktarı olarak belirlendi (Lee ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2014).

Lipaz Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi

İnkübasyon süresinin lipaz enzimi üzerine olan etkisini araştırmak için yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan %1 zeytinyağı içeren besiyeri ortamına suşlar ekildi ve sırasıyla 24, 48, 72, 96 ve 120 saat süre ile 37°C’de tüpler inkübe edildi. Süreçlerin sonunda her bir tüp santrifüjlenip üst fazda lipaz tayini yapıldı (Ozcan ve ark., 2009).

Karbon Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi

%1 (a/h), zeytin yağı (ZY), %1 mısır yağı (MY), %1 ayçiçek yağı (AY), %1 fındık yağı (FY), %1 Hint yağı (HY), ve zeytin yağı firmasının atıkları olan ; %1 (a/h), zeytin yağı atık suyu (ZÜY) and %1 gliserol (GP) gibi çeşitli yağlar besiyeri ortamına katıldı ve bu karbon kaynaklarının lipaz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı (Massadeh ve ark., 2012; Bora ve Bora, 2012).

2.4. Lipazın Saflaştırılması

Lipaz üretimi için sonuçlarımıza göre, %1 fındık yağı içeren optimize edilmiş üretim ortamında en çok lipaz üreten suş olan *Bacillus safensis* izolatu seçildi. 100 mL besiyerinde 37°C de 96 saatte çalkalamalı etüvde (150 devir/dak) üretilen hücreler 10.000 g de, 20 dakika, 4°C de yüksek devirli, soğutmalı santrifüjde çevrildi ve üst faz dikkatlice ayrıldı. Üst faza soğukta sürekli karıştırarak % 60 doygunluğunda amonyum

sülfat eklendi. Çözelti, çökmenin tam olarak gerçekleşmesi için gece boyunca buzdolabında bekletildi. Bekletme süresinin ardından 10.000 g de, 20 dakika, 4 °C de çevrildi. Elde edilen çökelti 20 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8.0) çözöldü ve yine aynı tampona karşı 24 saat soğukta 5 kDa geçirgenliğe sahip diyaliz torbasında diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra çözelti 10 kDa por geçirgenliği olan ultrafiltrasyon santrifüj tüpleri (Milipore-Amicon) ile santrifüj edildi. Üstte kalan konsantre kısımda protein tayini yapıldıktan sonra anyon değıştirici kromatografi ile saflaştırma işlemi yapıldı. Bu amaçla DEAE-Sepharose (30x1.5cm) içeren kolon hazırlandı. Kolon 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ile yıkanarak dengeye getirildi. Protein tayini ile belirlenen uygun miktar süzöntü kolona yüklendi. Toplama tüpleri numaralandırıldı ve kolondan hacmi kadar tampon geçirildi ve 2 mL eluatlar tüplere alındı. Daha sonra kolona sürekli karıştırlarak NaCl gradyanı (0.1-1.0 M) (100 mL) uygulandı ve tüpler toplanmaya devam edildi. Toplanan fraksiyonlarda lipaz tayini ve protein tayini yapıldı. Lipaz aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi (Ghati ve Paul, 2015).

SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Saptanması

Saflaştırma mertebesini belirlemek ve izole edilen enzimin molekül ağırlığını saptamak için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulandı. Bu amaçla %12.5'luk ayırma jeli (pH 8.8) ve %4.5'luk hizalama jeli (pH 6.8) hazırlandı. Uygun miktar protein yüklenerek, standart molekül ağırlığı karışımı içeren jel elektrik akımında yürütöldü. Yürütme işleminden sonra jel Coomassie Brilliant Blue ile boyandı ve proteininin yüröme mesafesi standart protein karışımı ile kıyaslandı ve molekül ağırlığı saptandı.

Doğal PAGE ve Aktivite Boyanması

Saflaştırılmış enzimin doğal PAGE analizi, bazı basamakların çıkarılması dışında örneğın SDS nin ve β -merkaptöetanolün elektroforez işleminden çıkarılması ve örneklere jele yüklemenden önce ısıtma işlemi yapılmaması dışında SDS-PAGE ile aynı şartlar altında yapıldı. Örnekler yürütöldükten sonra jel, lipaz aktivite boyaması işlemi için %2 (v/v) α -naftil asetat (5 mM, asetonda çözönmüş) içeren 50 mM Tris-Cl tamponunda (pH 8.0) 30 dakika inköbe edildi. Daha sonra jel, 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 8.0) hazırlanmış 2.5 mM Fast Red ile inköbe edildi. Lipaz aktivitesi jelde mor renkli bir bandın çıkışı ile belirlendi (Ornstein ve ark., 1964).

2.5 Lipazın Karakterizasyonu

2.5.1 Enzime pH'ın Etkisi ve Enzimin Termal Kararlılığı

Saflaştırılan lipazın aktivitesi üzerine pH (4.0-11.0) aralığında hazırlanmış olan tamponların etkisini belirlemek için sırasıyla 20 mM pH 4.0-5.0 için sodyum asetat, pH 6.0-8.0; Tris-HCl, pH 9.0-11.0; NaOH-Glisin tamponları hazırlandı. Enzim bu tamponlar içinde 30 dakika, 37 °C de bekletildi. Lipaz aktivitesi daha önceki bölümde verilen standart çalışma yöntemine göre tayin edildi. Enzimim termal kararlılığını belirlemek amacıyla enzim 10 °C - 70 °C arasında 30 dakika bekletildi ve kalan enzim aktivitesi belirlendi.

2.5.2 Lipaz Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

Saflaştırılmış enzim % 0-15 aralığında hazırlanmış NaCl konsantrasyonu içeren enzim reaktifinin içerisinde 37°C de 6 saat bekletildi. Saflaştırılmış enzim % 0-15 aralığında hazırlanmış NaCl konsantrasyonu içeren enzim reaktifinin içerisinde 37°C de 6 saat bekletildi. Kalan enzim aktivitesi belirlendi (Ghati ve ark., 2015).

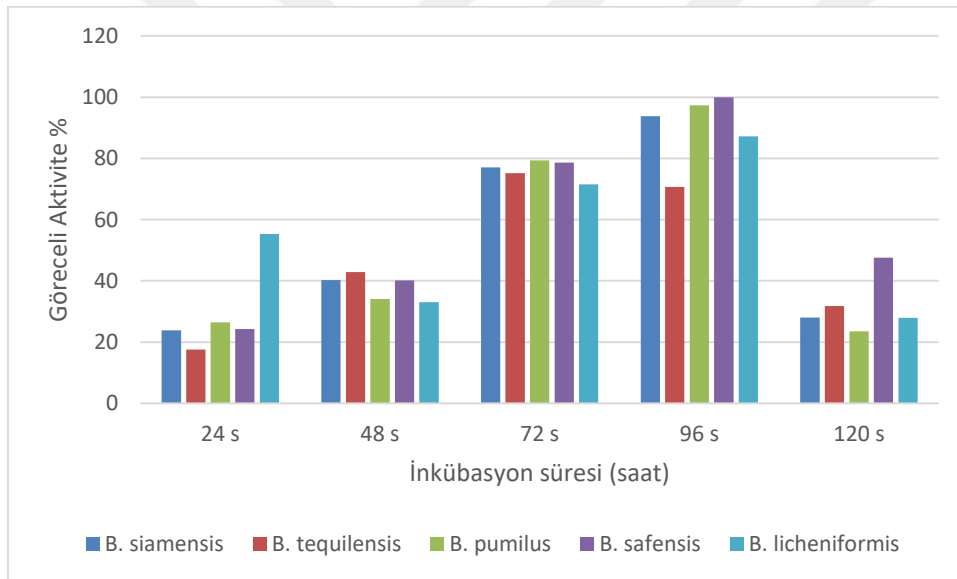
2.5.3 Metal İyonlarının, Deterjanların ve Organik Çözücülerin Enzim Üzerine Etkisi

Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} gibi metallerin ve EDTA'nın 0.1 ve 5.0 mM konsantrasyonlarının, Tween 20, Tween 40, Triton X-100, polietilen glikol (PEG) ve SDS yüzey aktif maddelerin 20 mM Tris-HCl tamponundaki %1 h/h'lik derişimlerinin ve n-hekzan, metanol, aseton and dimetil sülfoksid (DMSO) gibi organik çözücülerinin 20 mM Tris-HCl tamponundaki %10 h/h derişimlerinin enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlendi. Bu amaçla enzim hazırlanan çözeltilerin içinde 1 saat, 37 °C'de bekletildi ve kalan enzim aktivitesi belirlendi. Metal, yüzey aktif madde ve organik çözücü içermeyen enzimin verdiği aktivite % 100 olarak alındı (Balaji ve Jayaraman, 2014).

