



**BAZI SUCUL BÖCEKLERİN SİNDİRİM SİSTEMİNDEN  
İZOLE EDİLEN *Bacillus megaterium*'un LİPAZ ÜRETME  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Fatıma KARAMAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Zooloji Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Ümit İNCEKARA**

**2019**

**Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI SUCUL BÖCEKLERİN SİNDİRİM SİSTEMİNDEN İZOLE  
EDİLEN *Bacillus megaterium*'un LİPAZ ÜRETME  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatıma KARAMAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Zooloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BAZI SUCUL BÖCEKLERİN BAĞIRSAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus megaterium*'un LİPAZ ÜRETME POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Ümit İNCEKARA danışmanlığında, Fatıma KARAMAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 11/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Zooloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ümit İNCEKARA

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Özlem BARIŞ

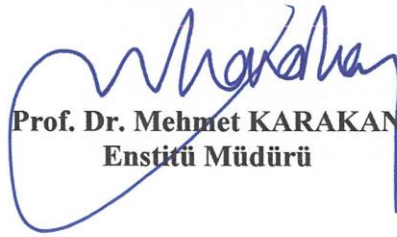
İmza : 

Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 07/03/2019 tarih ve 11/55 nolu kararı ile onaylanmıştır.

  
**Prof. Dr. Mehmet KARAKAN**  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: BAP-2014/184

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **BAZI SUCUL BÖCEKLERİN SİNDİRİM SİSTEMİNDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus megaterium*'un LİPAZ ÜRETME POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatıma KARAMAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Zooloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ümit İNCEKARA

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mevcut çalışmanın amacı, lipaz üreten bakterilerin izolasyon kaynağı olarak sucul böceklerin bağırsaklarının kullanılabilirliğini test etmektir. İzolasyon çalışmaları için, dört sucul böcek *Hydrotus impressopunctatus* (Dytiscidae), *Rhantus suturalis* (Dytiscidae), *Dytiscus circumflexus* (Dytiscidae) ve *Laccobius sulcatulus* (Hydrophilidae) türünün bağırsağı kullanılmış ve izole edilen bakteriler daha sonra aynı kültür koşulları altında lipaz üretme yetenekleri açısından karşılaştırılmıştır. Toplam sekiz bakteri izolatu arasında, F25 izolatının maksimum lipaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolat 16 s rDNA sekans analizine göre *Bacillus megaterium* olarak teşhis edilmiştir. Çalkalamalı erlen kültüründe *Bacillus megaterium* F25 ile lipaz üretimi için 30 °C' lik sıcaklık, pH 6.0, 20 ml/lt atık kızartma yağı konsantrasyonu, 4 ml/lt Tween 80 konsantrasyonu, 3 gr/lt pepton konsantrasyonu ve 48 saatlik inkübasyon periyodu optimal kültür koşulları olarak belirlenmiştir. Optimize edilmiş kültür koşulları altında bu bakteri ile 518 U/lt lipaz üretimi başarılmıştır. Lipaz üreten mikroorganizmaların izolasyonu için sucul böceklerin bağırsak florasının kullanılabilirliği ilk kez bu çalışma ile test edilmiştir.

**2019, 66 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus megaterium* F25, lipaz, izolasyon, sucul böcek, bağırsak

## ABSTRACT

MS. Thesis

### INVESTIGATION OF THE LIPAZ PRODUCTION POTENTIAL OF *Bacillus megaterium* ISOLATED FROM THE DIGESTIVE SYSTEM OF SOME AQUATIC INSECTS

Fatıma KARAMAN

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
Science of Zoology

Supervisor: Prof. Dr. Ümit İNCEKARA

Enzymes used in almost all areas of industry are usually derived from microorganisms. Aim of this study was to test the usability of gut of aquatic insects as isolation source of lipase-producing bacteria. For the isolation studies, the guts of four aquatic insects *Hydrotus impressopunctatus* (Dytiscidae), *Rhantus suturalis* (Dytiscidae), *Dytiscus circumflexus* (Dytiscidae), and *Laccobius sulcatulus* (Hydrophilidae) were used, and the isolated bacteria were then compared in terms of their ability to produce lipases under the same culture conditions. Of total eight bacterial isolates, the isolate F25 isolated from gut of *Rhantus suturalis* was found to show the maximum lipase activity. This isolate was identified as *Bacillus megaterium* according to 16s rDNA sequence analysis. For lipase production by *B. megaterium* F25 in shaking flask culture, temperature of 30°C, initial pH of 6.0, waste frying oil concentration of 20 ml/L, Tween 80 concentration of 4ml/L, peptone concentration of 3 g/L and incubation time of 48 h were determined as the optimal culture conditions. Under the optimal culture conditions, enzyme production of 518 U/L using this bacterium could be achieved. The availability of intestinal flora of aquatic insects for the isolation of lipase-producing microorganisms was first tested in the present study.

**2019, 66 pages**

**Keywords:** *Bacillus megaterium* F25, lipase, isolation, aquatic insects, gut

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca beni her konuda destekleyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ümit İNCEKARA'ya gösterdiği özveri ve hoşgöründen dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bilgi ve görüşlerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Mesut TAŐKIN'a teşekkürü borç bilirim. Yüksek lisans eğitimim boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım tüm yüksek lisans ve doktora öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu süreç boyunca yardımlarından dolayı dostum Zehra YAZICI'ya teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteğiyle daima yanımda olan sevgili aileme yürekten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu süreç boyunca yanımda olup her zaman bana destek olan sevgili eşim Serkan KARAMAN'a çok teşekkür ederim.

**Fatıma KARAMAN**

**Őubat, 2019**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>33</b>
3.1. Böcek Materyalleri .....	33
3.2. Lipaz Üretici Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması .....	34
3.3. İzolatların Taranması.....	35
3.4. F25 İzolatının Moleküler Tanısı.....	35
3.5. F25 İzolatıyla Sıvı Kültürde Lipaz Üretimi .....	36
3.6. Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	37
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>38</b>
4.1. Bakterinin İzolasyonu ve Taranması .....	38
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>47</b>
5.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerinin Dizayn Edilmesi, Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Taranması.....	47
5.2. <i>Bacillus megaterium</i> F25 ile Lipaz Üretimi için Kültür Şartlarının Optimizasyonu .....	50
KAYNAKLAR .....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	67

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µm	: Mikrometre
h	: Saat
Lt	: Litre
ml	: Mililitre
pH	: Power of Hydrogen
rpm	: Dakika/devir
sp.	: Cins
TSA	: Tyrpticase soy agar
TSB	: Tyrpticase soy broth
U/lit	: Unite/Litre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>Hygrotus impressopunctatus</i> (Schaller, 1783).....	33
Şekil 3.2. <i>Rhantus suturalis</i> (W.S. MacLeay, 1825) .....	33
Şekil 3.3. <i>Dytiscus circumflexus</i> (Fabricius, 1801).....	34
Şekil 3.4. <i>Laccobius sulcatulus</i> (Reitter, 1909) .....	34
Şekil 4.1. Lipaz aktiviteli kültürde beyaz renk oluşumu (solda inokule edilmemiş besiyeri, sağda ise 48 saatlik F25 izolatının kültürü) .....	39
Şekil 4.2. Saflaştırılan F25 izolatının TSA'daki görüntüsü .....	40
Şekil 4.3. <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi üzerine kültür pH'sının etkisi.....	41
Şekil 4.4 <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi.....	42
Şekil 4.5. <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi üzerine yağ konsantrasyonunun etkisi .....	43
Şekil 4.6. <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi üzerine pepton konsantrasyonunun etkisi. ....	44
Şekil 4.7. <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi üzerine Tween 80 konsantrasyonunun etkisi. ....	45
Şekil 4.8. <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi ...	46

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması .....	3
Çizelge 1.2. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar .....	10
Çizelge 1.3. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları .....	11
Çizelge 1.4. Yağ ve yağ asitlerinin lipaz üreticisi çeşitli mikroorganizmalardaki etkisi .....	13
Çizelge 4.1. Saflaştırılmış izolatların lipaz aktivitesi bakımından taranması.....	39
Çizelge 4.2. <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi üzerine kültür pH'sının etkisi.....	40
Çizelge 4.3. <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi.....	41
Çizelge 4.4. <i>Bacillus megaterium</i> ile lipaz üretimi yağ konsantrasyonunun etkisi. ....	43
Çizelge 4.5. Lipaz üretimi üzerine pepton miktarının etkisi.....	44
Çizelge 4.6. Lipaz üretimi üzerine Tween 80 konsantrasyonunun etkisi .....	45
Çizelge 4.7. Lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi .....	46

## 1. GİRİŞ

Enzimlerin hayatımızdaki varlığı farkında olamayacağımız ölçüde çok olmuştur. Enzim varlığı, yiyecek, içecek gibi ürünlerin hazırlanması, üretimi, kıyafet temizlemede ve birçok hastalığın teşhis edilmesinde kullanılmaktadır. Protein yapısında olan bu biyolojik katalizörler, biyoteknolojide kullanılan tekniklerin ve aletlerin, biyolojik madde hazırlamada kullanmak için yapılan adaptasyonlardır (Karademir *et al.* 2002). Enzimlerin sıkça kullanılmakta olduğu endüstri alanlarından biri deterjan endüstrisi olmuştur. Mikrobiyal çeşitlilik derinlemesine incelenerek; mikroorganizmalardan ticari olarak daha kullanışlı enzimler üretebilmek için zaman ve üretim adına gerekli maliyetini, performansını ve kalitesini beraber göz önünde bulundurarak dış etkilere kadar bağımlı olmadan değişik pH ve sıcaklıklarda aktivite gösteren enzim üretebilen mikroorganizmaların tanımlanabilmesi ve bu mikroorganizmaların geliştirilmesi oldukça önem arz etmiştir (Oberoi 2001).

Biyokimya tarihinin genelinde enzim araştırmalarıyla karşılaşmak mümkün olmaktadır. Biyolojik açıdan ilk kez kataliz etkisi anlaşılan enzimler 1700'lerin sonunda mide salgısı ile et sindirimi üzerinde yapılmış olan araştırmalarda keşfedilmiş ve daha sonra tükürük salgısı ile birçok bitkinin özütünün, nişastayı glikoz maddesine dönüştürmesi şeklinde çalışmalarla devam ettiği görülmüştür. 1800'lerin sonunda Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentesinin "fermentler" tarafından kataliz edildiği ve bu "fermentlerin" canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılamaz olduğunu savunmuştur. Diğer taraftan maya özütünün glukozu alkole fermente ettiği, bunun yanı sıra hücre dışında işlevli olarak görevini yerine getiren moleküllerle işlevinin sağlandığını ortaya koymuştur. Frederic W. Kühne ise bu yapıları 'enzim' olarak isimlendirmiştir (Nelson 2005).

Metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran protein yapısında biyolojik katalizör madde şeklinde isimlendirilen enzimlerin; besin yapan maddeleri yıktığı, kimyasal enerjiyi depolayabildiği, bu enerjinin şekil olarak değiştirildiği, basit prekürsörlerden biyolojik bakımdan makromoleküller oluşabildiği metabolik

değişimler, birçok reaksiyon basamağını katalizlemektedir. Hücre içinde organik bileşenlerin yapım ve yıkımı, hücre solunumu, kas kasılması, sindirim yapımı şeklindeki önem arz eden çok çeşitli metabolizmanın işlevleri sonucunda olmaktadır. Bu enzimatik reaksiyonların katalizleme işlevi ile mümkündür. Ülkemizde enzim konusunda bilimsel araştırmalar yapan birçok araştırmacı ve çalışma grubu bulunmaktadır. Enzimler alanında bazı araştırmacılar yeni enzimlerin doğal kaynaklardan saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerinde çalışmalar yaparken bazı araştırmacılar da enzimlerin daha etkin üretimi ve kullanımı alanlarında araştırmalarını sürdürmektedir. Enzimler biyokimya alanının en önemli çalışma konularından biri olması nedeniyle özellikle biyokimyacılar tarafından çok çalışılmakta ve günümüzde gıda mühendisliği, tekstil mühendisliği, kimya mühendisliği, biyoloji, kimya, mikrobiyoloji, biyoteknoloji ve biyomühendislik alanlarını kapsayan büyük bir çalışma konusu oluşturmuştur (Celep 2010).

Endüstriyel işlemlerde kullanılan enzimlerin hesaplı, kalite bakımından iyi ürün yapımına fırsat vermektedir. Bugün, mikroorganizma kullanımı, endüstride kullanılan birçok enzimin mikrobiyal kökenli olduğu ve ekonomik anlamda daha düşük maliyetli olduğu için endüstriyel enzim üretiminde artmıştır. Biyoteknolojideki gelişmeler ile birlikte üretimlerinin hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi nedeni ile yönlendirilmiş mutasyonlara kolay ve hızlı cevap vermeleri ve nitelikli enzim üretebilmelerinden dolayı mikroorganizmalar muazzam enzim kaynakları olarak görülmektedir. Stratejik bir alan olarak bakıldığında günümüz döneminde rekombinant DNA teknolojisi ile enzim üretmek geniş alanlara ulaşmakta bu da enzim teknolojisinin oldukça yaygınlaştığını göstermektedir (Aehle 2004).

Enzimler olmasaydı bildiğimiz şekliyle yaşam olanaksız olacaktı. Yürüyen bütün fizyolojik olayların hızlarını düzenleyen biyokatalizörler olarak enzimler, sağlıkta ve hastalıkta merkezi bir yer işgal eder. Katalitik RNA molekülleri içinde yer alan ufak bir grubu dışında enzimlerin birçoğu protein yapısındadır (Murray 1998).

Bütün enzimler katalizledikleri kimyasal reaksiyonlara göre 6'ya ayrılırlar;

**Çizelge 1.1.** Enzimlerin sınıflandırılması (Nelson 2005)

Oksidoredüktaz	İki substrat arasındaki yükseltgenme (oksidasyon) ve indirgenme (redüksiyon) reaksiyonlarını katalizleyen enzimler.
Transferaz	Molekülden H <sup>+</sup> dışında başka grupları aktaran enzimler (C, N ve fosfor taşıyan).
Hidrolaz	Farklı bağların hidrolizini sağlayan enzimler (C-halojenür ya da P-N bağlarına su katılmasıyla).
Liyaz	C-C, C-O, C-N, C-S bağlarını oksidasyon ve hidroliz dışında bir mekanizma ile kıran enzimler.
İzomeraz	Optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizleyen enzimler.
Ligaz	Yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak, S, C, N, O elementleri arasında bağ oluşumu sağlayan enzimler.

Enzimlerin bütünlüğü ve kararlılığı açısından molekül içi kuvvetler arasındaki denge çok önemlidir. Dolayısıyla çevredeki herhangi bir değişiklik enzimin yapısındaki ve kararlılığındaki dengeyi belirleyerek kararlı veya denatüre olmasını sağlar. Denatürasyon veya inaktivasyon şartlarında enzimlerin yapıları değişir ve enzimler inaktif hale gelirler. Fiziksel, kimyasal, biyolojik bozucu bileşiklerin etkisiyle çevre etkili denatürasyonlar oluşur. Enzim aktivitesi;

- pH,
- Sıcaklık,
- Substrat konsantrasyonu,
- Enzim konsantrasyonu,
- Radyasyon,
- Kimyasal bileşenler (alkol, üre, hidrojen peroksit vb.),
- Biyolojik etkenler

gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Schmid 1979; Bailey 1986).

Kimyasal katalizör ile enzim arasındaki en mühim farklılık enzimlerin spesifik yani özgül olmalarıdır. Oluşan sürekli olmayan kompleks neticesinde ürün oluşumu görülür, sonrasında enzim substrat ile yaptığı birleşikten kopar ve yeniden ilk halini alır. Substrat üzerinde enzimin bağlanmayı gerçekleştirdiği aktif (katalitik) bölgedir Enzim ile substrat arasında oluşan bu bağlantı anahtar kilit bağına benzemektedir. Enzimlerin kendileriyle uyumlu sustratlarına iyi bir spesifite göstermeleri sebebiyle kendine özgün ve kendiyile uyum gösteren bir substratla yalnızca bir ürün oluşturmaktadırlar (Chaplin and Bucke 1990).

Enzimlerle kimyasal tepkime veren kimyasal moleküllere substrat denir. Enzimlerin birçoğu ya substratlarına ya da aktivitelerini adlandıran sözcüğe 'az' son eki getirilerek adlandırılır. Lipaz, amilaz, proteaz, arjinaz ve üreaz substratıyla adlandırılan; adenilat siklaz, laktat dehidrojenaz, DNA polimeraz gibi tepkimenin adlandırıldığı enzimlerdir. Enzimlerin hücrelerde ve dokularda derişimi oldukça az miktarlarda olması sebebiyle miktar ölçümü oldukça zordur. Enzimin katalitik aktivitesinin ölçümünü yapmak en iyi ölçme usulüdür. Bu nedenle enzimin derişimi ile miktarı arasında doğru orantı ile meydana gelen ürün miktarı ölçülmesi ile saptanmaktadır. Biyolojik reaksiyonlarda görev alan enzim 'Enzim Ünitesi' denilen bir birim ile ifade edilmektedir. Enzim ünitesi ifadesiyle;1 mikromol bir substratın, belli şartlarda (25°C) değişikliğe uğramasını katalizleyen enzim miktarına 'bir ünite enzim aktivitesi' şeklinde isimlendirilir (Aehle 2004).