3. BULGULAR

3.1 Lipaz Üretimine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Kültür ortamında zeytinyağı substrat olarak kullanıldığında 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda test izolatlarının lipaz aktiviteleri kantitatif olarak ölçüldüğünde tüm suşların iyi birer lipaz üreticisi olduğu, en yüksek aktiviteye tüm izolatlar için 96. saatte ulaşıldığı saptanmıştır. İzolatlar kendi aralarında kıyaslandığında en yüksek lipolitik aktiviteyi *B. safensis*'in en düşük aktiviteyi ise *B. tequilensis*'in gösterdiği saptanmıştır. İzolatların aktivitelerinin inkübasyon sürelerine göre ve kendi aralarındaki kıyaslanmaları Şekil 2 'deki grafikte gösterilmiştir

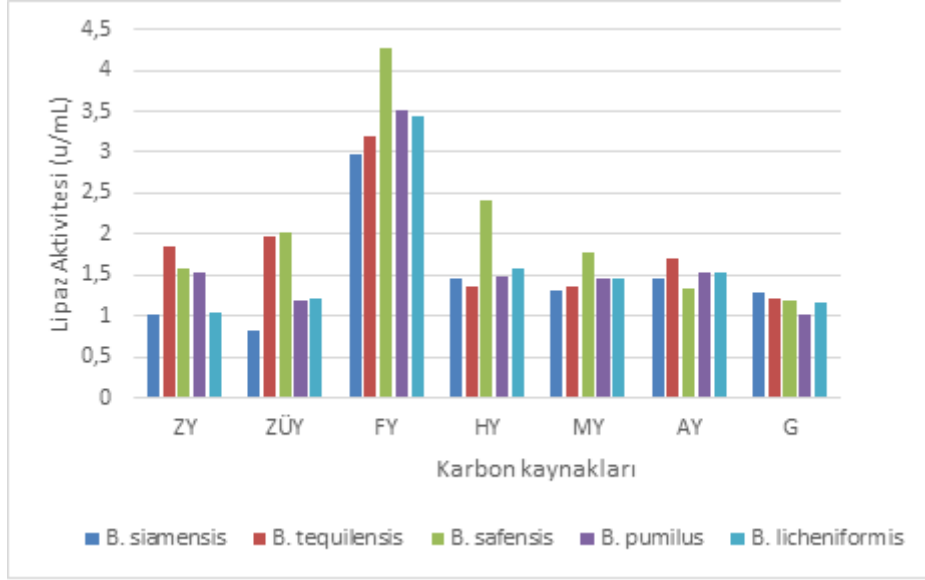


Şekil 2: İzolatların inkübasyon sürelerine karşı % göreceli aktiviteleri

3.2 Lipaz Üretimine Karbon Kaynaklarının Etkisi

B. safensis'in en iyi lipaz üreten suş ve 96 saatin de en uygun inkübasyon süresi olduğu belirlendikten sonra optimizasyon çalışmalarında bu suşun ve inkübasyon süresinin kullanılmasına karar verildi. Lipaz üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi incelendiğinde Şekil 3'te de görüldüğü gibi üretimin karbon kaynaklarına göre oldukça farklılık gösterdiği ve en iyi aktivitenin fındık yağı ile elde edildiği ve ekstraselüler aktivitenin; %1 fındık yağı (FY) > %1 hint yağı (HY) > %1 zeytin yağı üretim üstü

yağlı suyu (ZÜY) %1 > %1 mısır yağı (MY) > zeytin yağı (ZY) %1 > Ayçiçek yağı (AY) > %1 gliserol (G) şeklinde sıralandığı belirlendi.



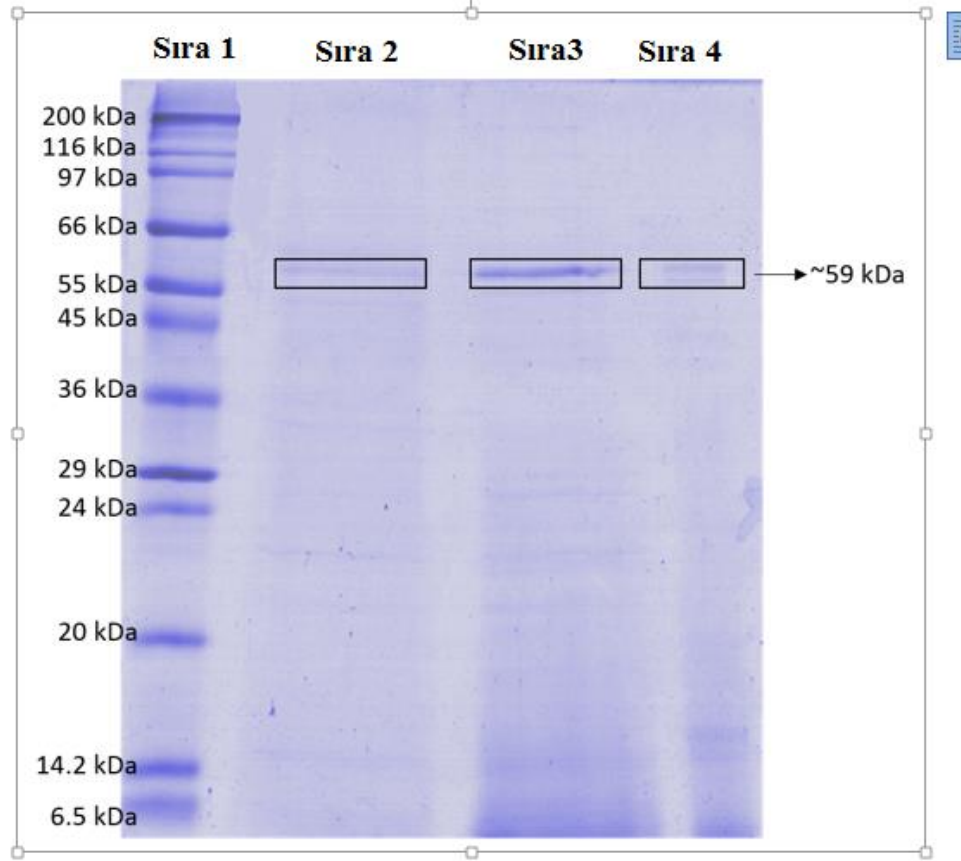
Şekil 3: Karbon kaynaklarına göre izolatlarda lipaz üretimi