Tarihsel gelişim çerçevesinde bakıldığı zaman enzimlerin oldukça değişik kaynaklardan elde edilmiş olduğu görülür. Bitkisel kaynak, hayvansal kaynak ve endüstriyel anlamda ihtiyaçları karşılayan mikrobiyal kaynaklarla elde edilen enzimlerdir (Gupta *et al.* 2003). Endüstrinin her dalında kullanılmakta olan enzimler genelde mikroorganizma canlılarda elde edilir. Bunun sebebi mikroorganizma kaynaklı olan enzimlerin, hayvansal ya da bitkisel kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin oldukça fazla olmaları, stabil ve hesaplı olmaları, istenmeyen yan ürünleri oluşturumuyor olmaları ve çok miktarda elde edilmeleridir (Kıran *et al.* 2006).

Mikrobiyal enzimler, hayvansal ve bitkisel enzimlere göre oldukça avantajlıdırlar. Bunlar:

- a-** Hayvanlar ve bitkiler, mikroorganizmalara oranla oldukça yavaş gelişim gösterirler.
- b-** Hayvansal ve bitkisel enzim üretimleri mikrobiyal enzimlere göre oldukça pahalıdır.
- c-** Doğadaki mikrobiyal canlı çeşitliğinin fazla olması ve enzimlerde görülen çeşitlilik bu canlıları hayvan ve bitki enzimlerinden daha avantajlı konuma getirir.
- d-** Günümüzde pek çok mikroorganizmanın çoğaltılması ve kontrolüne dair birçok fizyolojik ve genetik bilgiye sahip olup, neredeyse istenilen tüm metabolizma ürünlerin bu bilgilerle üretimi sağlanabilmektedir (Okaför 2007).

Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik olarak manipülasyonlara uygunluğu sebebiyle mükemmel bir enzim kaynağı şeklinde değerlendirilir (Rao *et al.* 2009). Endüstri alanında kullanılmakta olan enzimlerin %90'ı mikroorganizma fermantasyonundan elde edilmektedir (Godfrey and West 1996).

Ticari anlamda önemli olan enzimlerin birçoğu hidrolaz olarak bilinmektedir ve mikrobiyal kökene sahiptirler. Çoğu ticari öneme sahip enzimler ekstraselüler yapıda bulunurlar. Moleküler ağırlığı yüksek substratlarla görev yapmaktadırlar (Kıran *et al.* 2006). Ticari enzimlerin %3'ünü lipazlar, %28'ini karbohidrazlar, %59'unu proteazlar, %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Bu kadar büyük bir kullanım payına sahip olan proteazlar da en kolay ve hızlı olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. (Woodley 2000).

Lipazlar, sulu ve susuz solvent sistemlerinde aktivasyon olduğu için (Gupta *et al.* 2004; Nie *et al.* 2006) endüstri alanında ve tıpta önemli yerlere sahiptirler (Bjokling *et al.* 1991). Enzimlerin lipid içermekte olan atık sularının enzimatik degradasyonu, deterjan formülasyonu, oleokimyasal endüstri, biyosüpfektanların sentezi, agrokimyasal endüstri organik sentez, besin, süt endüstrisi, kimyasal analiz, kağıt yapımı, kozmetik ve ilaç prosesinde gelişim sunan uygulama alanları olduğu söylenebilir. Lipaz enzimi

teknolojisinde olan gelişmeler bileşiklerin sentezi için de bu enzimlerin kullanımları hızla artış göstermiştir (Ghosh *et al.* 1996; Sharma *et al.* 2001). Enzimler, hastalıkların tanı ve tedavisinin haricinde, yiyecek ve içeceklerin üretim süreçlerinde ve ayrıca deterjanlar gibi birçok tüketim maddesinin katkı maddesi olarak da kilit rol oynamaktadır (Copeland 2000).

Mikroorganizmaların sentezlerinden elde edilen proteolitik enzimler tüm dünyada kullanılmakta olup, deterjan endüstrisinde en fazla kullanım alanı bulan enzimlerdir. Endüstriyel enzimlerin küresel piyasası 2010 yılı için yaklaşık 3,3 milyar dolar olarak tahmin edilmiştir. Novozymes'in açıkladığı rapora göre bu satışların %32'sini deterjan enzimleri oluşturmaktadır (Enzymes in Industrial Applications: Global Markets 2011), (Enzymes Business 2011). Enzim üretimi, ticari olarak yılda binlerce tonu bulmaktadır. Bunun üçte biri Avrupa, üçte ikisi ise Kuzey Amerika ülkeleri tarafından üretilmektedir (Sarıkaya ve Öztürk 2006).

Süt endüstrisinde lipolitik enzim aktivitesi oldukça öneme sahiptir. Peynirlerin üretiminde yüksek lipolizis zorunlu olarak kullanılmaktadır. Peynir üretiminde kullanılmakta olan renninin kütesinde, lipazlar olduğu gibi proteolitik enzimlerde bulunur. Lipaz enzimi kremalarda, çikolata endüstrisinde, karamellerde, tereyağına hoş koku kazandırma gibi alanlarda kullanılırlar. Margarinler, bitkisel ürünler, fırıncılık ürünleri ve shorteningler (hamur yapımında kullanılan katı yağ) gibi ürünlerde lipazlar kullanılır. Lipaz enzimi maya, küf ve bakterileri bulunduran mikrobiyal flora sayesinde oldukça fazla üretilmektedir. Yüksek sıcaklık etkisiyle kimyasal deterjanlar kullanılarak giderilmeye çalışılan lekeler, düşük sıcaklık ve daha az mekanik enerji kullanılarak enzimler istenilen temizliği sağlamaktadır. Bunun yanı sıra ter, kan, çimen ve süt lekelerini çıkarmaya çalışmak biyolojik olmayan deterjanlara göre oldukça etkili olmaktadır. Deterjanda bulunan proteaz enzimi yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri çıkarmada etkilidir. Lipaz enzimi yağ lekelerini çıkarmada etkilidir. Amilaz enzimi ise nişasta bazlı lekeleri temizlemede etkilidirler. Çamaşırların yıpranması ile meydana gelen selüloz fibriller, selüloz enzimi kullanılarak parçalanıp çamaşırların daha yumuşak olmasını ve renklerini korumasını sağlamaktadır (Hiol *et al.* 2000).

Lipazlar dericilik sanayinde kullanılırlar. Enzim, yalnızca derinin yüzey kısmını değil, içinde bulunan yağları da temizleyerek deriyi boyama ve deriyi tabaklama gibi işlemler için uygun bir hale getirilmek için kullanılır. Derilerin işlenmesi amacıyla bazı proteinler temizlenip deriden uzaklaştırılırlar. Derinin ne kadar esneklik kazandırılacağı derinin kullanıldığı alana bağlı olarak değişir. Lipazlar, unda bulunan %1-2 civarındaki lipid maddesi içeriğine de etki edebilmektedirler. Kullanım miktarı ve tipi enzim içinde oldukça önemli olmaktadır. Mesela, hamur yüksek miktarda kullanıldığında özellikleri bakımından sorun yaşanmasına sebep olabilir. Bununla birlikte uygun olan lipaz enzim tipinin de seçilmesi önemli olmaktadır. Türklerin yapmış olduğu ekmek üretimine uygun biçimde olmayan lipaz tipinin seçilmesi ekmek özelliklerine olumlu yönde bir etkisi olmayacaktır. Un yapısına uygun lipaz enzim tipinin eklenmesi; hamur stabilitesinde artış, ekmek içinin yumuşaklığı, hamurun işlenmesinin kolaylığı ve ekmek hacmindeki artışa etki etmektedir (Kıran *et al.* 2006).

Lipaz enzimi; insan, domuz gibi memeli canlılarda bulunur. Kolza tohumu (*Brassica napus*) ve kene otu tohumu (*Ricinus communis*) gibi yüksek yapılı bitkilerde bulunmaktadır. Enzim üretimi mikrobiyal kaynaklardan üretilmekle birlikte, *Candida sp.*, *Rhizopus sp.* ve *Pseudomonas sp.* gibi mikroorganizmalar daha fazla enzim kaynağını oluştururlar. Lipaz enzimiyle gerçekleştirilen endüstriyel çalışmalarda genellikle saflaştırılmış ticari enzimler kullanılır (Pandey *et al.* 1999).

Lipaz enzimi, yağ asidi esterlerinin hidrolizini ve sentezini katalizleyebilirler. Esteraz enzimlerinin aksine, lipaz enzimleri yalnızca su yağ ara yüzeyine emilim gerçekleştirdiklerinde aktif olurlar. Katalizleme suyla çözünmeyen substratın meydana getirdiği ara yüzeyde meydana gelir. Su ile yağın meydana getirdiği bu ara yüzey enzimin aktivitesi adına gerekli olmaktadır. Lipaz enziminin immobilizasyonu esnasında lipaz enzimiyle birlikte kullanılan su, bu ara yüzeyin oluşmasını sağlamaktadır. Lipaz enzimi su-yağ ara yüzeyinde su ile karışmayan trigliserid hidrolizasyonunu kataliz etmektedir. Belli şartlar altında reaksiyon bileşimindeki suyun miktarı, lipaz enzimi tarafından katalize edilen reaksiyonun yönünü belirleyebilmektedir. Suyun az miktarda olduğu durumlarda ya da suyun hiç olmadığı durumlarda sadece transesterifikasyon reaksiyonu ve esterifikasyon reaksiyonu

meydana gelirken, su içeriğinin çok fazla olduğu koşullarda hidroliz reaksiyonları meydana gelebilmektedir (Rubin and Dennis 1997).

Hidroliz olması için esterifikasyon, iki açilgliserol arasındaki açil gruplarının değişimi (transesterifikasyon), asidoliz (bir açil grubu, bir açilgliserol ve bir karboksilik asit arasında yer değişimi) ve alkoliz (bir açil grubu, bir açilgliserol ve bir alkol arasında yer değişimi) gibi birçok reaksiyonu kataliz etme özelliği olan lipaz enziminin, ılımlı reaksiyon koşullarında çalışabilirler. Lipazlar organik olan çözücülerde de kullanılabilirler (Jaeger and Reetz 1999).

Lipaz katalizi gerçekleştiren biyoteknolojik çalışmalara bir takım örnekler aşağıda verilmiştir;

- 1) Sentez Reaksiyonları
  - a) Balmumu sentezi
  - b) Poliöl-yağ asidi esterlerinin sentezi
  - c) Mikroemülsiyon içerisindeki lipaz katalizli esterifikasyon reaksiyonları
  - d) Şeker esterlerinin sentezi
  - e) Açillenmiş glukoz sentezi
- 2) İnteresterifikasyon ve Transesterifikasyon
  - a) Tereyağının interesterifikasyonu
  - b) Trigliseritlerin interesterifikasyonu
  - c) Süt yağının oleik asitle interesterifikasyonu
  - d) Hurma yağının transesterifikasyonu
  - e) Kilogram ölçekli ester sentezi
- 3) Hidroliz
  - a) Zeytinyağının hidrolizi
  - b) Balık yağı ile zenginleştirilmiş doymamış yağ asidi sentezi (Jaeger and Reetz 1999).

Yağ asidi esterleri, yağ alkolleri ile bilinen diğer yağ asidi ester türevlerinin hazırlanmasında kullanılan ham maddelerdir. Bunun yanı sıra gıda endüstrisi alanında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Kozmetik endüstrisinde ise koku veren maddelerin sentezi sırasında kullanılmaktadır. Endüstri alanında yağ asidi esterleri genellikle yağların metanol maddesi içinde 100-200°C'de ısıtılması ile elde edilmektedir. Kısmi olarak açillenmiş sakkarit esterlerinin yüzey aktif olarak, antitümör aktivitesi göstermekte olan ve bitkilerin büyümesini inaktive eden aktiviteleri verilebilir. Bu bileşikler gıda maddelerinde genellikle keklerde, ekmeklerde, kek karışımlarında kullanılırlar. Bunlar monogliserit maddelerle birlikte kek hacminin artırılması ve kekin homojen bir yapıya gelmesi amacıyla kullanılır. Lipaz enzimlerinin büyük bir kısmı aktif bölgelerini kapatan bir helikal segment yapısına sahiplerdir. Lipid kümeleri olduğu sırada bu kapak açılır ve yüzeylerarasında aktivasyon gerçekleşir. Lipazlar için sulu ortamlarda baskın olan konformasyonlar kapalı formdur. Aktif bölgesi ise kapak şeklini oluşturan bir ya da birden fazla 'loop' tarafından çözücü maddeden korunması sağlanır. Kapağın dışta kalan parçası hidrofilik özellikte olması beraber bu konformasyon elektrostatik etkileşimler vasıtası ile kararlı bir hale gelmiştir. Su-yağ emülsiyon yapısında kapağın açılması ile beraber substratların aktif bölgeye girişine izin verilir. Buna açık konformasyon denir. Kapağın açılması ile nükleofilik serin artığı büyük hidrofobik alanlar ile etkileşim gösterir. Bu lipazların aktif forma geçmesini sağlar (Jaeger and Reetz 1999).

Bakterilerde elde edilen lipaz enzimleri, serin hidrolaz grubu içerisinde yer alırlar. Sekiz grup altında toplanırlar. Bu sekiz grup içinden en büyük yere sahip olan grup kendi içinde toplamda altı alt grup daha oluşturmaktadır. Sınıflandırma işlemi sırasında korunmuş olan dizi motiflerine göre oluşmuşlardır. Enzimlerin ise biyolojik özelliklerine göre oluşmuşlardır. Bulunmuş olan birkaç lipolitik enzim, bu sekiz genel grubun içerisinde dahil değildir (De Pascale *et al.* 2008). Bu sebeple dokuzuncu ve onuncu gruplar için yapılan çalışmalar sürdürülmektedir.

**Grup 1:** *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* cinslerinin bulunduğu 1. grup temel lipazlar olarak bilinmektedir.

**Grup 2:** Bu grupta yer alan lipaz enzimleri aktif bölgelerinde (Gly-Asp-Ser-Leu) serisini bulundururlar. *Streptomyces*, *Salmonella* cinslerinin ürettiği lipazlar bu grupta yer alır.

**Grup 3:** *Streptomyces* türlerinin ürettiği bu gruptaki lipazlar, 2. grup lipazlarından farklı olarak, ekstraselüler yapıdadırlar.

**Grup 4:** Bu grupta yer alan lipaz enzimleri memelilerde bulunan hormona duyarlı olan lipazlara benzerler.

**Grup 5:** Mezofilik bakteri olan *Pseudomonas oleovorans* ve *Haemophilus influenza* gibi olan bakteri lipazları bu grupta yer alır.

**Grup 6:** bu grup yer alan lipazlar aktif haldeyken dimerik halde bulunurlar. En küçük molekül yapısında olan enzimlerdir.

**Grup 7:** Bu grupta yer alan enzimler oldukça büyüktürler. Aminoasit dizileri, ökaryotik asetilkolin esterazla homolog yapıda bulunurlar.

**Grup 8:** Bu grupta yer alan enzimler  $\beta$ -laktamazlar ile benzerlik gösterirler (De Pascale *et al.* 2008).

Çok yöne sahip mikrobiyal lipaz enzimleri hızlı bir şekilde gelişme göstermekte olan çağımız biyoteknolojisinde büyük bir role sahiptirler. Kullanımları yaygın olan birkaç ticari lipaz Çizelge 1.2’de verilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar (Jaeger and Reetz 1999)

Tıp	Kaynak	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Fungal	<i>Candida nigosa</i>	Organik sentez	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Sigma, Genzyme
	<i>Candida antarctica</i>	Organik sentez	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Deterjan katkısı	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Gıda işlenmesi	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bakteriyel	<i>Burkholderia cepacia</i>	Organik sentez	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>P. mendocina</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>Ch. viscosum</i>	Organik sentez	Asahi, Biocatalysts

Hidrolik lipazların en önemli ticari uygulamaları çamaşır deterjanlarındaki kullanımlarıdır. Toplam lipaz enzim satışının %32'sini deterjan enzimleri oluşturmaktadır. Her yıl yaklaşık 1000 ton lipaz katkılı 13 milyar ton deterjan üretimi yapılmaktadır (Jaeger and Reetz 1999).

Endüstriyel enzimler, özellikle de lipazlar meyve sularından pişirilmiş hazır gıdalar, süt ve süt ürünlerinin zenginleştirilmesi gibi alanlarda ve daha pek çok ürünün üretiminde kullanılmaktadır. Katı ve sıvı yağlar gıdalar için önemli bileşenleridir. Trigliseritlerin fiziksel özellikleri, besin değeri ve lezzet; gliserol omurgasındaki yağ asitinin konumundan, zincir uzunluğundan ve doymamışlık derecesinden etkilenmektedir. Lipazlar, gliseritlerdeki yağ asiti zincirinin konumunun değiştirilmesiyle, lipidlerin özelliklerinin değişmesine olanak sağlamaktadır. Göreceli olarak ekonomik olan bu metot, yağın daha değerli bir yağa dönüşümüne olanak sağlayabilmektedir (Ito *et al.* 1998).

**Çizelge 1.3.** Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları (Ito *et al.* 1998)

Endüstri	Görevi	Ürün ya da Uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi	Peynir ve tereyağındaki tatlandırıcı ajanların Geliştirilmesi
	Hızlı olgunlaştırma	Peynir
	Yağların modifikasyonu	Tereyağ
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, nemlendiriciler
Kağıt	Hidroliz	Geliştirilmiş kalitede kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
İlaç	Transesterifikasyonu	Sindirimi kolaylaştırıcı düzenleyiciler
	Hidroliz	Özel lipidler
Yağ	Transesterifikasyonu	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
	Hidroliz	Mono ve diaçil gliseroller
İçecek	Aroma geliştirilmesi	İçecekler
Ekmek	Tat geliştirilmesi	Raf ömrünün uzatılması

Stereo seçici özellikleri sebebiyle lipazlar birbiriyle karışmayan tek fazlı sistemlerde çeşitli rasemik organik asit karışımlarını çözmek için kullanılabilir. Bunun yanı sıra Rasemik alkoller, lipazların kataliz ettiği transesterifikasyon reaksiyonları ile oluşturulan saf enantiyomerler içinde de çözülebilmektedirler. Deterjanlar içerisinde bulunan lipazlar, endüstriyel çamaşırhanelerde ve evlerdeki bulaşıkların temizlenmesi için deterjanlarına ilave edilirler. Bu yollarla deterjanların temizleme gücü, zirveye ulaşmış görünmektedir. Bütün deterjanlar benzer içeriklere sahip olmaktadır. Aynı zamanda benzer temizleme mekanizmalarına dayanmaktadırlar. Deterjanlar içerisine temizleme gücünü arttırmak amacıyla lipaz, amilaz ve proteaz gibi enzimler ilave edilmektedir (Ito *et al.* 1998).

Lipazla modifiye edilmiş kahve beyazlatıcılarına, kremalara, çorbalara ve unlu mamullere, hamurlara ve şekerlemelere süt tadı vermesi amacı ile bu tür maddelere ilave edilmektedir. Süt yağlarının hidrolizi de lipaz tarafından kontrol edilir. Lipaz kullanımına yer verilen süt sanayinde; pH, sıcaklık, emülsiyon miktarı ve lipaz konsantrasyonunun belirli değerlere ayarlanması spesifik yağ asitlerinin kontrollü salınmasına izin verilmektedir. Alışlagelen kimyasal interesterifikasyon işlemiyle yapılması mümkün olmayan bu uygulama, aynı zamanda kötü tat oluşturan spesifik yağ asitlerinin de en aza indirilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar farklı özellikler ve seçicilik gösterdiğinden, istenilen özellikte ürün elde etmek için lipaz tipinin seçimi oldukça önem taşımaktadır (Balcao and Malcata 1998). Sadece birkaç termostabil lipaz, endüstriyel amaçla üretilen enzim olarak görülmektedir (Wu *et al.* 1996).

**Çizelge 1.4.** Yağ ve yağ asitlerinin lipaz üreticisi çeşitli mikroorganizmalardaki etkisi (Wu *et al.* 1996)

Yağ kaynağı	Organizma	Lipaz üretimine etkisi
Sentetik ve doğal Yağlar	<i>Aspergillus wentii</i>	Düşürür
Zeytin yağı	<i>Saccharomycopsis sp.</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Staphylococcus sp.</i> , <i>Mucor caseolyticus</i>	Düşürür
Zeytin yağı, Mısır yağı, Tereyağ	<i>Penicillium roqueforti</i>	Düşürür
Zeytin yağı, Yerkıstığı yağı, pamuk tohumu yağı	<i>Pseudomonas mephitica</i>	Yükseltir
Tribütirin ve Trioktanoin	<i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Micrococcus freudenreichii</i>	Etki etmez
Doymamış yağ Asitleri	<i>Pseudomonas fragi</i>	Düşürür
Oleik, Linoleik ve Linolenik asit	<i>P. mephitica</i>	Yükseltir

Mikroorganizmalar, hava, toprakta ve su gibi ortamların yanısıra böceklerin yüzeyinde ve iç organlarında da yayılış göstermektedirler. Böceklerin, larva ve ergin evrelerinde bağırsak sistemleri ve diğer vücut bölgelerinde birçok mikroorganizmayı bulundurduğu ve bu mikroorganizmaların böcekler ile patojenik ilişkiler nedeniyle bağlayıcı mutualist ilişkilere kadar birçok etkileşim tipine kaynaklık yapmaktadır (Dharne *et al.* 2006). Böceklerin mikrobiyal florasının en önemli üyelerini bakteriler oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalar böcekler için sindirimine yardımcı olmak, uygun gıda oluşturmak, vitaminler sentezlemek, böcek patojenleri ile rekabet etmek, besin faydalı enzimler üretmek, feromonlar üretmek, azot bağlamak suretiyle böceklerin yaşamına mühim etkiler göstermektedir (Demirbağ ve ark. 2008). Fakat tüm bu faydalı etkileri olmasına rağmen böcekleri kontrol eden, hastalandıran, pasifize eden ve öldüren bakteriler de mevcuttur (Klein and Kaya 1995). Böceklerin vücudundaki kısmı bölümlerin mikroflorası bilhassa de bağırsak mikroflorası üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu durumun temel anlamda iki nedeni olduğu öne sürülmektedir; birincisi, geniş bir çeşitlilik gösteren bu mikroflora, antiviral peptidler, antitümöral, antibakterial, antimalarial, antifungal gibi yeni ve çok değerli biyoaktif bileşiklerin üretimi için

önemli bir kaynak olabilmektedir. İkinci olarak mikrofloranın böcek patojeni olanları zarar veren böceklerin biyolojik kontrolünde kullanılabilir (Lehane *et al.* 1997, Zhang and Yuen 1999, Wilkinson. 2001, Beard *et al.* 2002, Dillon *et al.* 2005, Dharne *et al.* 2006).

Oduzlarda ve bitkilerde yaşamakta olan böcekler, biyokütlenin parçalanması için bağırsaklarında birçok çeşitte bakteri florası barındırmaktadır. *PaeniBacillus* suşu, farklı bitki hidrolize edici enzimler salgılaması yeteneği sayesinde, bir pamuk solucanının bağırsağından izole edilmektedir. Potansiyel bir selüloz ve bitkiler üzerinde yaşayan bir böceğin bağırsağından izole edilen bir bakteriden bir hemiselüloz belirlenmiş, tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu iki hidrolitik enzime dayanan iki fonksiyonlu kimeralar inşa edilmiştir. Yapısal ve fonksiyonel olarak özellikleri değerlendirilmiştir (Adlakha *et al.* 2011).

Canlı dünyasının tür çeşitliliği yönünden en geniş gruplarının başında gelmiş olan böceklerin; beslenme, metabolizma ve yaşam alanı yönünden büyük bir çeşitlilik göstermiş olması, bu organizmaların vücut florasından yeni tür ve yeni suşların izolasyon şansını yükseltmektedir. Ayrıca böcek mikroflorasının biliniyor olması onların bağırsak ekosistemleri, onlara direnç gösterme mekanizmaları, çeşitli mikrobiyal hücumlardan etkilenme, beslenme fizyolojisi vb. konuların aydınlatılması konusunda mühim ipuçları vermektedir. Bu nedenle böcek bağırsağı ve diğer vücut bölümlerinin mikroflorası hakkındaki çalışmalar yoğunluk kazanmaktadır (Moraes *et al.* 2000, Dharne *et al.* 2006, Xiang *et al.* 2006, Yılmaz *et al.* 2006, Husseneder *et al.* 2007, Behar *et al.* 2008, De Vries *et al.* 2008). Özellikle zararlı böcekler ile biyolojik mücadelede uygulanabilecek mikrobiyal ajanların, yine bu böceklerin vücut kısımlarından izole edilebileceği düşüncesi, birçok potansiyel biyolojik olan kontrol ajanlarının kullanımını sağlamaktadır (Frederick and Caesar 2000, Cardoza *et al.* 2006, Messiha *et al.* 2007, Jackson *et al.* 2008). Yapılan çalışmalarda, karasal böceklerin bağırsaklarında amilaz, lipaz, proteaz ve selüloz gibi enzimleri üretme kapasitesine sahip olan mikroorganizmaların varlığı tespit edilmiştir. Sucul böceklerin bağırsaklarında da mikroorganizmalara rastlanmıştır (Visôto *et al.* 2009; Adams *et al.* 2011; Huang *et al.*

2012; Prasanna *et al.* 2014; Sazama *et al.* 2017). Bununla birlikte, lipaz enzimleri dahil endüstriyel veya biyoteknolojik öneme sahip olan enzimleri üretme kapasitesine sahip olan mikroorganizmaların sucul böceklerden izole edilebileceğine yönelik literatürde bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda kullanılan böcekleri açıklayacak olursak, kullanılan türlerin ait olduğu coleoptera, dört alttakım (Archostemata, Myxophaga, Adephaga ve Polyphaga) altında tanımlanmış yaklaşık 350.000 tür ile en büyük böcek takımıdır. Familya düzeyindeki sınıflandırması değişken olmasına rağmen yaklaşık, 500 familya ve altfamilya tanımlanmıştır. Böcek takımları içerisinde en zengin olan takım Coleoptera'dır; bilinen böcek türlerinin % 40'ı bu takıma bağlıdır. Çok küçük yapıları olduğu gibi, çok irileri de vardır. Bazı tropik türlerinin boyu 15 cm'ye yaklaşır. Üst kanatlar (Elytra; tekil olarak Elytron) az veya çok kalın kitinsel yapıdır (Kansu 1982).

Kınkanatlılar, tatlısular, bazı deniz ve gelgit habitatu gibi akla gelebilecek her türlü yaşam alanlarını işgal ederler, özellikle yapraklar, çiçekler, tomurcuklar, gövde, kabuk ve gövde gibi bitkisel mikrohabitatlarda, canlı bitki dokularında ya da ölü materyal ayrıştırılmasının tüm basamaklarında bulunurlar. Saprofaglık ve fungivorluk oldukça yaygındır, gübre ve leşleri de kullanabilirler. Bazı kınkanatlı grupları parazittir, ancak Adephaga'nın hemen hemen tümünde, Polyphaga'nın Lampyridae (ateş böcekleri) ve Coccinellidae (uğur böcekleri) üyelerinin çoğunda ise karnivorluk görülür. Bazı herbivor Chrysomelidae ve Curculionidae türleri, yabancı otların biyolojik kontrolünde kontrol ajanı olarak yaygın şekilde kullanılırlar, ancak bu iki familyanın diğer türlerin çoğunlukla bitki zararlısıdır. Coccinellidae türleri, afit ve kabuklu bitler gibi bitki zararlısı türlere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılırlar. Bazı kınkanatlı türleri otlakların ve tarım ürünlerinin köklerinde zararlı olabilir (özellikle Scarabaeidae larvaları), bazıları odun zararlısı (Cerambycidae), bazıları ise ambar zararlısıdır (Curculionidae). Bu ambar zararlısı türler kuru koşullara adapte olmuşlardır ve depolanmış tahıl, hububat, bakliyat ve deri gibi kurumuş hayvan materyalleri üzerinde gelişirler. Sucul kınkanatlılar farklı beslenme alışkanlıkları sergilerler, fakat birçok türün hem larvaları hem de erginleri avcıdır (Kansu 1982).

Zengin çeşitliliğe sahip holometabol Coleoptera takımı 5000'den fazla sucul tür içerir (Ancak bunlar tanımlanmış tüm kınkanatlı türlerinin %2'sinden daha azını oluşturur). Yaklaşık 10 familyada hem larvalar hem de erginler suculdur; birkaç familyada ağırlıklı olarak larvalar sucul, erginler ise karasaldır; oldukça nadir olarak larvalar karasal, erginler suculdur (Özellikle Dryopidae'de). Birkaç familyada ise sucul türler tek tük bulunur. Larva evresinde veya hem larva hem ergin evrelerinde genellikle sucul türleri içeren başlıca Coleoptera familyaları şunlardır: Gyrinidae (sersem kınkanatlılar), Dytiscidae (avcı dalgıç böcekleri), Haliplidae (sürünücü su kınkanatlıları), Hydrophilidae (leşçil su kınkanatlıları), Scirtidae (bataklık kınkanatlıları), Psephenidae ve Elmidae (yivli kınkanatlılar). Sucul Coleoptera üyeleri çok çeşitli beslenme alışkanlıklarına sahip olmakla birlikte, birçok türün hem larvası hem de erginleri avcı veya leş yiyicidir (Gullan and Cranston 2010).

Dytiscidae, genellikle durgun sularda yaşayan böcekleri kapsayan geniş bir familyadır. Vücutları yassı, oval ve çok kaygan (cilalı) yapılıdır. Arka bacakları yüzücü, erkeklerin ön bacakları tutucudur. Geceleri suları terk edip ışığa uçtukları bilinmektedir. *Dytiscus* cinsi en tanınmış olandır, her türlü sucul tabiatta bulunabilirler (Kansu 1982).

Bu çalışmada kullanılan böcek türleri şunlardır; *Hygrotus impressopunctatus*, *Rhantus suturalis*, *Dytiscus circumflexus* ve *Laccobius sulcatus*'tur.

***Hygrotus impressopunctatus*** (Schaller 1783), Tüm Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da yayılış gösteren bir türdür. Türkiye'de Erzurum ve Konya'da bilinmektedir. Sınıflandırmadaki yeri;

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Coleoptera

Suborder: Adephaga

Family: Dytiscidae

Genus: *Hygrotus*

Species: *Hydrotus impressopunctatus*

***Rhantus suturalis*** (W.S. MacLeay 1825), Tüm Avrupa'da yaygındır. Türkiye'de Aksaray, Erzurum, Konya, Manisa, Rize ve Trabzon'dan bilinmektedir. Sınıflandırmadaki yeri;

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Coleoptera

Suborder: Adephaga

Family: Dytiscidae

Tribe: Colymbetini

Genus: *Rhantus*

Species: *Rhantus suturalis*

***Dytiscus circumflexus*** (Fabricius 1801), Türkiye'de Adana, Aydın, Balıkesir, Erzurum, Iğdır, Isparta, Kars ve Kütahya'dan bilinmektedir. Bu tür, sivrisinek larvalarıyla beslendiğinden biyolojik mücadele aracıdır. Sınıflandırmadaki yeri;

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Coleoptera

Family: Dytiscidae

Tribe: Dytiscini

Genus: *Dytiscus*

Species: *Dytiscus circumflexus*

***Laccobius sulcatulus*** (Reitter 1909), Tüm Avrupa'da, kısmen Asya'da ve Kuzey

Amerika’da yayılış gösterir. Türkiye’de birçok ilden bilinmektedir Sınıflandırmadaki yeri;

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Coleoptera

Suborder: Polyphaga

Family: Hydrophilidae

Genus: *Laccobius*

Species: *Laccobius sulcatulus*

Yukarıdaki türlerin ortak özelliği; birçok türün diyapoza çekildiği soğuk dönemlerde aktif olmalarıdır (Darılmaz and İncekara 2011).

Mevcut çalışmada, yukarıda belirtilen dört sucul sucul böcek türünün sindirim sisteminde yaşayan ve lipaz üretme yeteneğine sahip olan bakterilerin izolasyonu ve en iyi izolatla sıvı kültürde lipaz üretimi için kültür şartlarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

1901 yılında ilk olarak *Serratia marescens* ve *Pseudomonas auroginosa* türlerinde görülen bakteriyel lipaz (Hasan *et al.* 2006a). Kaynakları arasında en önemlileri *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *GeoBacillus*, *Chromobacterium*, *Burkholderia* cinsleridir. Geniş kullanım alanları arasında; *Pseudomonas* türlerinin üretmiş olduğu lipaz enzimi yağ lekelerinin temizlenmesi amacıyla tekstilde kullanılmakta ve bu etkileşimi kumaşlarla kompleks oluşturarak gerçekleştirmektedirler. 1995'te ilk kez endüstriyel lipaz üretimi gerçekleştirilmiş olup üretimi ise Anna University, Life Sciences, AU-KBC Research Center, Genencor International kuruluşları tarafından yapılmıştır. Üretilen ticari lipaz enziminden Lumafast enzimi *Pseudomonas mendocina*; Lipomax enzimi ise *Pseudomonas alcaligenes* bakteri türünden sentezlenmiştir (AU-KBC, 2016). *GeoBacillus thermoleovorans* ID-1 suşu lipaz üretmekte olan bir bakteri türü bilinmekle beraber zeytinyağı karbon kaynağı şeklinde kullanıldığı termofilik *basillus*'lar 65°C'de en hızlı büyüme oranına sahiptir. Lipaz üretimi gelişme sıcaklığının tersine pH 6.0'da ve 50°C'de en yüksek oranda gerçekleşmiştir. Bu değer *G. thermocatenulatus* ve *G. stearothermophilus* türlerine göre büyüme oranı açısından yüksek bir değer olmaktadır (Lee *et al.* 1999). Ayrıca *G. thermoleovorans* ID-1 lipaz geni *Escherichia coli*'de ifade edildiğinde optimum aktivitesi 50°C'de, pH 7.0-8.0 arasında gerçekleşmiştir (Cho *et al.* 2000).