3.3 Lipazın Saflaştırılması, Molekül Ağırlığının Tayini ve Aktivite Boyanması

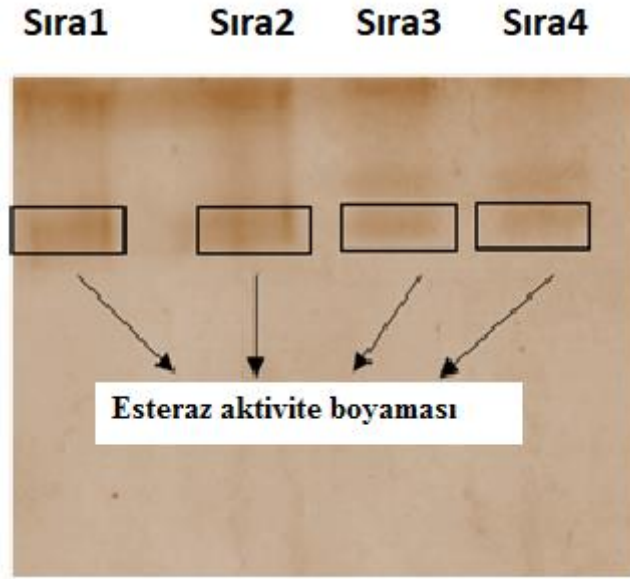
Ekstraselüler lipazın saflaştırılması 3 basamakta gerçekleşti. Tablo 1’de de görüldüğü gibi enzim; %8.86 verimle 13.38 kez saflaştırıldı. %12 SDS-PAGE ile enzimin tek bant verdiği ve molekül ağırlığının yaklaşık 59 kDa olduğu saptandı (Şekil 4). Doğal şartlar altında PAGE işleminden sonra Zimogram aktivite boyaması ile bu bantın kahverengi renk verdiği ve bu renk oluşumu ile saflaştırılan proteinin lipaz enzimi olduğu kanıtlandı.

Tablo 2. *Bacillus safensis*'den saflaştırılan lipazın saflaştırma basamakları

Saflaştırma basamağı	Total aktivite (U)	Total protein (mg)	Spesifik aktivite U/mg	Saflaştırma kat sayısı	Verim%
Süzüntü	564.1	15.55	36.27	1	100
Amon.sülfat çöktürmesi	235.89	1.37	172.18	4.74	45.00
DEAE-sefaroze kromatografisi	50.01.	0.103	485.53	13.38	8.86



Şekil 4. *B.safensis*'ten saflaştırılan lipazın SDS-PAGE analizi. 1.sıra; molekül ağırlığı standart karışımı, 2.sıra; ham lipaz, 3. sıra; amonyum sülfatla çöktürülmüş lipaz, 4. sıra; kolondan alınan saf lipaz.

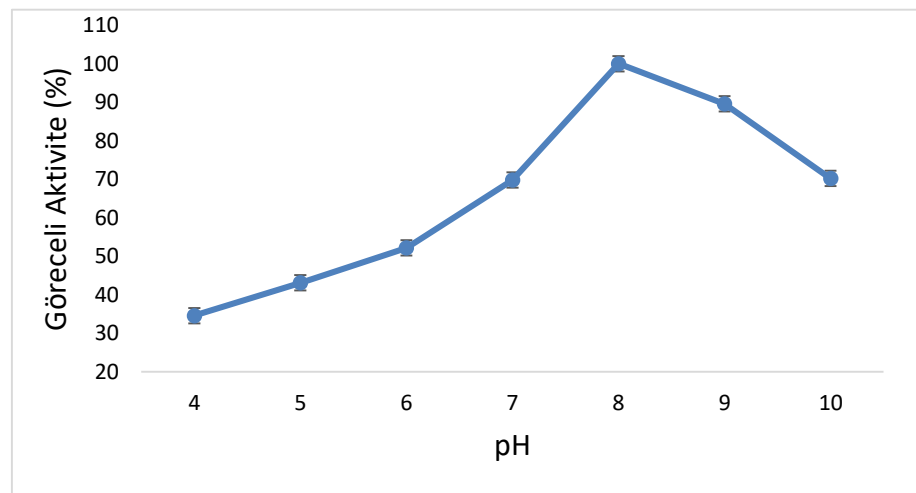


Şekil 5. *B.safensis* lipazının doğal-PAGE analizi ve lipazın aktivite boyaması. 1. ve 2. sıra; ham lipazın doğal-PAGE analizi ve amonyum sülfatla çöktürülmüş lipazın aktivite boyanması, 3. ve 4. sıra; kolondan alınan lipazın doğal-PAGE analizi ve aktivite boyaması. Lipolitik aktivite α -naftil asetat substratı kullanılarak saptanmıştır.

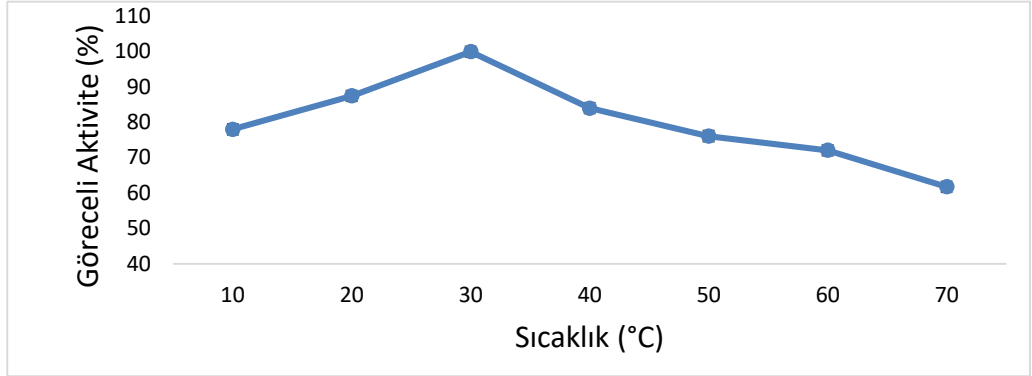
3.4 pH ve Sıcaklığın Saflaştırılmış Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Saflaştırılan enzimin aktivitesi pH 7-10 arasında kararlılığını korurken, pH 8.0 da en yüksek aktiviteyi gösterdi (Şekil 6). Yüksek pH değerlerinde bile aktivitesinin % 70 ini korudu. Enzimin termal kararlılığı ise Şekil 6'da gösterildi, şekle göre en yüksek termal kararlılığa 30°C civarında rastlandı.

(A)



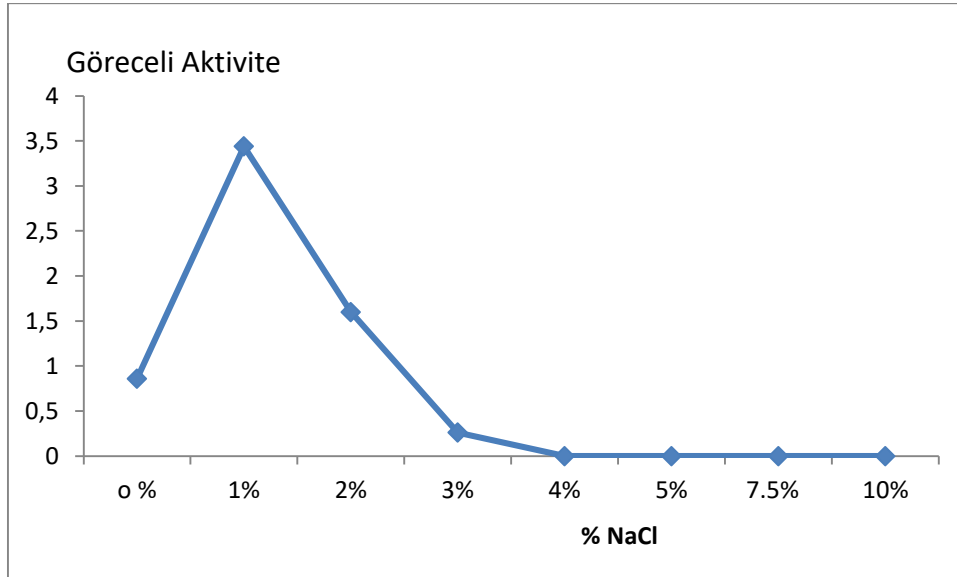
(B)



Şekil 6. pH (A) ve sıcaklığın (B) lipaz aktivitesi üzerine etkisi. Optimal pH 8.0 ve sıcaklık 30°C olarak saptanmıştır.

3.4.1 Lipaz Aktivitesi Üzerine NaCl Konsantrasyonunun Etkisi

Saflaştırılmış enzim % 0-15 aralığında hazırlanmış NaCl konsantrasyonu içeren enzim reaktifinin içerisinde 37°C de 6 saat bekletildiğinde, Şekil 7’den de görüldüğü gibi enzim tamponunun içeriğindeki % 1 NaCl konsantrasyonunda en yüksek lipaz aktivitesi saptanmıştır.



Şekil 7. Saflaştırılmış enzim üzerine % 0-15 NaCl konsantrasyonunun etkisi

3.4.2 Metal İyonlarının, Deterjanların ve Organik Çözücülerin Enzim Üzerine Etkisi

Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} gibi metallerin ve EDTA'nın 0.1 ve 5.0 mM konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde 5 mM Mg^{2+} iyonlarının aktiviteyi %120 arttırdığı, bunu Ca^{2+} , Mn^{2+} nin takip ettiği, Fe^{3+} 5 mM da çok az bir aktivite kaybı olduğu görülmüştür. 0.1 mM konsantrasyonda hazırlanmış metal iyonlarının ise aynı etki sırasını izlemektedir.

Tablo 3. Metal iyonlarının ve EDTA'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Metal iyonları	Göreceli aktivite (%)	
	0.1 mM	nM
Kontrol	100	100
Ca^{2+}	108.46	119.08
Zn^{2+}	12.23	11.99
Mg^{2+}	113.03	120.04
Mn^{2+}	110.2	114.8
Fe^{3+}	89.23	99.23
EDTA	110.00	30.43

Tween 20, Tween 40, Triton X-100, polietilen glikol (PEG) ve SDS yüzey aktif maddelerin 20 mM Tris-HCl tamponundaki %1 h/h'lik derişimlerinin ve n-hekzan, metanol, aseton and dimetil sülfoksid (DMSO) gibi organik çözücülerinin 20 mM Tris-HCl tamponundaki %10 v/v derişimlerinin enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde Tablo 3 den de görüldüğü gibi SDS nin aktiviteyi tamamen ortadan kaldırdığı, Tween20 ve Tween40 gibi yüzey aktif maddelerinin aktiviteyi oldukça

düşürdüğünü, PEG'in aktiviteyi fazla düşürmediği, Triton X100'ün ise diğer yüzey aktif maddelere göre aktiviteyi nispeten daha az azalttığı gözlemlenmiştir.

Tablo 4. Yüzey aktif maddelerin ve organik çözücülerin saflaştırılmış lipaz aktivitesine etkisi

Sıra No		% Göreceli aktivite
	Yüzey aktif maddeler	
1	Kontrol	100.00
2	Tween ₂₀	34.62
3	Tween ₄₀	36.15
4	Triton X 100	62.30
5	SDS	0
6	PEG	86.92
	Organik çözücüler	
1	Kontrol	100
2	DMSO	94.61
3	Aseton	17.69
4	Metanol	80
5	n-Hekzan	36.92

Organik çözücülerin etkisine bakıldığında ise DMSO'nun çok az aktivite kaybına neden olduğu diğer çözücülerin ise metanol dışında oldukça fazla aktivite kaybına sebep olduğu saptanmıştır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Zeytinyağının substrat olarak kullanıldığı lipolitik aktivite çalışmalarında tüm suşların kantitatif olarak lipolitik aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmalarda gördüğümüz Gum Arabik'in emülsiyon yapma özelliğinden faydalanılarak lipaz aktivitesinin arttırılabileceği düşüncesi ile %0.5'lik (ağırlık/hacim) gum arabik ile hazırlanan %1'lik Tween 80- emülsiyonlarının lipaz aktivitesini arttırıcı etkisini saptamadık. En yüksek kantitatif lipaz aktivitesini *B. safensis*'in göstermesine rağmen tüm suşlar lipolitik aktivite göstermektedir. Şekil 1 den de görüldüğü gibi kültür ortamında en yüksek lipolitik aktiviteye 96 saatin sonunda ulaşılabilir. Optimal süre olan 96 saatin ardından 120 saatin sonunda aktivite hızla düşmektedir. Yapılan pek çok çalışmada optimal lipaz üretimi için farklı inkübasyon süreleri denenmiştir. Bulduğumuz sonuçlar Sangeetha ve arkadaşlarının (2008) *B. pumilus* SG2 için bulduğu 63 saatlik ve Duza ve arkadaşlarının (2014) bulduğu 96 saatlik inkübasyon süreleri ile uyusmaktadır (Duza ve diğ. 2014). Grafik incelendiğinde lipaz aktivitesindeki 72-96 saatler arasındaki artışın, 24-48 saatler arasındaki artış kadar yüksek olmadığı gözlemlenmiştir. Lipaz üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisi incelendiğinde bitkisel yağların ve zeytinyağı fabrikası atıklarının tüm test suşları tarafından kullanıldığını ve lipaz üretimi yaptığını saptadık. Yağlar arasında en çok etkili olan fındık yağının uzun ve doymamış yağ asitlerine sahip olduğu ve kompozisyonunda % 45.0 - 79.0, tek doymamışlı yağ asidi olan oleik asidin bulunduğu bildirilmiştir (Maguire, 2004). Yapılan çalışmalarda çok uzun veya çok kısa yağ asitleri kompozisyonuna sahip olan yağların iyi substratlar olmadığı öne sürülmüştür. Takaç ve Marul (2008), yaptıkları çalışmada zeytinyağında oleik asit miktarının %73.3, linoleik asitçe zengin olan linoleik asit içerik yüzdeleri sırasıyla ayçiçek yağında; %63.335, mısır yağında; %56.777 susam yağında; %53.032 ve soya yağında % 51.208 olarak bildirmişlerdir. Tüm bu sayılan yağların %1'lik konsantrasyonlarının, *B. subtilis*'in lipolitik aktivitesi üzerindeki etkisini incelemiş ve en yüksek lipaz aktivitesinin %1 susam yağı ile sağlandığını saptamışlardır. %1'i aşan yağ konsantrasyonlarının aktiviteyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Bu düşüşün nedeni olarak substrat inhibisyonu veya karışmanın yetersiz olması verilebilir (Takaç ve Marul, 2008). Üretim maliyetini düşürmek amacıyla ucuz ve bol miktarda bulunan atıklar substrat olarak denenmektedir. Tarımsal atıklar pahalı substratların yerine kullanılabilir ve pek çok mikroorganizma bu atıkları kullanabilir. *Bacillus* türleri tarafından pek çok

tarımsal atığın substrat olarak kullanıldığına dair bir çok yayın bulunmaktadır (Salihu ve ark., 2012). Yağ fabrikası atığı olan yağlı tohum ekstraksiyon artıkları ve diğer yağlı fabrika atıkları en çok kullanılan atık maddelerdir. Zeytinyağı ve palmiye yağı fabrikalarının atık yağlı suları lipaz üretiminde önemli bir substrat olarak kullanım potansiyeli olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Brozzoli ve ark., 2009; Salihu ve ark., 2011; D'Annibale, 2006). *C.cylindracea*'nın palmiye yağı fabrika atıklarını en iyi şekilde kullanabildiğini göstermişler ve 9.23 U/ml gibi yüksek lipaz aktivitesi değerlerine ulaşmışlardır. Brozzoli ve arkadaşları (2009) laboratuvar tipi bir reaktör ile zeytinyağı atıklarını substrat olarak kullandıklarında ZÜY için 20.4 U/ml gibi yüksek lipaz aktivitesi saptamışlardır. Bizim bulgularımıza göre ZÜY ile yaptığımız denemelerde çok iyi sonuç alamadık, kullandığımız test suşları ZÜY'u substrat olarak kullanabilmelerine rağmen çok yüksek lipaz aktivitesi vermemişlerdir. Yine yağ, yağdan sabun ve biyodizel üretimi sırasında yan ürün olarak bol miktarda ortaya çıkan gliserolün çok az bir kısmı kullanılabilir. Üretim sırasında açığa çıkan gliserolün çok az bir kısmı farmosotik olarak kullanım alanı bulmakta, büyük çoğunluğu atılmaktadır. Atık gliserolün lipaz üretiminde kullanımı denenmiştir (Volpato ve ark., 2008). Gliserol besi yerlerinde substrat olarak kullanıldığında hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını sağlayabilmekte, daha az substrat kullanarak enzim üretimini başlatabilmektedir. Gliserolün besi yerinde bulunması ile lipaz üretimi uyarılmaktadır. Zeytinyağı işlenmesi sırasında açığa çıkan gliserol, içeriğinde bir miktar tri, di ve monogliseridler kalabilir. Gliserid kalıntıları şiral alkol grupları içerdiğinden sekonder alkol gruplar, primer alkol gruplarına göre daha kolaylıkla tarnsforme olabilmektedir (Lin ve ark., 2006). Gupta ve arkadaşları (2004), *Bacillus* türleri ile yaptıkları lipaz üretim çalışmasında besiyerinde kullandıkları gliserolün yağ çözünürlüğünü etkilediği veya hücre geçirgenliğini arttırarak enzim üretimini arttırdığını ileri sürmüşlerdir.