*G. thermocatenulatus* lipaz enzimi aktivitesi zeytinyağı substratı ve *p*-nitrofenil palmitat substratı şeklinde bulunduğu ortamın en yüksek aktivitesini pH 7.5-8.0 değerleri arasında 60°C sıcaklığında göstermektedir (Schmidt- Dannert *et al.* 1994).

*G. thermocatenulatus* lipaz üretimi yapan önemli bir termofilik bakteri türüdür. Bu bakteriye ait lipaz enzimi üzerinde uygulanan çalışmada, besiyerinde üretilen %1.3'lük nutrient broth konsantrasyonu %0.65 oranına düşürülmüş ve enzimin üretimi 0.08 U/ml oranından 0.2 U/ml oranına arttırılmıştır. Ayrıca bu çalışma besiyerinde gum arabik olması lipaz enzimi aktivitesini arttıran bir etken olarak gözlenmiştir (Schmidt- Dannert

*et al.* 1994). Termofilik *G. Thermocanetulatus* türünden saflaştırılan 16 ile 43 kDa'luk iki farklı lipaz arasından 16 kDa'luk lipaz en az molekül ağırlığı olan lipaz enzimlerinden biri olarak bilinir (Schmidt-Dannert *et al.* 1996).

Endonezya'daki deri boyama endüstrisinde kullanılan nötr proteazlar *B. megaterium* tarafından üretilmektedir ve salgılamada kullanılmaktadır. Ayrıca, *B. megaterium*, aerobik ve anaerobik olarak B12 vitamini sentezleme yeteneğine sahiptir. (Raux *et al.* 1998). Çalışmada kullanılan *G. thermoleovorans* ID-1 suşu ile elde edilmiş olan thermostabil lipaz enzimi, 1 saat boyunca 60°C'de ve 30 dakika boyunca 70°C'de inkübasyon yapıldığında sıcaklığın etkisi ile normal aktivite oranının %50'sini yeniden elde etmiştir (Lee *et al.* 1999).

Endüstride oldukça öneme sahip olan birkaç ürünün adını vermek için, *B. megaterium*, fırın endüstrisinde nişastanın modifikasyonu için kullanılan birkaç  $\alpha$ -amilaz ve  $\beta$ -amilaz üretimi için kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra *B. megaterium*, yeni  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin sentezi için esas olan penisilin asilazların üretimi için kullanılmaktadırlar (Panbangred *et al.* 2000). Bitkisel yağlar ekonomik ve endüstriyel olarak mühim olduklarından bu yağların hidroliz etmede kullanılan *Cryptococcus sp.* S-2 lipaz enzimi biyodizel yapımında da kullanılan bir enzim çeşididir (Kamini *et al.* 2000).

Bu araştırmada ise, Türkiye'nin mikoflorasını tarım yönünden yansıtan kültür koleksiyonu küflerinin, primer metabolitlerinden bazı enzim üretim kapasiteleri belirlenerek endüstriyel yönden de önemleri araştırılmıştır. Tipik ekolojik mikoflorayı temsil eden bu küflerin pektinaz, amilaz, b-glukanaz, ksilanaz, lipaz, selülaz, proteaz enzimlerini üretebilme kapasitesi bakımından yapılacak olan kalitatif tarama çalışmasıyla potansiyellerin tespit edilerek, ileride endüstriyel üretime veya farklı birçok bilimsel araştırmaya temel oluşturmasına çalışılmıştır. Bu açıdan proteaz ve lipaz üretim kapasitesinin araştırılmasında "Derin Kültürle Oposite Kapasitesi", amilaz enziminde ise "Difüzyon Tekniği ile Zon Kontrolü" ele alınmıştır. Toplamda 1558 adet küf kültüründe lipaz, proteaz ve amilaz taraması yer verilmiştir. Bu çalışmaya istinaden

pozitif sonuç veren enzimler: lipaz için 591 (%46), proteaz için 1078 (%69) ve amilaz için 645 (%41) olan değerleridir (Topal *et al.* 1998).

Yağ asitleri, şekerler ve şeker esterleri gibi doğal yenilenebilen kaynakların kullanılmasıyla, modifiye edilmiş şekerlerin ya da pahalı açıl donörlerin kullanılmasını engelleyerek üretim maliyetinin azaltılması bu çalışmada hedeflenmiştir. Bu çalışmanın amacı, iyonik sıvılar ve fruktoz-stearatın t-butanol: DMSO çözücü karışımının içerisinde *M.miehei* ve *C.antarctica* immobilize lipaz enzimlerinin katalizörlüğünde sentezi sağlanmıştır (Pandey *et al.* 1999).

Birçok çalışmada farklı mikroorganizmaların ekstrasellüler lipaz üretimine değinilmiştir. *Aspergillus niger* ile yapılan bir çalışmada farklı suşlarda ekstrasellüler lipaz enziminde çeşitlilik gözlenmiştir. Çalışma sonucunda *Aspergillus*'un yüksek lipolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Fanoly *et al.* 2006).

*Candida cylindracea* ve *Rhizomucor miehei* lipaz enzimlerinin 3 farklı polisilikat yapı üzerine (montmorillonite, palygorskite, sepiolite) immobilize edilmiştir. Ticari bakımdan kullanılan, destek materyali Duolite-A 568 reçinesi ile geliştirilen immobilizasyon yöntemlerinin aktivitesini karşılaştırmaktadırlar. Ölçülmüş olan seçicilik ve aktivite sonuçları, biyodönüşümlerde çoğunlukla kullanılan, göreceli olmasından düşük mol kütleli proteinlerin immobilizasyonu bakımından palygorskitin ve sepiolite destek materyali şeklinde kullanılabilir (Fuentes *et al.* 2001).

Katalizör olarak kimyasal tepkimelerin dengeye ulaşmasını çabuklaştıran enzimler düşünüldüğünde lipaz enzimlerinde de asidoliz, interesterifikasyon, aminoliz, esterifikasyon ve hidroliz gibi çeşitli biyodönüşüm reaksiyonlarını gerçekleştirmesini sağlayan çok amaçlı biyolojik katalizörlerdir. Bu özellikleri ile lipazların sanayide katalizör olarak kullanım alanları genişlemiştir. Tutuklanmış lipaz kullanarak, susuz ortamda trigliserid ve alkolden biyodizel yakıt üretimi üzerine Japonya ve Çin'de çalışmalar yapılmıştır (Iso *et al.* 2001).

*Bacillus sp.* bakterilerinin substratı basit trigliseridlere karşı spesifik olma değerleri oldukça geniştir. *G. thermocatenulatus* lipaz enzim genlerinin, *E.coli* DH5a suşuna klonlanmış olağında, en yüksek lipolitik aktivitenin zeytinyağı ve tribütirinin substrat şeklinde kullanıldığı besiyerlerinde, pH 8.0-9.0 aralığında ve 60-70°C sıcaklıkta olduğu belirtilmiştir (Schmidt-Dannert *et al.* 1996).

*Candida rugosa*'ya ait lipaz enzimi olan kitosan üzerine kovalent bağ ile immobilize edilerek, immobilize olan enzimin kinetik özelliğini değiştirebildiği öne sürülmüştür (Chiou *et al.* 2004).

Lipaz enzimi immobilizasyonunda kullanmak için geliştirilen kitosana bağlı poli(akrilonitril-co-maleik asit) hollow fiber membranları hazırlanmıştır. Yapılan çalışmada biyomimetik membran yardımcı materyali hazırlanmış ve lipaz enziminin bağlama oranı 66,5 mg/ml olarak hesaplanmıştır (Ye *et al.* 2005).

Bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz enzimi, hidrofobik polifenil asetlen polimeri tarafından immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim, serbest enzime nazaran sıcaklık ve pH değişimlerine, organik çözücülere maksimum kararlılık gösterdiği görülmüştür (Panzavolta *et al.* 2005).

Lipaz immobilizasyonun nano boyutta, aktivasyon işlemine gerek olmayan, enzimin direkt olarak immobilizasyonu yeni bir hidrofobik destek materyali sentezi yapılmış ve lipaz enziminin immobilizasyonunda kullanımı sağlanmıştır (Öztürk 2006).

*Bacillus sp.* bakterisi olan FH5'ten saflaştırılmış lipaz enzimlerinin en yüksek aktivitesi pH 10.0 değerindedir. pH 10.0 değerinden 11.0 değerine artırılmasında ise lipolitik aktivitenin stabilite oranının azaldığı görülmüştür (Hasan *et al.* 2006b).

Termofilik *G. thermocatenulatus* lipazı, *E.coli* DH5a'da ifade edildiğinde pH 9.0-11.0 arasında yüksek oranda stabilite göstermektedir (Schmidt-Danert *et al.* 1996).

Bu araştırmada; lipaz enzimi kaynağı olan yağlı fabrika atıklarıyla kontamine olmuş olan topraklardan izole edilmiş *Bacillus* cinsi bakteriler içinden maksimum enzim aktivitesi gösterenler lipaz enzimi üretiminde önem arzeden ortam şartlılarıyla ortam bileşenleri parametre olarak araştırılmıştır. Türkiye’de karbon kaynağı olarak sıklıca kullanılan bitkisel yağların (mısır özü yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, zeytin yağı, susam yağı), yağ asitleri içerisinden (triolein, tristearin, tripalmitin, tribütirin, triasetin, trioktanoat), yağ asidi esterlerinin (stearik asit, oleik asit, linoleik asit, palmitik asit) ve şekerin farklı derişimlerinin: azot kaynakları bakımından ise bir takım doğal kaynaklar buğday unu, soya unu, (mısır unu) ile organik olan kaynakların (re, maya özütü, jelatin, pepton) ve bir de metal tuzları olan (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, LiCl, CuSO<sub>4</sub>) hücre içi ve hücre dışı lipaz enzimi aktivitesi, protein derişimi ve hücre derişimi üstündeki etkileri araştırılmıştır. Optimum ortam şartlarını oluşturmak amacı ile başlangıç olarak pH aralığı 6.0-9.0 ile 37- 50 C aralığında üretimler yapılıp bu değişkenlerin lipaz enzimi aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus sp.* bakterisinin hücre dışında lipaz enziminin üretmiş olduğu en optimal karbon kaynağının %1(h/h) derişiminde susam yağı, en optimal azot kaynağının ise %0.3 (a/h)maya özütü + %0.5 (a/h) pepton ve lipaz üretimini en fazla indkte eden metal tuzunun 1mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> olduğu tespit edilmiştir. Optimum ortam şartlıyrsa pH: 7.5 ve sıcaklık 45 C belirlenmiştir. Üretilmiş olan enzim ultra filtrasyonu ve anyon değiştirici kromatografisi ile kısmi saflaştırılmış buna bağlı olarak enzime olası deterjan katkılarının etkisi (Triton X-100, EDTA, Tween 80, Tween 20, SDS, proteaz) belirlenerek elde edilmiş olan lipaz enziminin endüstriyel kullanımı potansiyeli sonucuna ulaşılmıştır (Marul 2007).

Bu çalışmada 8 ayrı kaynaktan (*Rhizopus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camembertii*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa*), lipazlarını makrogözenekli polipropilene fiziksel adsorbsiyon yolu ile immobilizasyonu sağlanmıştır. Yapılan çalışmada aynı taşıyıcıya farklı lipaz enzimlerinin farklı adapte olma durumları gözlenmektedir. Biyodizel elde edebilmek amacıyla bütün immobilize olan enzimlerin metanoliz reaksiyonları karşılaştırılmaktadır (Salis *et al.* 2008).

Bu çalışmada Tributyrin Agar besiyeri kullanılarak zeytinyağı fabrikası ve zeytin bahçeleri yakınındaki topraklardan, çiğ ve pastörize süt örneklerinden, lipolitik aktiviteye sahip bakteriler izole edilerek araştırmada kullanılmıştır. Bu çalışmadaki izolatların gram reaksiyonları belirlenmiş olup Gram pozitif özellik gösteren lipaz enzimi aktiviteleri belirlenmek üzere seçim yapılmıştır. Toprak örneklerinden elde edilmiş olan 20 adet izolatın 14 tanesinin hareketsiz, sporsuz ve düzensiz Gram pozitif basiller olduğu; 3 tanesinin *Bacillus*, 2 tanesinin *Staphylococcus* ve 1 tanesinin *Micrococcus* cinsine ait türler olduğu görülmüş; süt materyallerinden elde edilmiş olan 18 tane izolatın 7 tanesinin düzensiz, hareketsiz, sporsuz Gram pozitif basiller olduğu, 7 tanesinin *Staphylococcus*, 2 tanesinin *Bacillus*, 1 tanesinin *Listeria* ve 1 tanesinin *Streptococcus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan suşların lipolitik aktiviteleri, Tributyrin Agar besiyerinde zon oluşturmasının yanında Rhodamine B Agar besiyeri kullanılarak görünür ve UV ışık altında kalitatif olarak tespit edilir. Sonrasında *p*-nitrophenyl-palmitat'ın substrat olarak kullanılmış olan spektrofotometrik metot ile suşların hepsinin lipaz enzimi aktiviteleri kantitatif olarak tespit edilmiştir. Toprakten izole edilmiş olan 9 adet suş lipaz enzimi aktivitesi görülmezken, 11 adet suşun lipaz enzimi aktivitesinin 2 U/ml ve 581.5 U/ml arasında olduğu belirlenmiştir. Bu suşların içinde maksimum lipaz enzimi aktivitesinin *Staphylococcus* sp. NS 02-1'e ait olduğu tespit edilmiştir. Sütten izole edilmiş olan suşların ise 7 tanesi lipaz enzimi aktivitesi göstermezken, 11 adet suşun lipaz enzimi aktivitesinin 1.6 U/ml ve 564.6 U/ml arasında olduğu belirlenmiştir. Bu suşlar içerisinde maksimum aktivitenin *Staphylococcus* sp. RB 07-2'ye ait olduğu tespit edilmiştir (Saraç *et al.* 2008).

Yapılan bu araştırmada haloalkalifilik özellikteki *bacterium* sp. AH-6' ya ait seri alkalın proteaz enziminin %0.05 SDS' in varlığındaki enzim aktivitesi % 2'lik oranda azalmış, %0.2'lik SDS'nin varlığında ise proteaz enzim aktivitesinin tümünün inhibe olduğu görülmüştür. %0.05'lik TritonX-100 varlığında ise enzimin aktivitesi %23 oranında artarken %0.2'lik TritonX-100 varlığında ise enzimin aktivitesinin tümünün inhibe olmuş olduğu görülmüştür. %0.1'lik Tween-80 varlığında enzimin aktivitesi %35 oranında artarken, %2'lik Tween-80 varlığında enzimin aktivitesinin tümünün inhibe olduğu görülmüştür (Dodia *et al.* 2008).

Yapılan çalışmada kullanılan izolatların, 10 tanesi *B. megaterium*, 6 tanesi *B. pumilus* ve 12 tanesi *Bacillus sp.* olarak belirlenmiştir. VITEK 2 cihazının kullanımı yapılan çalışmanın sonucuna göre T20, T30, T33, T39, T43, T48, T49, T50, T55 ve T70 olarak numaralandırılmış kullanılan izolatların *B. aryabhatai* ve *B. megaterium* olduğu belirlenmiştir. Çalışma da *B. megaterium* bakterisinin koloni renginin ise beyaz-krem renge olduğu belirlenmiş *B. aryabhatai* bakterisinin renginin şeftali olduğu belirlenmiştir (Shivaji *et al.* 2009).

Araştırmada kullanılan izolatlarda bulunan kolonilerin krem renkli olması ve moleküler araştırmaları destekleyen biyokimyasal araştırmalar sonucunda izolatların *B. megaterium* bakterisi olduğu tespit edilmiştir. VITEK 2 cihazıyla elde edilen sonuçlarda T21, T22, T26, T29, T36, T58 kodlu izolatlarda *B. pumilus*'a benzerlik gösterdiği görülmüştür. 16S rDNA sonuçlarında maksimum oranda *B. pumilus*' benzemesi nedeniyle kullanılan bu izolatların *B. pumilus*'a ait suşlar olabileceği düşünülmektedir (Katı *et al.* 2016).

Bu araştırma ergin olmayan ve ergin *Oncorhynchus mykiss*'in karaciğerindeki lipaz (E.C.3.1.1.3.) enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Ergin olmayan ve ergin *O. mykiss* karaciğer lipaz enziminin saflaştırılması işlemleri üç aşamadan oluşmuş olup, bunlar; amonyum fosfat çöktürmesi, homojenatın hazırlanması ve Diethylamino ethyl (DEAE) selülozik iyon değişim kromatografisi şeklindedir. Saflaştırma süresince, ergin olan balıkların karaciğerlerinden elde edilmiş olan lipazın spesifik aktivitesi  $2.23 \pm 1.59$   $\mu\text{mol/mg}$  protein, verimi ise % 0.037 ve saflaştırma katsayısı  $2.65 \pm 1.94$  olarak bulunmuştur. Balıkların ergin olmayanlarında spesifik aktivite  $1.86 \pm 0.14$   $\mu\text{mol/mg}$  protein, verimi ise %  $3.24 \pm 0.51$  ve saflaştırma katsayısı  $15.50 \pm 1.13$  olarak belirlenmiştir (Akpınar *et al.* 2009).