Tablo 1 'den de görüldüğü gibi *Bacillus safensis* izolatının ekstra selüler lipazı 2 basamakta başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. Enzim %60 amonyum sülfat doygunluğunda %45 verim ile 4.74 kez saflaştırıldı. Amonyum sülfat çöktürmesini takiben yapılan ultrafiltrasyon ve DEAE selüloz kromatografisi ile yapılan saflaştırma sonunda, enzim 33.38 kez, %8.86 verimle saflaştırılmıştır. 2. saflaştırma basamağının ardından enzim oldukça belirgin bir aktivite kaybına uğramış dolayısı ile 3. saflaştırma basamağına gidilememiştir. Ananthi ve arkadaşları (2014) *Bacillus cereus* suşu

kullanarak yaptıkları saflaştırma çalışmasında DEAE selüloz kromatografisi ile % 51 lik saflaştırma verimine ulaşırken, Tamilarasan ve Kumar (2012) *Bacillus sphaericus* MTCC 7542 ile yaptıkları lipaz saflaştırma çalışmasında bizim çalışmamıza benzer şekilde amonyum sülfat çöktürmesini takiben DEAE sepharoz kromatografisi kullanarak 2 basamaklı saflaştırma sonucunda 17 kat saflaştırma ve 377.69 U/mg spesifik aktivite saptamışlardır. Ma ve arkadaşları (2006) amonyum sülfatla çöktürme, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografilerinin kullanıldığı 3 basamaklı kromatografi işlemi ile *B. subtilis*'den lipazı 19.7 kat ve %30 verimle saflaştırabilmişlerdir. Biz çalışmamızda enzim aktivitesi oldukça düştüğünden daha ileri saflaştırma işlemleri uygulayamadık.

SDS-PAGE ile yapılan saflık kontrolünde moleküler kütlenin 59 kDa olduğu ve zimogram analizi ile de bu bandın lipaz aktivitesi gösterdiği kahve-sarı renkli bandın varlığı ile anlaşılmıştır. *Bacillus* cinslerinin de dahil bir çok bakteri türünden saflaştırılan lipazların molekül ağırlıkları 11 ila 76 kDa arasında değişmektedir. *Bacillus thermoleovorans* CCR11 ve *Bacillus thermoleovorans* ID-1, 11 ve 18 kDa ile şimdiye kadar rapor edilmiş en küçük lipazlardır (Balaji ve Jayaraman, 2014). Tamilarasan ve arkadaşları (2012) *Bacillus sphaericus* MTCC7542 den saflaştırdıkları lipazın SDS-PAGE ile tek bant verdiğini ve molekül ağırlığının 69 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Hasan ve arkadaşlarının (2007) *Bacillus sp.* FH5'den saflaştırdıkları lipaz SDS-PAGE ile büyük (63kDa) ve küçük (24 kDa) olmak üzere 2 protein bandı vermiştir. Masedah ve arkadaşlarının (2012) *B. stearrowthermophilus*'den izole ettikleri lipaz 20 ve 45 kDa molekül ağırlığına sahiptir. *Bacillus cereus* AGP-03 den elde edilen lipaz SDS-PAGE ile 25 ve 16 kDa'lık iki bant vermiştir (Ghati ve Paul, 2015).

Saflaştırılan enzimin aktivitesi pH 7-10 arasında karalılığını korurken, pH 8.0 de en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Şekil 5. A). Enzim, yüksek pH değerlerinde bile aktivitesinin % 70 ini korumuştur. Benzer şekilde, Tamilarasan ve ark., 2102 *Bacillus sphaericus* lipazının pH 6.0-9.0 arasında aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Bizim bulgularımıza benzer şekilde aktivite pH 6.0'ın altında ve pH 8.0'ın üstünde belirgin olarak düşmektedir. Bizim çalışmamızda pH 9.0 da bile saflaştırdığımız enzim aktivitesini kaybetmemiştir. Benzer sonuçları Massadeh ve arkadaşları (2012), Kim ve arkadaşları (1998), Shu (2006), Nawani ve arkadaşları (1998), Nawani ve Kaur (2000) tarafından da elde etmişlerdir. Alkalın lipazlar potansiyel uygulamalarının çokluğundan

dolayı biyoteknolojide oldukça rağbet görmektedir. Farklı tuz konsantrasyonlarında optimal aktivite gösterebilen lipazlar örneğin, deri sanayi gibi yüksek tuz konsantrasyonunda çalışan endüstriler için tuza dayanıklı lipaz enzimi çok önemli hale gelmiştir.

Enzimin pH kararlılığının yanı sıra termal kararlılığı da (Şekil 5. B) oldukça yüksektir. En yüksek termal kararlılığa 30°C civarında rastlanırken ve aktivite 10°C ve 70°C gibi ekstrem sıcaklıklarda önemli ölçüde düşmediği gözlenmiştir. *Bacillus* türlerinden izole edilen termokararlı lipazlar ile ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalarda da bizim bulgularımıza benzer şekilde yüksek termo kararlılık gözlenmiştir (Balaji ve Jayaraman, 2014; Kumar ve ark., 2005).

Saflaştırılmış enzim % 0-15 aralığında hazırlanmış NaCl konsantrasyonu içeren enzim reaktifinin içerisinde 37°C de 1 saat bekletildiğinde, Şekil 6. da görüldüğü gibi enzim tamponunun içeriğindeki % 1 NaCl bulunduğu zaman en yüksek lipaz aktivitesi saptanmıştır. Bu bulgu saflaştırdığımız lipazın tuza toleransının olduğunu belirtisidir. Tuz konsantrasyonu arttırdığımız zaman enzim çok hızlı bir şekilde aktivitesini kaybetmektedir. Ghati ve Paul (2015), *Bacillus cereus* suşundan izole ettikleri lipazın %4.5 NaCl varlığında en yüksek aktiviteyi gösterdiğini ve enzimin %4.5-11 NaCl konsantrasyonunda aktivitesini oldukça iyi koruduğunu göstermişlerdir (Ghati ve Paul, 2015). Benzer şekilde *Bacillus* dışındaki halofillerden elde edilen lipazların oldukça tuza toleranslı olduğu çok sayıda yayında bildirilmiştir (Sarkar ve ark., 2012; Kanjanavas ve ark., 2010; Ameri ve ark., 2015).

Saflaştırdığımız enzim üzerine metal iyonlarının etkisini incelediğimizde Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} gibi metallerin ve EDTA'nın 0.1 ve 5.0 mM konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde 5 mM Mg^{2+} iyonlarının aktiviteyi %120 arttırdığı, bunu Ca^{2+} , Mn^{2+} nin takip ettiği, Fe^{3+} 5 mM da çok az bir aktivite kaybı olduğu görülmüştür. 0.1 mM konsantrasyonda hazırlanmış metal iyonlarının ise aynı etki sırasını izlemektedir. 5 mm konsantrasyona göre 0.1 mM benzer şekilde etki göstermiş çok az farkla daha az etkin olduğu görülmüştür. Zn^{2+} diğer metal iyonlarının tersine enzim aktivitesini her iki konsantrasyonda da oldukça azaltmıştır. Zn^{2+} iyonlarının benzer şekilde aktiviteyi düşürdüğü ve bulgularımıza benzer şekilde %10-30 kadar aktivitede kayıplara yol açtığı gözlenmiştir. Balaji ve arkadaşları (2014) çalışmalarında da gösterildiği gibi 1 ve 5 mM Mn^{2+} ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları enzim

aktivitesini arttırmıştır. Fe^{+2} ve Zn^{+2} gibi ağır metallerin aktiviteyi azalttığını bu gruptaki araştırmacılar da göstermiştir. Ameri ve arkadaşları (2015) ise Zn^{+2} iyonları için bizimkine benzer belirgin bir düşüş kaydetmemişlerdir (Ameri ve ark., 2015). EDTA etkisi incelendiğinde EDTA'nın 0.1 mM lık konsantrasyonu aktivitede artışa neden olurken 5 mM lık EDTA aktiviteyi oldukça azaltmıştır. Ameri ve arkadaşları (2015) 2.5 mM'lık EDTA ile %75.6, Tamilarasan ve Kumar (2012) ise 1 mM EDTA ile %79.05 azalma kaydetmişlerdir. Tamilarasan ve Kumar (2012), 5 mM lık EDTA ile bizim bulgularımıza benzer şekilde belirgin bir aktivite kaybı bildirmişlerdir (Tamilarasan ve Kumar, 2012; Ameri ve ark., 2015).

Yüzey aktif maddeler ve yüzey aktif maddeler arasında beklendiği gibi kuvvetli bir denatrasyon ajanı olan SDS çok etkin şekilde aktiviteyi sıfıra indirmektedir. Tween20 ve Tween40 belirgin bir düşüşe sebep olurken Triton X 100 nispeten daha az bir düşüşe sebep olmuştur. Benzer şekilde düşüşleri Tamilarasan ve Kumar (2012), Ameri ve arkadaşları da (2015) kaydetmiştir. PEG için bizim çalışmamızda aktivitede az bir düşüş kaydedilirken, Ghati ve Paul (2015), PEG için bizim bulgularımıza benzer şekilde aktivitede çok az bir azalma kaydetmişlerdir.

Bilindiği gibi endüstriyel enzim reaksiyonlarının çoğunluğu organik çözücülerin varlığında gerçekleşmektedir. Organik ortamlarda yapılan biyotransformasyon reaksiyonları sulu ortam enzim reaksiyonlarının yerini almaya başlamıştır. Organik çözücülerin saflaştırdığımız enzimin aktivite ve kararlılıkları üzerine etkileri incelendiğinde % 10 (h/h) DMSO ve metanol gibi hidrofilik çözücülerin önemli bir aktivite kaybına sebep olmadığını ve aseton hidrofilik olmasına rağmen beklendiği gibi enzim ile hidrojen bağlarını bağlamak için yarıştığından denatürasyona sebep olmuş ve oldukça önemli aktivite kaybına sebep olmuştur. Hidrofobik olan n-hekzan ile de beklendiği şekilde oldukça önemli aktivite kaybı görülmüştür. Balaji ve arkadaşları (2014) da %25 ve %50 aseton konsantrasyonunda 15 dakika inkübasyon sonucunda benzer sonuçlar almışlardır. Inkübasyon süresinin bizim çalışmamıza göre kısa tutulması inhibisyon etkisinin daha az görülmesine neden olabilir (Balaji ve ark., 2014). Tamilarasan ve Kumar (2012) %30 (h/h) organik çözücüler ile 1 saatlik inkübasyon sonucunda ticari enzim olan *Candida rugosa*' ya göre *Bacillus sphaericus*'dan saflaştırılan lipazın daha dayanıklı olduğunu saptamışlardır.

SONUÇ: Elde ettiğimiz sonuçlara göre, tüm çalıştığımız *Bacillus* suşlarının lipaz üretimi kantitatif ölçüm metodlarıyla saptanmıştır. Suşlar arasında *Bacillus safensis* lipaz üretimi için potansiyel bir suştur ve elde edilen lipazın bazik şartlarda ve yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmediği, organik çözücülere ve metallerin etkilerine dayanıklı olduğu ve biyoteknolojik uygulamalar için kullanıma uygun olabileceği saptanmıştır.



5. KAYNAKLAR

- Abe, F., Horikoshi, K. (2001) The biotechnological potential of piezophiles. Trends in Biotechnology, 19, 102–108.
- Adrio, J.L., Demain, A.L. (2014) Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. Biomolecules, 4, 117-139.
- Ameri, A., Shakibaie, M., Amirpour-Rostami, S., Ameri, A., Adeli-Sardou, M., Khazaeli, P., Rahmani, H., Forootanfar, H. (2015) Partial purification and characterization of a thermoalkalophilic lipase originated from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 and its application for ester synthesis. Biotechnology, 14(4), 154-164.
- Amin, F., Bhatti, H. N., Rehman, S. (2011) Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. African Journal of Biotechnology, 10(28), 5514-5523.
- Amin, M., Bhatti, H.N., Zuber, M., Bhatti, A., Asgher, M. (2014) Potential use of agricultural wastes for the production of lipase by *aspergillus melleus* under solid state fermentation. The journal of animal & plant sciences, 24(5), 1430-1437.
- Ananthi, S., Ramasubburayan, R., Palavesam, A., Immanuel, G., Optimization and purification of Lipase through solid state fermentation by *Bacillus cereus* msu as isolated from the gut of a marine fish *sardinella longiceps*, international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, vol 6, issue 5, 2014, int j pharm pharm sci, vol 6, issue 5, 291-298
- Andualema, B., Gessesse, A. (2012) Microbial lipases and their industrial applications. Biotechnology, 11(3), 100-118.
- Aouf, C., Durand, E., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.C., Dubreucq, E., Fulcranda, H., Villeneuve, P. (2014) The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. Green Chemistry, (16), 1740-1754.
- Arahal, D. R., Ventosa, A. (2006) The family *Halomonadaceae*, The prokaryotes: A handbook of the Biology of Bacteria, 3rd Edition, Dworkin, M., Fallow, S., Rosenberg, E., Scheifer, K.H., Stackebrandt, L. Editors.; Springer, New York, USA.
- Balaji, L., Jayaraman, G. (2014) Metal ion activated lipase from halotolerant *Bacillus* sp. VITL8 displays broader operational range. International Journal of Biological Macromolecules, 67, 380–386.
- Barriuso, J., Vaquero, M.E., Prieto, A., Martínez, M.J. (2016) Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. Biotechnology Advances, 34(5), 874–885.
- Bassegoda, A., Cesarini, S., Diaz, P. (2012) Lipase improvement: goals and strategies. 2(3), 1-8.

- Benjamin, S., Pandey, A. (1998) *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14, 1069-1087.
- Benjamin, S., Pandey, A. (2001) Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44 (2), 213 – 221.
- Benjamin, S., Pandey, A. (1998) *Candida rugosa* Lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14, 1069–1087.
- Boone, D.R., Whitman, W.B., Koga, Y. (2001) Order III. Methanosarcinales ord. nov. In: Boone D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M., (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Springer, New York, 287–289.
- 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*, 2012, 30-42
- Bowersock, T.L., Park, K., Kosswig, K. (1997) Vaccines and Other Immunological Products, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 1st Edition., Swarbrick, J., Boylan, J.C. Editors.; Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 76, 248-254.
- Breed, R.S., Murray, M.G.D, Smith, N.R. (1974) *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Edition., Bailliere, Tindal and Cox, London, UK.
- Brozzoli, V.S., Sampedro, C.I., Federici F., D'Annibale, A., Petruccioli, M. (2009) Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresource Technology*, 100, 3395–3402.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409, 258-268.
- Carrasco-López, C., Godoy, C., Rivas, B.D.L., Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., Martínez-Ripoll, M., Hermoso, J.A. (2009) Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 4365–72.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., Marty, A. (2012) Lipases: an overview. *Methods in Molecular Biology*, 861, 3–30.
- Cavalier-Smith, T. (2002) The neomuran origin of archaeobacteria, the eubacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 7–76.
- Chauhan, B. (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 381–395.