Bu araştırmada, tabakhanelerden elde edilen atıklardan izole edilen *Bacillus* strain SAL1'den alkalın proteazının saflaştırılmasının karakterizasyonunu çalışılmıştır. Enzim, DEAE sefakril iyon değişim kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi ve fenil sefaroz hidrofobik etkileşim kromatografisi kombinasyonu kullanılarak saflaştırma

yapılmıştır. Proteazın 11.8 kat saflaştırma yapılmış ve proteaz enziminin spesifik aktivitesinin 4250 PU/mg olduğu hesaplanmıştır. SDS-PAGE ile proteaz enziminin bağıl molekül ağırlığının 27 kDa olduğu hesaplanmıştır. Proteaz enziminin proteolitik aktivitesi, jelatin zımogram jeli ile belirlenmiş, proteaz enziminin pH değeri 7.0-10.0 değerlerinde stabil kalabildiğini ve 50°C sıcaklıkta 1 saat stabilitesini koruyabildiği görülmüştür (Almas *et al.* 2009).

Lipaz enzimi özellikle lipitlerin ester bağlarının hidrolizini katalizleme özelliği nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda atık ve artıkların değerlendirilmesinde büyük rol oynamaktadır. Evlerde kullanılmış yağların tekrar değerlendirilmesi, yağlarla kirlenmiş kentsel ve evsel atıkların arıtımı, çeşitli fabrika atıklarının değerlendirilmesi ve biyodizel üretimi gibi alanlarda lipaz enzimi kullanımı giderek artmaktadır (Bhumibhamon *et al.* 2001; Ghaly *et al.* 2010).

Bir diğer çalışmada *P. aeruginosa* ATCC 27853 türünden türünden proteaz enzimini izole etmişler ve kısmi olarak saflaştırmışlardır. Yapılan denemeler sonunda elde edilen proteaz enzimi sadece nötral ve bazik pH koşullarında stabil kalabilmiş asidik koşullarda ise aktivitesini neredeyse tamamen kaybetmiştir. Sıcaklık stabilitesi açısından enzim, 50°C'de 1.5 saat bekletildiğinde sadece %20 civarı bir aktivite kaybı yaşarken 60 ve 70°C sıcaklıklarda ise aktivitesini yaklaşık olarak %80 ile 90'ını kaybetmiş olduğu görülmüştür (Izrail-Zivkovic *et al.* 2010).

Ham petrol bulaşmış örneklerin toplandığı Süveyş Körfezinde yapılan çalışmada izole ettikleri AK187 izolatının oksitleyici, deterjan ve organik çözücü ajanlara karşı tolerans gösteren bir serin alkalin proteaz enzimi ürettiğini ortaya koymuşlardır. Serin alkalin proteazının saflaştırma işlemi ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Saflaştırma aşaması üç basamaklı olan proteazın 58 kat saflaştırabildiği görülmüştür. Enzimin optimal pH'sı 9.0 ve 60°C sıcaklık olarak belirlenmiştir.  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$  ve  $\text{Cr}^{+3}$  gibi ağır metallerin enzimi inhibe ettiği görülmüş  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Li}^{+}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonlarının ise enzim aktivitesini etkilemediği görülmüştür. Enzimin, Tween 80 ve Triton X-100 gibi hidrojen peroksit ve iyonik olmayan deterjanlar gibi oksitleyici ajanların ve beyazlatıcı

ajanların olması durumunda stabil olduğu görülmüştür. Proteaz enziminin saflaştırılıp karakterize edilmesiyle kirlenme karşıtı ajanların formülasyonunda, biyotransformasyon reaksiyonlarında, deterjan formülasyonunda ve enzimatik peptid sentezinde kullanılabileceği görülmüştür (Shah *et al.* 2010).

Yağlarla kirlenmiş mutfak atıksularının arıtımında lipaz üreten mikroorganizmalar kullanmışlardır (Bhumibhamon *et al.* 2011).

Bu çalışmada araştırmacılar ise *Trichoderma harzianum* türünün ürettiği lipaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu konulu araştırmada elde ettikleri lipaz enzimini 20 dakika boyunca 20 ila 80°C sıcaklıklarda maruz bırakmışlar. Sonuçta, enzimin sadece 20 ila 40°C arasında yüksek stabilite gösterdiğini, sıcaklığın artması ile enzimin tamamen aktivitesini kaybettiği görülmüştür (Ülker *et al.* 2011).

Yapılan bu araştırmada *Pseudomonas aeruginosa* KM110 bakterisinden lipaz üretimi gerçekleştirilmiş çalışmamıza benzer şekilde yapılan aktivite çalışmaları sonucunda, sustrat olarak zeytinyağı kullanılarak pH 7.0'da maksimal lipaz aktivitesini 0,46U/ml olarak tespit etmişlerdir (Mobarak-Qamsari *et al.* 2011).

İmmobilize lipaz kullanarak atık kızırtma yağından biyodizel üretimini gerçekleştirmişlerdir (Chesterfield *et al.* 2012).

Toprağa dökülen yağlar üzerinden bakteriyel lipaz izlemesi, üretimini, seçilmesi, tanımlanması, üretimi ve optimizasyonu araştırılmıştır. Çalışma sırasında yağ işleme fabrikalarından yağ dökülen topraktan bakteriyel lipaz üreticileri izole edilmiştir. Çalışmalar sırasında izole edilen 20 tane türün bir tanesi morfolojisine, fizikokimyasal özelliklerine göre ve 16s rRNA sequensi göz önüne alınarak diğerlerine göre daha fazla lipaz aktivitesi göstermiştir. Çalışmada kuluçka süresi, ortam pH'ı, sıcaklık, çalkalama, inokulum, konsantrasyon, karbon ve azot kaynağının lipaz üretimine etkileri incelenmiştir. Bir lipaz üreten bakteri olan BLP2 *Pseudomonas gessardii*'nin 37°C, pH 7 ve 48 saat sonunda maksimum lipaz ürettiği çalışmalar sırasında gözlemlenmiştir.

Aynı bakteri ortama %1 proteaz pepton eklendiği zaman enzimatik üretimin 168,7 U/ml olarak artığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Pseudomonas gessardii*'nin endüstriyel düzeyde ekstraselüler lipaz üretiminde çok uygun olduğu görülmüştür (Veerapagu *et al.* 2013).

Yapılan çalışmanın Türkiye'den izole edilmiş 32 tane izolat ile 13 tane standart suşa ait termostabil lipaz enzimi üretimleri araştırılmıştır. 45 adet bakteriden elde edilen termostabil lipaz enzimini üretebilenler, fenol kırmızısı bulunduran zeytinyağlı ve tribütirinli katı besiyerleri kullanılmıştır. Tarama deneyleri sonucunda ise 11 tane izolat ve 7 tane suşun toplamında 18 bakteri, kalitatif olarak termostabil lipaz enzimi üretimi tespit edilmiştir. Seçilmiş olan bu 18 bakteri lipaz enzimi üretim miktarı kantitatif olarak bulunurken bu bakterilerin tribütirin ve zeytinyağının substrat şeklinde kullanılmış ve iki farklı enzim üretimi yapılan besiyerinde 60°C'de ve pH 7.0'da 24, 48 ile 72 saat sürede gelişimleri sağlanmıştır. Bu süre zarfında kültürlerin absorban değerleri ölçülürken diğer enzimlerin aktivite ölçümünde kullanılmış olan kültürlerinde yaş ağırlığı ile besiyerinin pH değerlerindeki değişimlerde ölçülmüştür. Aktivite tayini yapılırken substrat olarak kullanılan paranitrofenol bütirat ile enzim aktivitesi 50 nm olan ve pH 7.0 olan fosfat tamponunun 60°C değerlerle gerçekleştirilmesidir. Zeytinyağının substrat şeklinde kullanılmış besiyerlerinde 0.008-0.052 U/ml değerlerinde tribütirinin substratı olarak kullanıldığı besiyerlerinde ise 0.002-0.019 U/ml değerleri arasında lipaz enzimi aktivitesi gözlemlenmiştir. İzolatlar ile standart besiyerlerinin lipaz enzimi üretim miktarını karşılaştırmak için ölçülmüş olan enzim miktarları, her bir kültürdeki yaş ağırlıklarına bölünüp hücrelerin her birine düşen enzim miktarının U/mg cinsinden hesaplanarak bir seri meydana getirilmiştir. Bu seriye göre maksimum termostabil lipaz enzimi aktivitesi zeytinyağı besiyerinde, *GeoBacillus termodenitrificans subsp. calidus* F84b(0.008U/mg) ve F84a(0.009 U/mg) izolatları ile *GeoBacillus termodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup> standart suşu sayesinde üretildiği tespit edilmiştir. Bunun yanında *GeoBacillus stearothermophilus* A113 izolatının tribütirinli besiyerinde maksimum lipaz enzimi aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Koç 2013).

Alkalofilik bakteri olan *Bacillus* sp tarafından üretilen ekstracelluler lipaz miktarını arttırmak için kritik büyüme parametrelerinin optimizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Çalışmalarda kullanılan lipaz üreten bakteriler yağ ile kontamine olmuş topraktan izole edilmişlerdir. Yapılan çalışmalarda sadece kalitatif olarak değil aynı zamanda kantitatif olarak da bakteri türleri incelenmiştir. Maksimum ekstracelluler lipaz aktivitesinden dolayı (0,612U/ml) alkalofilik bakteri türü olan *Bacillus* sp. KS4 seçilmiştir. Çalışmalar sırasında lipaz üretiminin artırılması için daha fazla optimizasyon çalışmaları istatistiksel bir yaklaşım kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda seçilen soy tarafından maksimum lipaz üretimi için zamana göre tek değişken yaklaşımı ile pH, inkübasyon sıcaklığı, karbon kaynağı, azot kaynağı, yüzey aktif madde ve metal iyonu gibi çeşitli kültür ortam parametreleri incelenmiştir. Çalışmalar sırasında karbon kaynağı olarak zeytinyağı, surfaktant olarak tween80, metal iyonu olarak MgCl<sub>2</sub> ortam parametreleri olarak kullanılmıştır. Maksimum lipaz üretimi sırasıyla %1.16 zeytinyağı, %0,12 tween80, 5,99 mM MgCl<sub>2</sub> ve %7,16 inokulum miktarında elde edilmiştir. Doğrulama deneyleri modelin geçerliliğini ve tahmin edilen sonuçları doğrulamıştır. Üretim ortamının optimizasyonu lipaz üretiminde 3,54'lük bir artışa yani 0,612U/ml'dan 2,17 U/ml'ye çıkmasını sağlamıştır (Sharma *et al.* 2014).

Bu çalışmada topraktan izole edilmiş yeni fungal bir kaynaktan lipaz üretimi elde edilmeye çalışılmıştır. Lipaz kaynağı olarak ise Kocaeli, İlimtepe bölgesinden topraktan izole edilen ve daha sonra 18S rRNA dizi analizi sonucu *Trichoderma citrinoviride* olduğu saptanan fungus kullanılmıştır. Lipaz üretiminde önem arz eden üretim ortamı koşulları ve reaksiyon ortam parametreleri incelenmiştir. Çeşitli azot ve karbon kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi incelenmiş ve lipaz üretimi için en uygun karbon kaynağının glukoz en uygun azot kaynağının ise pepton olduğu belirlenmiştir. Zeytinyağının ise çalışmada kullanılan en uygun karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir. Üretim için en uygun inkübasyon koşulları pH 5.5, sıcaklık 30°C ve inkübasyon süresinin 4 gün olduğu belirlenmiştir. Reaksiyon ortam koşullarında inkübasyon süresinin 30 dakika, inkübasyon sıcaklığının 40°C ve %1 substrat konsantrasyonunun lipaz üretimi için en uygun koşullar olduğu belirlenmiştir. Karbon kaynağı için şeker fabrikası atığı olan melas kullanılmıştır. Besiyeri içeriğinin zengin yapısına rağmen

melaslı ortamda lipaz sentezinde düşüş görülse de maliyetin düşük olması bu olumsuzluğu kapatmaktadır (Aykıl 2014).

Endüstriyel lipazlar genel olarak hücre dışında lipaz enzimi üreten mikroorganizma türlerinden sağlanmaktadır. Mikrobiyal lipaz enzimleri ekseriyetle sıvı ortamda üretilmekte olup aktiviteleri azot/karbon kaynağının ortam pH'sından, tür ve derişiminden, metal iyonlarından ve sıcaklıktan etkilenmektedirler. Yapılan çalışmada Eskişehir ili Hasanbey Köyünden izole edilen *Rhodotorula mucilaginosa* lipaz kaynağı olarak kullanılmıştır. Lipaz enzimi üretiminde önem arz eden ortam koşulları ve ortam parametreleri araştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak bitkisel yağlar (fındık yağı, zeytinyağı, ayçiçek yağı, soya yağı ve mısır özü yağı) ve şeker olarak (fruktoz, maltoz, galaktoz, laktoz, glukoz ve sukroz), azot kaynağı olarak (pepton, proteose pepton, kazein, amonyum oksalat, amonyum sülfat, maya özütü, üre ve amonyum karbonat) içeren ortamlarda lipaz aktivitesi araştırılmıştır. Optimal ortam koşullarını belirlemek için, 10-40°C sıcaklık aralığında ve 3.0-9.0 başlangıç pH aralığında üretimler yapılmış ve bu değişkenlerin lipaz enzimi aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Reaksiyon ortamında inkübasyon sıcaklığı 30-90°C ve süresi 30-90 dakika aralığındaki lipaz aktivitesi incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda *Rhodotorula mucilaginosa*'nın lipaz ürettiği, optimal ortam koşulları olarak pH'nın 5.0, sıcaklığın 30°C, çalkalama hızı 200 rpm, karbon kaynağının %1 derişimde zeytinyağı, en uygun azot kaynağının pepton olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Karbon ve azot kaynaklarının zeytinyağı ile birleşmesi sonucunda lipaz aktivitesinin yükseldiği belirlenmiştir. Optimum reaksiyon koşulları incelemesinde, inkübasyon sıcaklığının 60°C, inkübasyon süresinin 50 dakika ve substrat konsantrasyonu %1 oranında zeytinyağı olarak belirlenmiştir. Şeker fabrikası atığı olan melas incelenerek lipaz üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Hammamchi 2014).

Yapılan bu çalışmada, hücre dışı proteazların izolasyonu ve karakterizasyonu konusunda gerçekleştirilen çalışmada araştırmacılar, *Streptomyces flavogriseus* HS1 aktinobakteri türünden elde ettikleri proteaz enziminin pH 6 ila 10 dereceleri arasında %80 civarında termal stabiliteye sahip oldukları belirtilmiştir. Araştırmacılar, bu enzimi

bir saat boyunca 40 ve 50°C’de bekletildiğinde yaklaşık olarak sırasıyla %10 ve 25 civarı aktivite kaybettiğini, 60°C’de bir saat bekletildiğinde ise aktivitenin tamamen yok olduğunu rapor etmişlerdir (Ghorbel *et al.* 2014).

Lokal şekilde izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* bakterisiyle agro-endüstriyel atıklar kullanılmış ve lipaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarında 74,117 U/ml’lik aktivite ile en fazla enzim üretimi yerfıstığı kekinde incelenmiştir. Sonrasında ardı sıra, hindistan cevizi (61,911 U/ml), buğday kepeği (49,614 U/ml ) ve pirinç kepeği (28.165 U/ml) izlenmeye devam edilmiştir. Yerfıstığı keki ve Hindistan cevizi içeren kültür ortamında lipaz üretimi için en uygun pH 6.0, buğday kepeği ve pirinç kepeği ortamında ise pH 7.0 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm substratlar için maksimum lipaz üretiminin %60’lık nem oranında başarı gösterdiği gözlemlenmiştir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 49,1 KDa olarak belirlenmiştir (Neethu *et al.* 2015).

Yapılan çalışmada, Curculionidae (Coleoptera) familyasına ait olan 5 türün *Sitona pucticollis* (Stephens1831); *Hypera postica* (Gyllenhal, 1813); *Eusomus ovulum* (Germar, 1824); *Lixus cardui* (Olivier, 1808); *Curculio nucum* (Linnaeus, 1758) sindirim sistemlerinde yer alan bakteri floraları araştırılmıştır. Numuneler 2014’te Mayıs/Ağustos ayları arasında Kırşehir bölgesindeki farklı lokalitelerden elde edilmiştir. Yakalanmış olan numuneler steril tüpler içine alınarak laboratuvara canlı şekilde getirilmiş; disekte edilip sindirim sistemleri dışarı çıkarılmış ve steril ortamda nutrient agar plaklara yayma ekimişlemi yapılarak gelişen tek koloniler için saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu izolasyon işleminden 17 adet izolata ulaşılmıştır. Biyokimyasal testler, fizyolojik testler, morfolojik testler ve moleküler tanı yöntemi yapılarak (16S rRNA gen bölgesi DNA dizi analizi ve 16S rRNA PCR) izolatların tanımlanma işlemi yapılmıştır. Genotipik ve fenotipik verilerin beraber değerlendirilmesiyle 17 adet izolatın tanısı ve karakterizasyonu yapılmış olup 11 adet izolatın farklı bakteri türüne ait (*Pseudomonas trivialis*, *Bacillus pumilus*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Klebsiella pneumonia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea agglomerans*, *Lactococcus garviae* ve *Bacillus amyloliquefaciens*) olduğu tespit edilmiştir (Erbey 2015).