- Cheetham, P.S.J. (1995) Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. In: Wiseman A, Editor. Handbook of Enzyme Biotechnology.: Ellis Horwood Ltd. Kent, UK.
- Chopade, B. (2009). Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *streptomyces* sp. D1, Journal of Molecular Catalysis, B: Enzyme, 58, 17–23.
- Chopade, B., Zhang, L., Kokare, C. (2011). Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *saccharopolyspora* sp. A9, Journal of Molecular Catalysis. B: Enzyme, 68, 52-58.
- D'Annibale, A., Sermanni, G.G., Federici, F., Petruccioli, M. (2006) Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. Bioresource Technology, 97, 828–833.
- De Clerck, E., De Vos, P. (2004) Genotypic diversity among bacillus licheniformis strains from various sources. FEMS Microbiology Letters, 231, 91-98.
- Demirjian, D.C., Morís-Varas, F. (2001) Enzymes from extremophiles. Current Opinion in Chemical Biology, 5(2), 144-151.
- Derewenda, U., Swenson, L., Wei, Y., Green, R., Kobos, P.M, Joerger, R., Haas, M.J, Derewenda, Z.S. (1994) Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil–water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. Journal of Lipid Research, 35, 524–534.
- Devi, A.S., Devi, K.C., Rajendiran, R. (2012) International Journal of Biological, Optimization of lipase production using *Bacillus subtilis* by response surface methodology. Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 6(9), 840-845.
- Douglas C, Achatz A, Boeck A. (1980) Electrophoretic characterization of ribosomal proteins from metanogenic bacteria. Zentralblatt für Bakteriologie I. Abt. Originale C, 1(1), 1-11
- Duza, M.B., Mastan, S. (2014) Optimization of lipase production from *Bacillus thuringiensis* (TS11BP), *Achromobacter xylosoxidans* J2 (TS2MCN)–Isolated from soil sediments near oilseed farm. Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 9(2), 66-76.
- Egorova, K., Antranikian, G. (2005) Industrial relevance of thermophilic archaea. Current Opinion in Microbiology, 8, 649–655.
- Ereemeev, N.L., Zaitse, S.Y. (2016) Porcine pancreatic lipase as a catalyst in organic synthesis. Mini-Reviews in Organic Chemistry, 13(1), 78-85.
- Gatson, J.W., Benz, B.F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., Hart, M.E. (2006) *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican Shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1475-1484.

- Gilbert, E.J, Drozd, J.W, Jones, C.W (1991a) Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa*. EF2. J Gen Microbiol 137, 2215–2221
- Ghasemi, Y., Rasoul- Amini, S., Kazemi, A., Zarrini, G., Morowvat, MH, Kargar M. (2011) Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. Microbiology, 80(4), 483–487.
- Ghati, A., Paul, G. (2015) Purification and characterization of a thermo-halophilic, alkali-stable and extremely benzene tolerant esterase from a thermo-halo tolerant *Bacillus cereus* strain AGP-03, isolated from ‘Bakreshwar’ hot spring, India. Process Biochemistry, 50, 771–781.
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, W.S. (1996) Microbial lipases: production and applications. Sci Prog 79, 119–157
- Gibbons, N.E. (1969) Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. In: Norris, J.R.,;Ribbons, D.W., Editor.; Methods in Microbiology, 3(B), Academic Press, New York, US.
- Gouda, M.K. (2006) Optimization and purification of alkaline proteases produced by marine *Bacillus* sp. MIG Newly Isolated from Eastern Harbour of Alexandria, Polish Journal of Microbiology, 55, 119–126.
- Grant, W.D., Kamekura, M., McGenity, T.J., Ventosa, A. (2015) *Halobacteriales* Euryarchaeota, Halobacteria, Halobacteriales. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., New-York.
- Gupta, R., Kumari, .A., Syal, P., Singh, Y. (2015) Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. Progress in Lipid Research, 57, 40–54.
- Gupta, R. Gupta, N., Rathi, P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, Appl Microbiol Biotechnol, 64, 763–781 DOI 10.1007/s00253-004-1568-8
- Gupta, N., Mehra, G., Gupta, R. A. (2004) Glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett–Burman design and by response surface methodology. Canadian Journal of Microbiology, 50, 361–368.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and MicrobialTechnology, 39(2), 235–251.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2007) Purification and characterization of a mesophilic lipase from *Bacillus subtilis* FH5 stable at high temperature and pH. Acta Biologica Hungarica, 58(1), 115-32.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. Biotechnology Advances, 27, 782–798.

- Hayashi, R. (1996). Use of High Pressure in Bioscience and Biotechnology. In: High Pressure Bioscience and Biotechnology,; R. Hayashi, C. Balny,; Editors.; Elsevier, London, UK.
- Hung, K.S., Liu, S.M., Tzou, W.S., Lin, F.P., Pan, C.L., Fang, T.Y., Sun, K.H., Tang, S.J. (2011) Characterization of a Novel GH10 Thermostable, Halophilic Xylanase from the Marine Bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. Process Biochemistry. 46, 1257–1263.
- Hult, K., Berglund, P. (2007) Enzyme promiscuity: mechanism and applications. Trends in Biotechnology, 25, 231–238.
- Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 13(4), 90–97.
- Jaeger, K.E., Ransac S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Heuvel, M.van, Misset, O (1994) Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev 15, 29–63
- Jeon, J.H., Kim, J.T., Kim, Y.J., Kim, H.K., Lee, H.S., Kang, S.G., Kim, S.J., Lee, J.H. (2009) Cloning and Characterization of a New Cold-Active Lipase from a Deep-Sea Sediment Metagenome. Applied Microbiology and Biotechnology. 81, 865–874.
- Kademi, H.A., Leblanc, D. (2004) Lipases and their industrial applications: An overview. Applied Biochemistry and Biotechnology-Part A Enzyme Engineering and Biotechnology, v 118(1–3), 155–170.
- Kamekura, M. (1986) Production and function of enzymes of eubacterial halophiles. FEMS Microbiology Letters, 39(1-2), 145-150.
- Kanjanavas, P., Khuchareontaworn, S., Khawsak, P., Pakpitcharoen, A., Pothivejkul, K., Santiwatanakul, S., Matsui, K., Kajiwarra, T., Chansiri, K. (2010) Purification and characterization of organic solvent and detergent tolerant lipase from thermotolerant *Bacillus* sp.RN2. International Journal of Molecular Sciences, 11, 3783-3792.
- Kapoor, M., Gupta, N. (2012) Lipase promiscuity and its biochemical applications. Process Biochemistry, 47, 555–569.
- Kim, M.H., Kim, H.K., Lee, J.K., Park, S.Y., Oh, T.K. (2000). Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus* high level production, purification and calcium dependent thermo stability. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 64, 280-286.
- Kothari, V.V., Kothari, R.K., Kothari, C.R., Bhatt, V D., Nathani, N.M., Koringa, P.G., Joshi, C.G., Vyas, B.R.M. (2013) Genome Announcements, 1(5), 1-13.
- Kumar, C.G., Joo, H.S., Koo, Y.M., Paik, S.R., Chang, C.S. (2004) Thermostable Alkaline Protease from a Novel Marine Haloalkalophilic *Bacillus clausii* Isolate. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 351–357.
- Kumar, D., Parshadb, R., Gupta, V.K. (2014) Application of a statistically enhanced, novel, organic solvent stable lipase from *Bacillus safensis* DVL-43. International Journal of Biological Macromolecules, 66, 97–107.

- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., Gupta, R. (2005) Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41, 38–44.
- Kushner, D.J., Kamekura, M. (1998) *Physiology of Halophilic Eubacteria*, Halophilic Bacteria, 1st Edition, Rodriguez-Valera, F. Editor.; CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kushner, D.J., Kamekura, M. (1988) *Physiology of Halophilic Eubacteria*. In: *Halophilic Bacteria*, Valera, F.R., Editor.; CRC Press, Boca Raton, US.
- Kushner, D.J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: Halophilic Bacteria. In Kushner D.J.; Editor, *Microbial Life in Extreme Environment*, Academic Press Inc., London
- Lanyi, J.K. (1974) Salt dependent properties from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 38(3), 272-290.
- Larsen, H. (1967) Biochemical aspects of extreme halophilism. *Advances in Microbial Physiology*, 1, 97-132.
- Larsen, H. (1973) The Halobacteria's confusion to biology, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 39(3), 383-396.
- Lee, L.P., Karbul, H.M., Citartan, M., Gopinath, S.C.B., Lakshmi priya, T., Tang, T.H. (2015) Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: Promising strains to alleviate oil pollution. *BioMed Research International*, 1-9.
- Lin, E.S., Wang, C.C., Sung, S.C. (2006) Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 98–102.
- Ma, J., Zhang, Z., Wang, B., Kong, X., Wang, Y., Cao, S., Feng, Y. (2005) Over expression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, 45(1), 22-29.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2005) *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edition, Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Maguire, L.S., O'Sullivan, S.M., Galvin, K., O'Connor T.P., O'Brien N.M. (2004) Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(3), 171-178.
- Massadeh, M., Sabra, F., Dajani, R., Arafat (2012) A Purification of Lipase Enzyme Produced by *Bacillus Stearotherophilus* HU1. *International Conference on Eco-systems and Biological Sciences (ICEBS'2012)* Penang (Malaysia) May 19-20.
- Mathews, C., van Holde, K. (1990) Isolation and purification of proteins. *Biochemistry Benjamin/Cummings*, redwood City, CA, pp.156-161.

- Mohr, V., Larsen, H. (1963) On the structural transformations and lysis of *Halobacterium salinarum* in hypotonic and isotonic solutions. *Journal of General Microbiology*, 31, 267-280.
- Nawani, N., Dosanjh, N.S., Kaur, J. (1998) A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, 20(10), 997-1000.
- Nawani, N., Kaur, J. (2000) Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and cellular Biochemistry*, 206(1), 91-96.
- Niyonzima, F.N., More, S.S. (2014) Concomitant production of detergent compatible enzymes by *Bacillus flexus* XJU-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 903-910.
- Ogan, A., Demir, S., Danış, Ö., Yüce Dursun, B. (2014) Biyokimyasal Yöntemler 1. Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Y.Lisans ders notları.
- Özcan, B., Çökmüş, C., Çöleri, A., Çalışkan, M. (2006) Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. *Microbiology*, 75, 739–746.
- Özcan, B., Özcengiz, G., Çöleri, A., Çökmüş, C. (2007) Diversity of halophilic archaea from six distinct parts of Turkey. *J Microbiol Biotechnol* 17, 985–992.
- Ören, A. (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(2), 1-13.
- Ören, A. (2011) *Halophilic World of Laurens Beas., Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*, 1st Edition, Ventosa, A., Ören, A., Ma, Y. Editors; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Ornstein, L., Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis-1 background and theory. *Acad, Ann. N.Y. Sci.*, 121, 321–349.
- Pandey, A., Benjamin, S.C., Soccol, R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29(2), 119–131.
- Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R. (2001) A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem*, 37, 187–192
- Ratnaparkhe, A., Tiwari, A. (2011) Bio-prospecting approach for biocatalysts from Extremophiles. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 1-17.
- Ray, A. (2012) Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology*, 2(2), 33-37.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, Kalia, V.C. (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87, 137–146.

- Rothstein, D., Devlin, P., Cate, R. (1986) Expression of alpha-amylase in *Bacillus Licheniformis*. Journal of Bacteriology, 168(2),839-842.
- Saito, N. (1973) A thermophilic extracellular a-amylase from *Bacillus licheniformis*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 155(2), 290-298.
- Salihu, A., Alam, M.Z. (2015) Solvent tolerant lipases: A review. Process Biochemistry, 50, 86–96.
- Salihu, A., Alam, Z., Karim, M.A., Salleh, H.M. (2011) Suitability of using palm oil mill effluent as a medium for lipase production. African Journal of Biotechnology, 10(11), 2044-2052.
- Sathishkumar, R., Ananthan, G., Iyappan, K., Stalin, C. (2015) A statistical approach for optimization of alkaline lipase production by ascidian associated-*Halobacillus trueperi* RSK CAS9. Biotechnology Reports, 8, 64-71.
- Satomi, M., La Duc, M.T., Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(8), 1735–1740.
- Saxena, R.K. Ghosh, P.K., Gupta, R., Dvidson, W.S., Bradoo, S., Gulati, R. (1999) Microbial lipases, potential biocatalysts for the future industry. Current Science, 77, 101-115.
- Shakraborty, S., Khopade, A., Mahadik, K., Chopade, B. (2009). Isolation and Characterization of Novel α -Amylase from Marine *Streptomyces* sp. D1. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58, 1-4, 17-23.
- Sharma, S., Kanwar, S.S. (2014) Organic solvent tolerant lipases and applications. The Scientific World Journal, 1-16.
- Sharma R, Soni, S.K., Vohra, R.M., Jolly, R.S., Gupta, L.K., Gupta, J.K. (2002) Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. Ind J Microbiol, 42, 49–54
- Shu, C.H., Xu, C.J., Lin, G.C. (2006) Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. Process Biochemistry, 41(3), 734–738.
- Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P., Visessanguan, W. (2010) *Bacillus siamensis* sp. Nov., isolated from salted crab (pookhem) in Thailand. International jJournal of Systematic and Evolutionary Microbiolgy, 60, 2364-2370.
- Svendsen, A. (2000) "Lipase protein engineering" Biochimica Biophysica Acta, 1543 (2), 223–228.
- Takaç, S., Marul, B. (2008) Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 35, 1019–1025.

- Tamilarasan, K., Sarkar, M.D. (2012) Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (1), 309–313.
- Van den Burg, B. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 213–218.
- Ventosa, A. (2006) Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In *Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance*, pp. 223–254. Editors N. A. Logan, H. M. Lappin-Scott & P. C. F. Oyston.: Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. (1995) Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 85-94.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Haas, M.J. (2000) Interfacial activation of lipases. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148
- Volpato, G., Rodrigues, R.C., Heck, J.X., Ayub, M.A.Z. (2008) Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 821–828.
- Yin, J., Chen, J.C., Wu, Q., Chen, G.Q. (2015) Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1433–1442.
- Zhang, J.W., Zeng, R.Y. (2006) Cloning, Expression and Characterization of the Cold Active Lipase (Lip3) from Metagenomic DNA of an Antarctic Deep Sea Sediment. *Progress Biochemistry and Biophysics*, 33, 1207–1214.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Burcu Sinem ŞİMŞEK

Doğum Tarihi: 21. 06. 1989./İstanbul

Eğitim Bilgileri:

Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi – Pedagojik Formasyon (2016)

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Biyokimya - Yüksek lisans (2013-2017)

Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi – Kimya – Lisans (2008-2013)

Poster Bildiri: Screening and characterization of lipase from *Bacillus* Species isolated from salted sheep skins, P-273

Burcu Sinem Şimşek, Pınar Çağlayan, Meral Birbir, Başak Yüce Dursun, Ayşe Ogan

28. Ulusal Kimya Kongresi, Mersin, 2016