Böcek ilacına dirençli olan böceklerin mikroflorasının ve böcek öldürücülerin biyolojik bakımdan parçalanması için kullanılan bakterilerin izolasyonu için potansiyel olabileceği düşünülmüştür. Çalışmada a-endosulfan biyolojik bakımdan parçalanabilen toplamda 24 adet bakteri izolatu olan Dermaptera, Hymenoptera, Mantodea ve Orthoptera takımlarına ait böceklerin vücut parçaları mikroflorasından yalıtılmıştır. Bazı biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik özelliklerine dayanarak ve yağ asidi profillerine kaynak olarak *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Flavimonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* ve *Stenotrophomonas* cinsleri olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar değişik ortamlarda a-endosulfan kalıntılarının tedavisi amacıyla kullanılabilmesi belirlenmiştir (Özdam et al. 2016).

Bu çalışmada üç adet *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. izolatlarının *Tetranychus urticae* Koch'a (Acari: Tetranychidae) karşı kontrol potansiyellerinin ve lipaz enzimi, kitinaz enzimi ve proteaz enzimi aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece, daha öncesinde Coleoptera, Hymenoptera ve Lepidoptera'ya karşı entomopatojenik aktivite göstermiş olan *B. Bassiana* (PaF76, PaF09 ve PaF04) izolatları kullanılmıştır. Testte kullanılan organizma ise *T. Urticae*'dir. Üç değişik dozda hazırlanan süspansiyon ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  kodini  $ml^{-1}$ ) Tween 80'de hazırlanmış, 2ml olan tek dozdaki spor süspansiyonu el spreyi vasıtasıyla fasüyenin yaprak disklerinin alt yüzeyine püskürtülmüştür. *T. Urticae* türünün ölüm oranları beş gün süresince takip edilmiştir. Enzim aktivitelerini belirlemek için petri plate yöntemi kullanılmış ve koloninin etrafında oluşan açık zonlar enzim aktivitesinin varlığını kanıtlamıştır. Test edilmiş olan bütün fungus izolatları işlemde beş gün sonrasında %100 ve %64.2±5.6 arasında mortaliteye sebep olup *T.urticae* türüne patojenite etkiye sebep olmuştur. LT50 değerleri 3.72±0.5 ve 3.16±0.2 günleri arasında değişim göstermiştir. Sonuç olarak *B. bassiana* PaF izolatlarının Hymenoptera, Lepidoptera ve Coleoptera'yı kontrol potansiyellerinin olduğu kadar *T. urticae* türünün baskılama potansiyeline de sahip olduğu tespit edilmiştir (Örtücü and Albayrak İskender 2017).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Böcek Materyalleri

Çalışmada kullanılan böceklerin toplandığı bölge Erzurum ilinin Aziziye ilçesi güzergahına 10 km. uzaklıktaki daimi bir göletten toplanmıştır. Kullanılan böceklerin fotoğrafları Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te belirtilmiştir.



Şekil 3.1. *Hygrotus impressopunctatus* (Schaller, 1783) (Anonymous 2019b)



Şekil 3.2. *Rhantus suturalis* (W.S. MacLeay, 1825) (Anonymous 2019c)



**Şekil 3.3.** *Dytiscus circumflexus* (Fabricius, 1801) (Anonymous 2019a)



**Şekil 3.4.** *Laccobius sulcatulus* (Reitter, 1909)

### 3.2. Lipaz Üretici Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Çalışmada kullanılan 4 farklı sucul böcek ilk olarak %70'lik alkol içerisinde 15-20 saniye süreyle bekletilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Ardından, böceklerin bağırsakları steril şartlar altında çıkartılmış ve bir mikrosantrifüj tüpü içerisindeki steril fizyolojik suya aktarılmıştır. Tüpler yaklaşık 30 sn süreyle vorteks edilerek bağırsak florasındaki mikroorganizmaların steril fizyolojik su içerisine geçmesi amaçlanmıştır. Vorteks işleminin ardından tüp içerisindeki süspansiyondan 0,2 ml alınarak izolasyon amaçlı kullanılan agar besiyerinin üzerine yayılmıştır. Aşılana besiyerleri 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 24-48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda peptrilerde gelişen koloniler mikroskopta incelenerek bakteri ve maya kolonileri birbirinden ayırt edilmiştir. Bakteri olduğu düşünülen koloniler alt kültüre

alınarak saflaştırılmıştır. İzolasyon amaçlı hazırlanan besiyerinin içeriği 1 lt saf su içerisinde, 20 ml tributyrin, 2 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 gr  $\text{MgSO}_4$ , 0,2 gr  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 gr  $\text{NaCl}$ , 0,03 gr  $\text{FeSO}_4$  ve 20 gr agar olacak şekilde dizayn edilmiştir (pH 7,0).

### 3.3. İzolatların Taranması

İzole edilen ve saflaştırılan bakteriler bu aşamada bir ön tarama işlemine tabi tutulmuştur. Bu besiyerinin içeriği 1 lt saf su içerisinde 20 ml atık zeytinyağı (2 ml/100 ml), 2 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 gr  $\text{MgSO}_4$ , 0,2 gr  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 gr  $\text{NaCl}$  ve 0,03 gr  $\text{FeSO}_4$  olacak şekilde dizayn edilmiştir (pH: 7.0). Tarama çalışmaları sırasında eşit inokulasyonun sağlanması için her izolat için ön kültür hazırlanmıştır. Bunun için, test bakterileri ilk önce agar besiyerinde 48 saat süreyle aktive edilmiştir. Aktifleştirme işlemi sırasında bakteriler için trypticase soy agar (TSA) besiyeri kullanılmıştır. Daha sonrada agar besiyeri üzerinden bir öze dolusu bakteri hücreleri alınmış ve 100 ml TSB besiyeri (trypticase soy broth) içeren 250 ml'lik erlenmayerler içerisine aşılanmıştır. Erlenmayerler 150 rpm ve  $25^\circ\text{C}$ 'de 24 saat süreyle çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda bu kültürlerin 1 ml'si ( $600\text{ nm}$ 'de yaklaşık olarak aynı absorbans verecek şekilde kültürler steril fizyolojik su ile seyreltilmiştir) hazırlanan besiyerinin inokulasyonu için kullanılmıştır. Aşılanan besiyerleri 150 rpm ve  $25^\circ\text{C}$ 'de 24 saat süreyle çalkalamalı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Tarama deneyleri sonucunda en iyi lipaz üreticisi olduğu belirlenen izolatın teşhisi sekans analizine göre yapılmıştır.

### 3.4. F25 İzolatının Moleküler Tanısı

En iyi izolatın moleküler düzeyde teşhisi için ilk olarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun içinde izolat TSA besiyerinde  $25^\circ\text{C}$ 'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda gelişen tek koloniden TSB besiyeri içeren sıvı besiyerine inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Aşılanan besiyeri çalkalamalı inkübatörde  $25^\circ\text{C}$ 'de, 150 rpm de 2 gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra saflığı kontrol edilen kültürden Promega wizardR genomic DNA purification kit (A2360)

protokolüne uygun olarak genomik DNA izoalsyonu gerçekleştirilmiştir. DNA miktarı 260 nm'deki genetik materyalin temizliği yani protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de absorbans ölçümüyle belirlenmiştir. İzolattan saflaştırılan olan genomik DNA'dan, 16S rRNA gen bölgesi UNI16S-F (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA) ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA) primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltılmış elde edilen PCR ürünlerinin 5µl'si %1'lik agaroz jelde yürütülerek istenen bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığı kontrol edilmiştir. PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA genleri, pGEM-T Easy klonlama vektörüne, satıcı firmanın kullanma klavuzunda belirttiği konsantrasyon ve şartlar sağlanarak klonlanmıştır. Klonlama sonucunda gelişen kolonilerden rekombinant plazmitler, Promega firmasının belirttiği koşullara uygun bir şekilde “Wizart<sup>R</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System” plazmit izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiş ve sekans analizleri yaptırılmıştır (Macrogen, Hollanda). Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan dizilerle karşılaştırılarak bakterilerin tür seviyesindeki tanılamaları yapılmıştır.

### 3.5. F25 İzolatıyla Sıvı Kültürde Lipaz Üretimi

Bu aşamada deneyler, yüksek aktivite verildiği belirlenen izolat ile 100 ml bazal besiyeri içeren 250 ml'lik erlenler içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda tyriptic soy broth besiyerinde geliştirilen bakterilerin ön kültürünün 1 ml'si yukarıda da belirtildiği gibi erlen içerisindeki bazal besiyerinin aşılmasında kullanılmıştır. Besiyeri inokule edildikten sonra 150 rpm ve 25°C'de 24 saat süreyle çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Optimizasyon deneyleri sırasında ilk olarak en iyi kültür pH'sı (pH 4-8) test edilmiştir. Bunun ardından, farklı sıcaklık değerleri (20-35°C), atık yağ konsantrasyonları (10-40 ml/l) pepton (0-5gr/l) ve Tween 80 (0-8 ml/l) konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri (12 saat aralıklarla 0-96 saat) test edilmiştir.

### 3.6. Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İnkübasyon süresinin sonunda kültürlerden alınan 5 ml örnek 10000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve ardından hücreler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant lipaz kaynağı olarak kullanılmıştır. 15 ml'lik santrifüj tüpüne 100 µl numune, 1000 µl substrat (0,013 M p-nitrofenil palmitat) ve 1000 µl tampon (0,05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu pH 7,0) eklenerek 30°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonun durması için 2000 µl 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklenmiş ve 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernantantın 410 nm'de absorbansı ölçülmüş ve enzim aktivitesi 13290 (µM-1cm-1) absorbtivite katsayısı kullanılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

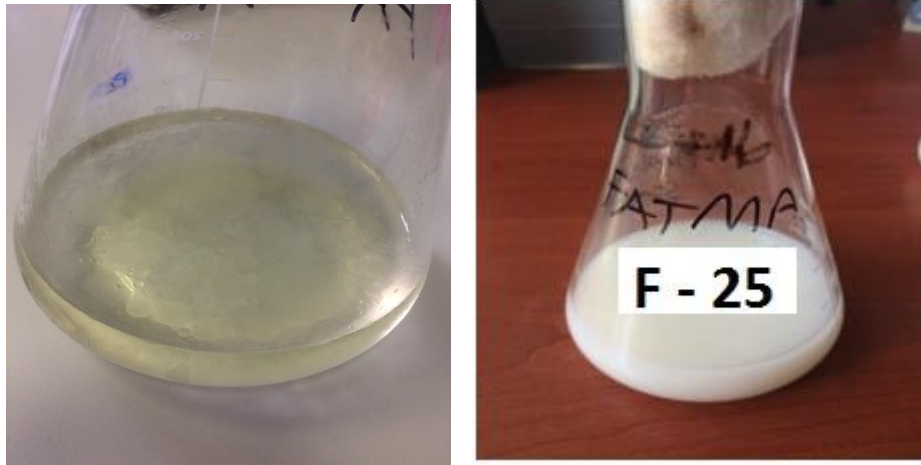
### 4.1. Bakterinin İzolasyonu ve Taranması

Çalışmada farklı ortamlardan toplanan 4 farklı sucul böcek türü secilmiş ve bu böceklerin bağırsakları lipaz üreten mikroorganizmaların izolasyon kaynağı olarak kullanılmıştır. İzolasyon çalışmaları sonucunda agar besiyeri üzerinde gelişen bakteri izolatu çizgi ekimi ile saflaştırılmış ve çalışmanın takip eden aşamalarında kullanılmıştır. Çalışmada dört böcekten bir tanesinin (*Laccobius sulcatulus*) bağırsağından lipaz üreten bakteri ya da maya izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bununla birlikte TSA üzerinde yapılan izoalsyon çalışmaları TSA üzerinde gelişen çok sayıda bakteri kolonisine rastlanılmıştır. Tributyrin içeren izolasyon besiyeri üzerinde diğeri sucul böcek *Hygrotus impressopunctatus*' un bağırsağından 3, *Rhantus suturalis*' inkinden 2, *Dytiscus circumflexus*' unkinden ise 3 farklı bakteri straini izole edilmiştir. Bu üç böceğin bağırsaklarından yapılan izolasyonlarda tributyrin besiyerine oranla TSA besiyeri üzerinde de daha çok sasyıda bakteri kolonisine rastlanılmıştır. Tributyrin besiyerinde izole edilen toplam 8 izolat ise daha sonra sıvı kültürde lipaz üretme yetenekleri ve hücre büyüme performansları bakımından karşılaştırılmıştır. Sekiz izolat arasında da maksimum lipaz aktivitesine (47 U/L) *Rhantus suturalis* türünden izole edilen F25 izolatu ile ulaşılmıştır. Bu izolat ise 16S sekans analizine göre *Bacillus megaterium* olarak teşhis edilmiş ve çalışmanın takip eden aşamalarında kullanılmıştır.

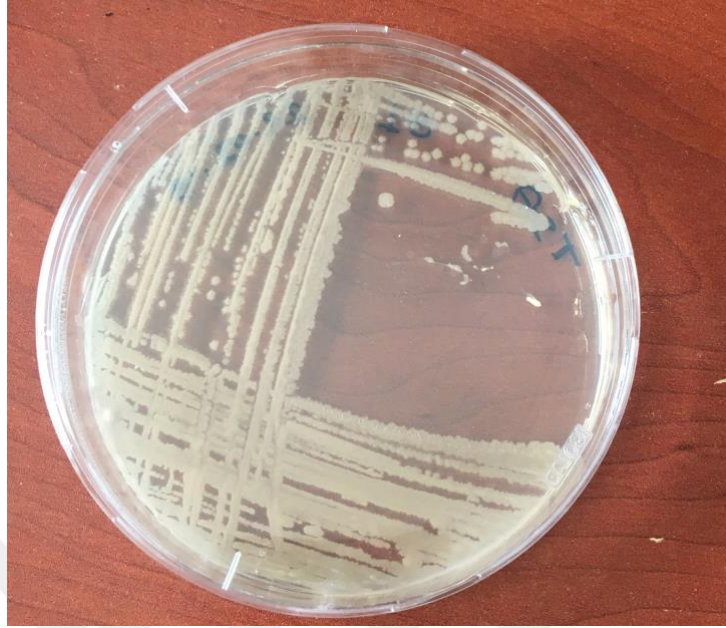
**Çizelge 4.1.** Safılaştırılmış izolatların lipaz aktivitesi bakımından taranması

	<b>Böceğin Toplandığı ortam</b>	<b>Bakteri izolat kodu</b>	<b>Aktivite (U/L)</b>
<i>Hygrotus impressopunctatus</i>	Daimi gölet, Erzurum-Aziziye yolu, 10.km	H3	35
		H7	27
		H11	22
<i>Rhantus suturalis</i>	Daimi gölet, Erzurum-Aziziye yolu, 10.km	F25*	47*
		F28	33
<i>Dytiscus circumflexus</i>	Daimi gölet, Erzurum-Aziziye yolu, 10.km	D7	28
		D8	23
		D11	30
<i>Laccobius sulcatulus</i>	Daimi gölet, Erzurum-Aziziye yolu, 10.km	-	-

Kültür şartları: sıcaklık 25°C, pH:7.0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 2ml/100ml, Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/lt, pepton 0 gr.



**Şekil 4.1.** Lipaz aktiviteli kültürde beyaz renk oluşumu (solda inokule edilmemiş besiyeri, sağda ise 48 saatlik F25 izolatının kültürü)



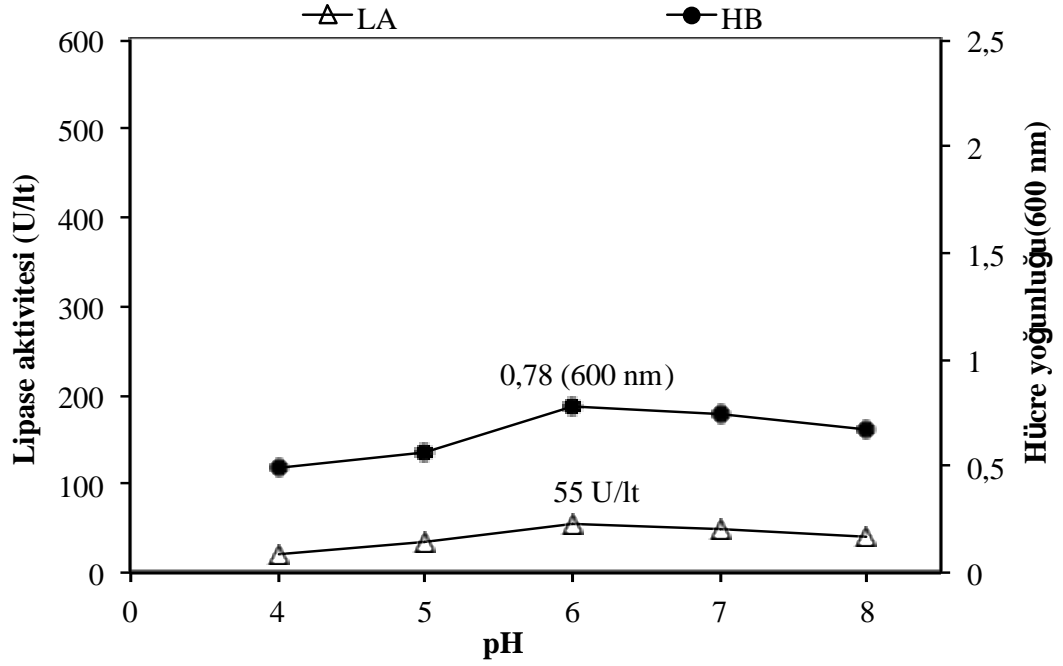
**Şekil 4.2.** Saflaştırılan F25 izolatının TSA'daki görüntüsü

Çalışmada en iyi izolatla lipaz üretimi için en iyi pH derecesi belirlenmiştir. Çizelgeden de görüleceği deneyler 25°C'de gerçekleştirildiğinde besiyerindeki maksimum lipaz üretimi (55 U/L) ve hücre büyümesi (0,78<sub>600nm</sub>) pH 6.0'da gerçekleşmiştir. Bu değer in altında ve üstünde olan pH'larda lipaz aktivitesinde ve hücre büyümesinde kademeli azalmalar görülmüştür.

**Çizelge 4.2.** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi üzerine kültür pH'sının etkisi

pH	Aktivite (U/L)	Hücre büyümesi (600 nm)
4	21	0.49
5	36	0.56
6 *	55*	0.78*
7	48	0.75
8	41	0.67

\* Kültür şartları: sıcaklık 25°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 2ml/100ml, Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/lt, pepton 0 gr.



**Şekil 4.3.** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi üzerine kültür pH'sının etkisi

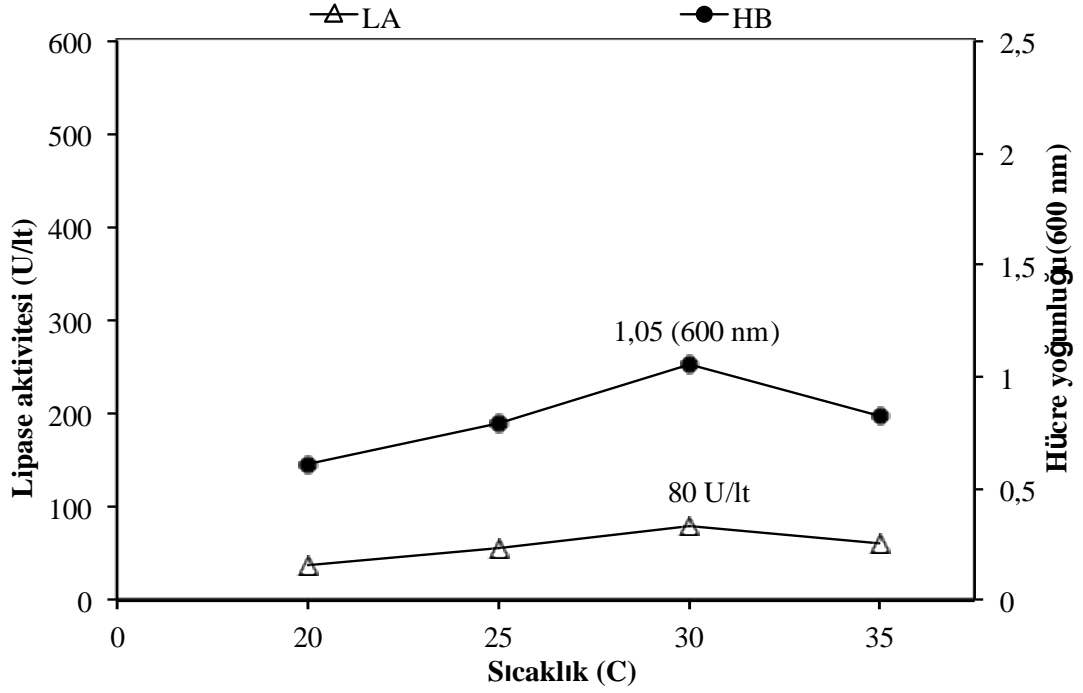
Kültür şartları: sıcaklık 25°C, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 2ml/100ml, Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/lt, pepton 0 gr.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında besiyerinin pH'sı 6.0'da sabit tutularak lipaz üretimi ve hücre büyümesi için farklı sıcaklıklar (20°C-35°C) test edilmiştir. Çizelgeden de görüleceği gibi kültürde maksimum lipaz aktivitesine (81 U/L) ve hücre büyümesine 30°C'de ulaşılmıştır.

**Çizelge 4.3.** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Aktivite değeri	Hücre büyümesi (600 nm)
20	38	0.61
25	56	0.79
30*	80*	1.05*
35	61	0.82

Kültür şartları: pH 6.0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 2ml/100 ml, Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/lt, pepton 0 gr.



**Şekil 4.4** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

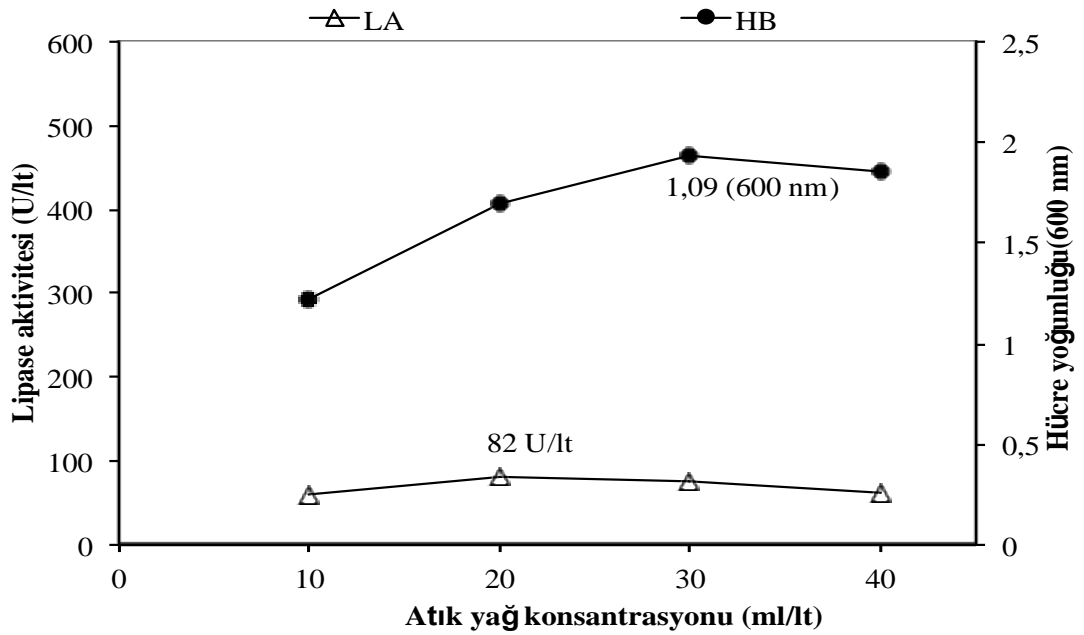
Kültür şartları: pH 6.0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 2ml/100 ml, Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/l, pepton 0 gr.

Farklı atık yağ konsantrasyonları test edildiğinde maksimum lipaz üretimine (82 U/t) ve hücre büyümesine (1,09<sub>600nm</sub>) %2'lik (20 ml/l) yağ konsantrasyonunda ulaşıldığı, daha yüksek yağ konsantrasyonlarının ise kademeli olarak hem hücre büyümesini hem de lipaz üretimini azalttığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi yağ konsantrasyonunun etkisi.

Yağ miktarı (ml/lt)	Aktivite değeri	Hücre büyümesi (600 nm)
10	60	0.80
20*	82*	1.09*
30	75	0.98
40	63	0.88

Kültür şartları: sıcaklık 30°C, pH 6.0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/lt, pepton 0 gr.



**Şekil 4.5.** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi üzerine yağ konsantrasyonunun etkisi

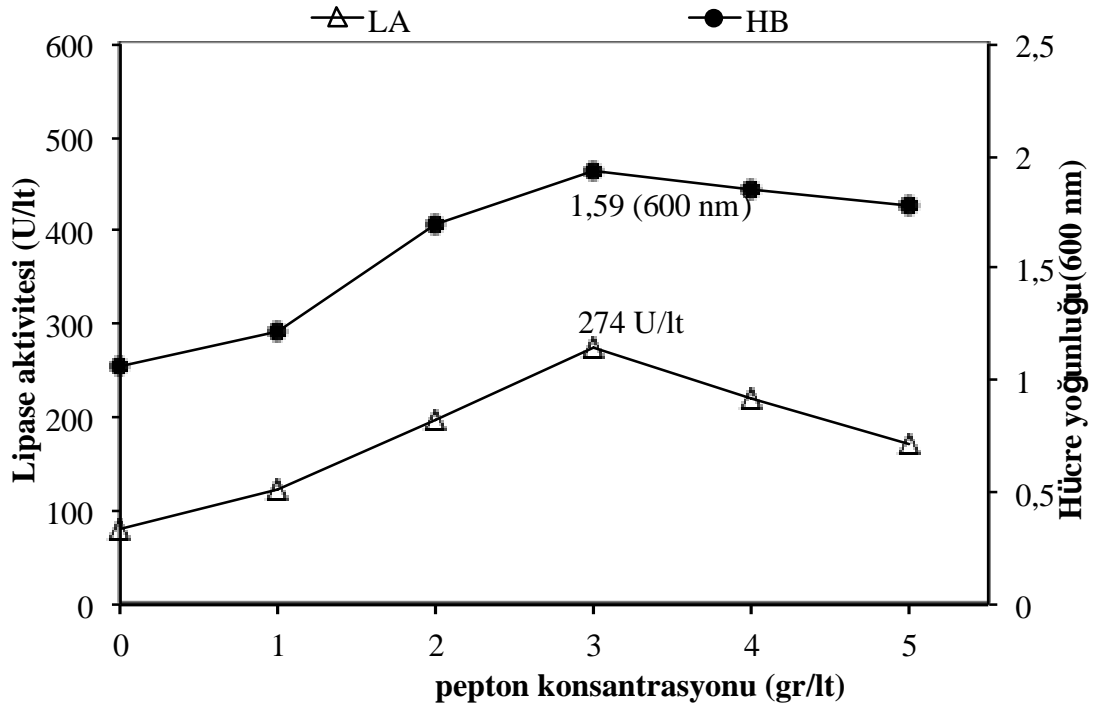
Kültür şartları: Sıcaklık 30°C, pH 6.0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/lt, pepton 0 gr.

Pepton miktarının lipaz üretimi üzerine etkisi test edilirken 100 ml besiyerine 0- 5 gr/lt konsantrasyonda pepton eklenmiştir. Çizelge de görüleceği gibi besiyerinde maksimum lipaz aktivitesine (274 U/L) ve hücre büyüme performansına (1.59<sub>600nm</sub>) 3 gr/lt pepton içeren besiyerinde ulaşılmıştır.

**Çizelge 4.5.** Lipaz üretimi üzerine pepton miktarının etkisi

Pepton (gr)	Aktivite değeri	Hücre büyümesi (600 nm)
0	81	1.06
1	124	1.22
2	198	1.36
3 *	274*	1.59*
4	221	1.48
5	173	1.24

Kültür şartları: sıcaklık 30°C, pH 6,0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 20 ml/lt ve Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/lt.



**Şekil 4.6.** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi üzerine pepton konsantrasyonunun etkisi.

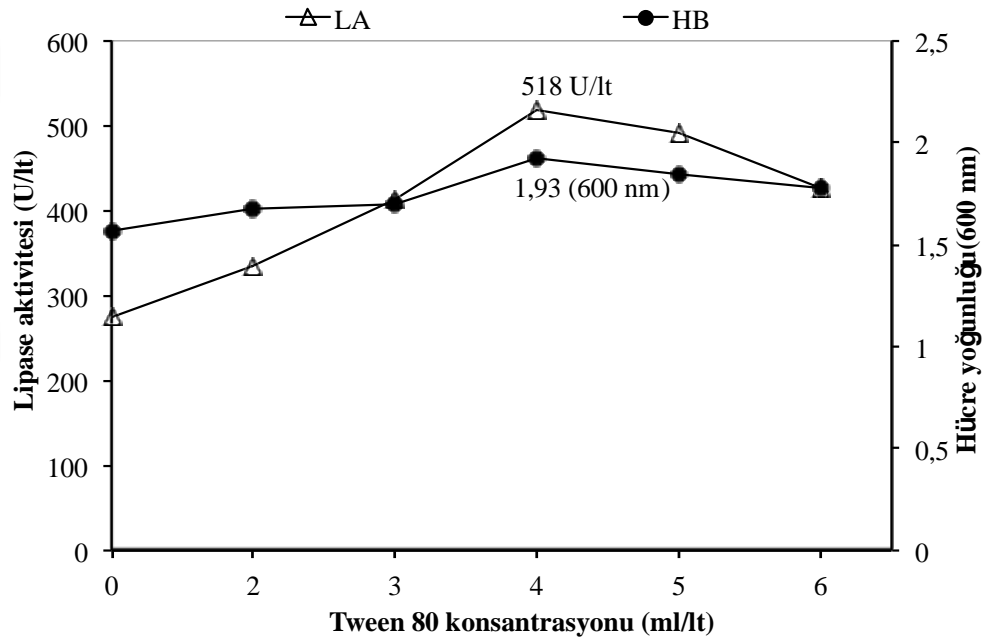
Kültür şartları: sıcaklık 30°C, pH 6,0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 20 ml/lt ve Tween 80 konsantrasyonu 0 ml/lt.

Tween 80 konsantrasyonu lipaz üretimi üzerine etkisi incelenirken 100 ml besiyerine 0-20 ml/lt konsantrasyonunda Tween 80 eklenmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere maksimum lipaz üretimi (518 U/L) ve hücre büyümesi (1.93<sub>600nm</sub>) 4 ml/lt Tween 80 konsantrasyonunda başarılmış, daha yüksek konsantrasyonların enzim üretimi ve hücre büyümesi üzerinde inhibisyon etkisi yaptığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.6.** Lipaz üretimi üzerine Tween 80 konsantrasyonunun etkisi

Tween-80 (ml/lt)	Aktivite değeri	Hücre büyümesi (600 nm)
0	275	1.57
2	336	1.68
3	413	1.70
4*	518*	1.93*
5	493	1.85
6	428	1.78

Kültür şartları: sıcaklık 30°C, pH 6,0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 20 ml/lt ve pepton konsantrasyonu 3 gr/lt.

**Şekil 4.7.** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi üzerine Tween 80 konsantrasyonunun etkisi.

Kültür şartları: sıcaklık 30°C, pH 6,0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 20 ml/lt ve pepton konsantrasyonu 3 gr/lt.

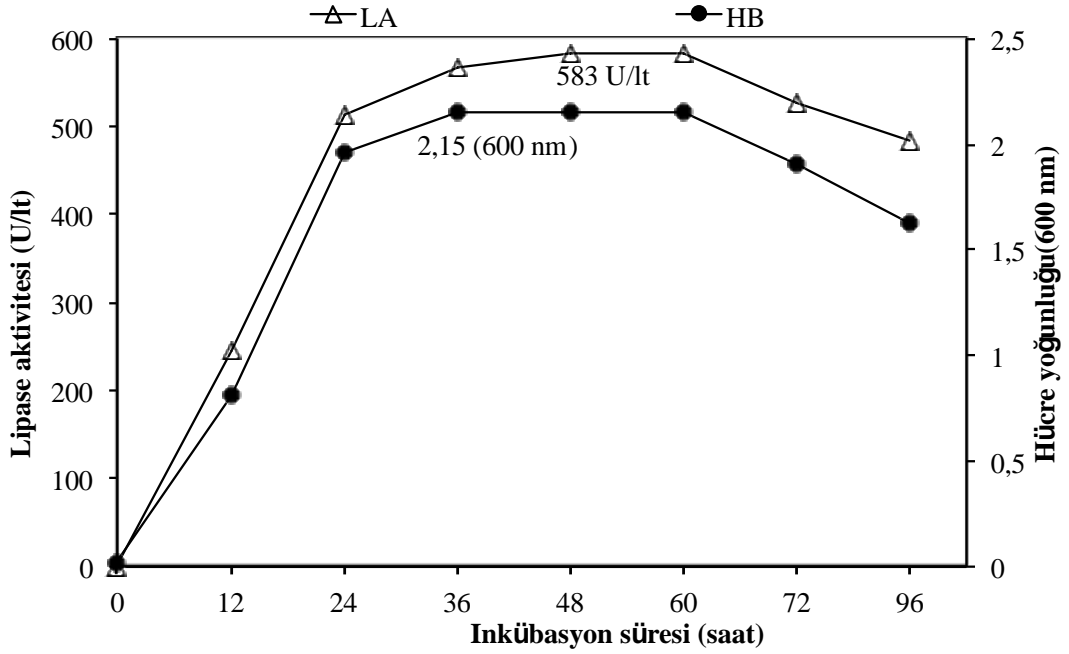
İnkübasyon süresinin lipaz aktivitesi ve hücre büyümesi üzerine etkisi araştırılırken yukarıda bahsedilen optimal parametreler sabit tutulup 96 saat süresince 12 saatlik aralıklarla kültür sıvısından alınan örneklerden analizler gerçekleştirilmiştir. Çizelgede de görüleceği gibi maksimum hücre absorbansına ( $2.15_{600nm}$ ) 36 saat maksimum lipaz aktivitesine (583 U/L) ise 48 saat sonra ulaşılmıştır. Hücre absorbansı 36-60 saatler arasında sabit kalmış ve 60. saatten sonra azalmıştır. Lipaz aktivitesi ise 48-60 saatler arasında sabit kalmış 60. saatten sonra lipaz aktivitesi de azalmaya başlamıştır. Hem

lipaz hemde hücre büyümesinde maksimum artışlar inkübasyonun 12-24 saatleri arasında gerçekleşmiştir.

**Çizelge 4.7.** Lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Süre (saat)	Aktivite değeri	Hücre büyümesi (600 nm)
12	245	0.81
24	514	1.96
36	568	2.15*
48	583*	2.15
60	583	2.15
72	527	1.91
96	483	1.63

Kültür şartları: sıcaklık 30°C, pH 6,0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 20 ml/lt, Tween 80 konsantrasyonu 4ml/lt ve pepton konsantrasyonu 3 gr/lt.



**Şekil 4.8.** *Bacillus megaterium* ile lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Kültür şartları: sıcaklık 30°C, pH 6,0, çalkalama hızı 150 rpm, inkübasyon süresi 24 saat, yağ konsantrasyonu 20 ml/lt, Tween 80 konsantrasyonu 4ml/lt ve pepton konsantrasyonu 3 gr/lt.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerinin Dizayn Edilmesi, Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Taranması

Günümüz biyoteknolojik gelişmelerle fazlaca üretilen ve ticari önemi oldukça fazla olan ürünlerden birisi de enzimlerdir. Endüstriyel enzimler ile ilgili yapılan çalışmalar ürünlerin kullanım alanlarının çeşitlilik göstermesi ve ekonomik olarak değerlerinin oldukça yüksek olması sebebiyle oldukça önem arz etmektedir (Gül 2013). Endüstri alanında oldukça geniş bir uygulama alana sahip olan biyokatalizör olarak karşımıza çıkan lipaz enzimi mantar, maya, bakteri, hayvan ve bitki kaynaklı olabilmektedirler. Lipaz enziminin üretiminde farklı bakteri türleri olarak (*Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Streptomyces* sp. ve *Aeromonas* sp.) ve mantar türleri olarak (*Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. carneus*, *Candida cylindracea*, *Geotrichium candidum*, *Fusarium solani*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei* ve *Rhizopus arrhizus*) kullanılabilir (Treichel *et al.* 2010).

Yapılan çalışmalarda karasal böceklerin bağırsaklarında *Aeromonas*, *Chrysobacterium*, *Asaia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Proteus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Micrococcus* ve *Serratia* gibi birçok değişik bakterinin yaşadığı belirtilmiştir (Dillon *et al.* 2004; Dharne *et al.* 2006; Valiente-Moro *et al.* 2013; Minard *et al.* 2013; Chandel *et al.* 2013; Jupatanakul *et al.* 2014). Araştırmacılar ise bu mikroorganizmaların böceklerin gelişiminde, üremesinde ve patojenlere karşı direnç göstermesinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Hatta bu bakterilerin böceklerin barsaklarında sindirim (lignosellülozik ve nişasta yıkımında) olaylarında, metanogenez, asetogenez ve azot fiksasyonu olaylarında ve düşük redoks potansiyelinin devam ettirilmesinde görev aldığı belirtilmiştir (Leadbetter *et al.* 1999; Fukatsu and Hosokawa 2002; Moran *et al.* 2005; Azambuya *et al.* 2005; Kudo 2009).

Karasal böceklerin bağırsaklarında bulunan bakterilerin sindirime yardımcı olma potansiyelini göz önüne alan araştırmacılar ise amilaz, sellulaz, xylanaz, pektinaz ve

proteaz gibi enzimleri üretme yeteneğine sahip olan bakterileri bu böceklerin bağırsaklarından izole etme yoluna gitmişlerdir (Visotto *et al.* 2009; Prem Anand *et al.* 2010; Adams *et al.* 2011; Huang *et al.* 2012; Prasanna *et al.* 2014).

Bazı araştırmacılar sucul böceklerin bağırsaklarında da bakterilerin yaşadığını göstermiştir (Sazama *et al.* 2017). Bununla birlikte, karasal böceklerin aksine sucul böceklerin bağırsaklarında yaşayan bakterilerin amilaz, lipaz, sellulaz ve lipaz gibi hidrolitik enzimleri üretme kapasiteleri hiç bir çalışmada gösterilmemiştir. Bu yüzden, mevcut çalışmada sucul ortamlarda yaşayan böceklerin lipaz enzimlerini üretme kapasitesine sahip olan mikroorganizmaların izolasyon kaynağı olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır.

Lipaz üreten mikroorganizmaların izolasyonunda %0,5 pepton, %0,3 maya ekstratı ekstratı, %1 tributyrin ve %2 agardan oluşan Tributyrin agar besiyeri yaygın olarak tercih edilmektedir. Bununla birlikte, bu besiyerinin içeriğinde pepton ve maya ekstratını bulunmaktadır (Komesli 2015). Bu bileşenlerde, besinsel ihtiyacı fazla olan mikroorganizmaların gelişmelerine de imkan tanımaktadır. Besinsel ihtiyacı fazla olan mikroorganizmalarda endüstriyel çalışmalarda çok fazla tercih edilmemektedir. Bu yüzden mevcut çalışmanın izolasyon aşaması, Komesli (2015)' ün çalışmasında olduğu gibi bu selektif besiyeri yerine ucuz mineral tuzlardan ve Tributyrin' den oluşan besiyeri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ancak, bu böceklerin bağırsak mikroflarasındaki bakteri çeşitliliğini ortaya koymak amacıyla tryptic soy agar (TSA) besiyerinde de izolasyonlar yapılmıştır.

TSA üzerinde gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarında dört böceğin bağırsağından da bakteri izolatları elde edilmiştir. Tributyrin agar besiyeri üzerinde dört böcek örneğinin üçünün (*H. impressopunctatus*, *R. suturalis* ve *D. circumflexus*) bağırsağından lipaz üretme kapasitesine sahip olan bakteri izolasyonu gerçekleştirilebilirken, bir böceğin (*Laccobius sulcatulus*) bağırsağından ise lipaz üreten bakteri izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu durum bu böceğin bağırsağında yaşayan bakterilerin besinsel ihtiyaçlarının fazla olması ve bu yüzden de tributyrin agar besiyerindeki bileşenlerin bu bakterilerin besinsel ihtiyaçlarını (aminoasit, vitamin gibi büyüme

faktörleri) karşılayamamasına bağlanmıştır. Çünkü mevcut çalışmada bu böceğin bağırsağından alınan örnekten tributyrin besiyerinin aksine TSA gibi zengin bir besiyeri üzerinde çok sayıda bakteri kolonisi elde edilmiştir. Ancak, TSA besiyerinde gelişenlerin besinsel ihtiyaçlarının fazla olacağı ve endüstriyel çalışmalarda çok fazla rağbet görmeyeceği düşünülerek çalışmanın takip eden aşamalarında bu izolatların kullanılmamasına karar verilmiştir. Benzer şekilde, *H. impressopunctatus*, *R. suturalis* ve *D. circumflexus* böcekleri içinde sadece tributyrin agar besiyerinde gelişenler seçilmiştir.

Çok sayıda mikroorganizmanın bir ürünü üretme yetenekleri açısından ön seçim işlemine tabi tutulması tarama (screening) olarak ifade edilmektedir. Tarama sırasında bütün mikroorganizma strainleri için aynı kültür şartları seçilmekte ve bu mikroorganizmaların istenilen ürünü üretme yetenekleri kıyaslanmaktadır. Belirlenen inkübasyon süresinin sonunda kültürlerde ürün analizi yapılmakta ve bu ürünü en iyi üreten mikroorganizma belirlenerek çalışmanın takip eden aşamalarında kullanılmaktadır. Tarama prosedürü özellikle iş yükünün ve zaman tüketiminin azaltılması açısından önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir (Komesli 2015). Bu yüzden mevcut çalışmada, üç böcek türünden izole edilen toplam 8 bakteri izolatu ön tarama deneyine tabi tutulmuş ve tarama deneyleri sonucunda F25 kodlu izoaltın en iyi lipaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bu bakteride moleküler düzeyde *Bacillus megaterium* olarak teşhis edilmiş ve çalışmanın takip eden aşamalarında kullanılmıştır.

*Bacillus* cinsi bakteriler, Bacillaceae familyasına dahil olup Gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir (Kalkan and Halkman 2006). Endospor oluşturma özellikleri vardır. Genel olarak beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptirler. Bazı türlerinde ise sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli koloniler de görülebilir. *Bacillus*'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur (Kalaylı *et al.* 2003).

*Bacillus megaterium* normalden büyük olan boyutlarıyla 'megat(h)erium' (yunanca; büyük hayvan) bu mikroorganizma 1.5x4 µm büyüklüğünde büyük bir bakteridir. *B.*

*megaterium* vejetatif formu ve spor büyüklüğü ile sitoplazmik membran biyosentezi, hücre duvarı, spor yapısı ve organizasyonu ve sporülasyon gibi morfolojik araştırmalar için oldukça uygundur (Vary 1992). *Bacillus megaterium* 1960'larda *B. subtilis*'ten önce sporülasyon için oldukça yaygın kullanılan model organizma olmuştur. Genellikle toprak bakterisi olan *B. megaterium* kurutulmuş gıdalardan pirinç tarlalarına, deniz sularından tortullara, normal floralardan balıklara, hatta arı balına varıncaya kadar birçok ortamda bulunabilmektedir (Vary 1994). *B. megaterium* endüstride genel olarak ilgi alanında yer almasının nedeni birkaç biyoteknolojik maddenin üretimi için kullanılmasıdır. Patojenik değildir. Bu özellikleri nedeniyle *B. megaterium*'lar gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanıma uygundur. Oldukça çeşitli karbon kaynaklarının kullanılması bu mikroorganizmaların düşük maliyetteki maddeler üzerinde kullanımına uygun hale gelir (Von Tersch and Robbins 1990; Kim 2003). Yapılan çalışmalarda *B. megaterium* bakterisinin proteaz, lipaz ve amilaz gibi enzimleri üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (David *et al.* 1987; Ruiz *et al.* 2002). Bu yüzden, izole ettiğimiz *B. megaterium* F25'in lipolitik aktivite göstermesi literatürle uyumluluk göstermektedir.

## **5.2. *Bacillus megaterium* F25 ile Lipaz Üretimi için Kültür Şartlarının Optimizasyonu**

Literatürde çeşitli besinsel, kimyasal ve fiziksel faktörlerin mikroorganizmaların enzim üretme yeteneğini önemli ölçüde etkilediği ve bu yüzden de bu faktörlerin optimize edilmesinin çok önem arz ettiği belirtilmektedir (Gül 2013). Bu yüzden, mevcut çalışmada *B. megaterium* F25 bakterisi ile lipaz üretimini artırmak için bazı, besinsel, kimyasal ve fiziksel faktörlerin etkisi araştırılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları sırasında ilk olarak pH'nın etkisi test edilmiştir. Araştırma bulgularında da belirtildiği üzere maksimum lipaz üretimine pH 6.0'da ve bunun ardından da pH 7.0 ve 8.0'da ulaşılmıştır. Bu sonuç lipaz enzimlerinin üretimini pH'nın etkilediğini gösteren önceki çalışmalarla benzerlik taşımaktadır (Kumar *et al.* 2005; Ertuğrul *et al.* 2007).

Sıcaklığın etkisi araştırıldığında maksimum enzim üretiminin ve hücre büyümesinin 30°C'de başarılı olduğu daha yüksek ve düşük sıcaklıkların bu parametreler üzerinde kademeli azalmalara neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda da ortam sıcaklığının mikrobiyal büyümeyi ve enzim üretimini etkileyebileceği gösterilmiştir (Di Luccio *et al.* 2004; Kumar *et al.* 2005; Basharat *et al.* 2018). Diğer taraftan, özellikle 30°C'de maksimum hücre büyümesinin gözlenmesi bu bakterinin mezofilik karakterde olduğunu göstermektedir. Çünkü, literatürde mezofilik organizmaların 45°C'ye kadar gelişme gösterebildiği ve optimum gelişme sıcaklığında 30-39°C civarında olduğu belirtilmektedir (Schiraldi and De Rosa 2014).

Mikrobiyal fermentasyon çalışmalarında ucuz substrat seçimi önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Örneğin, atık kıyartma yağlarının lipaz üretiminde substrat olarak kullanılabilmesi literatürde belirtilmektedir (Rywińska *et al.* 2008; Smaniotto *et al.* 2014). Bu yüzden mevcut çalışmada lipaz üretim substratı olarak atık kıyartma yağları tercih edilmiştir. Test edilen farklı kıyartma yağı konsantrasyonlarında ise maksimum lipaz üretimi ve hücre büyümesi 20 ml/l atık yağ konsantrasyonunda başarılı, daha yüksek veya düşük konsantrasyonların ise hem hücre büyümesini hemde lipaz aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Lipaz aktivitesinde gözlenen bu düşüşler atık yağ içerisinde bulunan bazı maddelerin ya da elementlerin artan yağ konsantrasyona bağlı olarak daha fazla toksik etki göstermesiyle açıklanmıştır. Yapılan önceki çalışmalarda da yüksek yağ konsantrasyonlarının lipaz aktivitesini azaltabileceği gösterilmiştir (Lakshmi *et al.* 1999; Damaso *et al.* 2008; Turati *et al.* 2019).

Peptonlar besiyerlerinde başta organik azot kaynağı (aminoasit, peptit vb) olmak üzere mineral ve karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Taskin 2013a). Yapılan çalışmalarda peptonların lipaz enzimlerinin üretiminde artırdığı belirtilmektedir (Fickers *et al.* 2004; Oshoma *et al.* 2010; Rajendran and Thangavelu 2012; Mazhar *et al.* 2017; Riyadi *et al.* 2017). Bu bilginin ışığında, mevcut çalışmada lipaz üretimi üzerine peptonların etkisi test edilmiştir. Araştırma bulguları kısmında da belirtildiği gibi besiyerine hiç bir inorganik ya da organik azot takviyesi yapılmadığında da bakterinin sadece atık kıyartma yağı ve minerallerden oluşan besiyerinde geliştiği ve lipaz ürettiği gözlenmiştir. Bu durum atık kıyartma yağının doğal yapısında azotlu

bileşiklerin bulunması veya kızartma işlemi sonrasında yapısına azotlu bileşiklerin geçmesiyle açıklanmıştır. Bununla birlikte, ortama pepton eklendiğinde hücre büyümesinin ve lipaz üretiminin çok daha fazla olduğu ve özellikle maksimum seviyelere 3gr/lt pepton konsantrasyonunda ulaşıldığı tespit edilmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda da pepton konsantrasyonlarının lipaz üretimi üzerinde benzer etkilere sebep olduğu belirtilmiştir (Lima *et al.* 2003; Baltacı *et al.* 2018).

Araştırmacılar, besiyerlerine katılan karbon, azot ve mineral kaynaklarının yanısıra tween 80' ve triton x-100 gibi bazı kimyasallarında lipaz üretimini teşvik ettiğini göstermiştir (Henriette *et al.* 1993; Elibol and Ozer 2001; Sharma *et al.* 2001; Acıkel *et al.* 2011; Anbu *et al.* 2011; Grbavčić *et al.* 2011; Taskin *et al.* 2016). Mevcut çalışmada da, besiyerinde Tween 80 inducer olarak test edilmiş ve uygun konsantrasyonlarda uygulandığında lipaz üretimini ve hücre büyümesini teşvik ettiği tespit edilmiştir. Lipaz üretimi üzerindeki pozitif etkisi Tween 80' nin hücre membranlarının geçirgenliğini artırmasına bağlanmıştır (Galabova *et al.* 1996; Dalmau *et al.* 2000). Optimumun (4ml/lt) üzerindeki Tween 80 konsantrasyonlarının ise hem hücre büyümesini hemde lipaz üretimini azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum, membran permeabilesinin aşırı artması, hücre içeriğinin dışarı çıkması ve buna bağlı olarak hücre canlılığının azalmasına bağlanmıştır. Yapılan önceki çalışmalarda, Tween 80' nin enzim üretimini teşvik ettiği belirtilse de çok yüksek konsantrasyonlarının hücre büyümesini ve enzim aktivitesini azaltabileceği gösterilmiştir (Espinosa *et al.* 1990; Sidhu *et al.* 1998; Anbu *et al.* 2011; Rajendran and Thangavelu 2012; Eddehech *et al.* 2019).

Araştırmacılar, gerek sıvı gerekse katı kültürlerde yapmış oldukları çalışmalarda proteaz, lipaz, tannaz ve invertaz gibi mikrobiyal enzimlerin üretiminde inkübasyon süresinin optimize edilmesi gereken çok önemli bir parametre olduğunu göstermişlerdir (Taskin 2013b; Akbari *et al.* 2016; de Oliveira *et al.* 2016). Bu yüzden, mevcut çalışmada *B. megaterium* bakterisi ile lipaz üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisinde test edilmiştir. Araştırma bulgularından da görülebileceği gibi hem hücre büyümesi hemde lipaz aktivitesinde maksimum artışlar inkübasyon süresinin 12-24 saatleri arasında gerçekleşmiştir. Lipaz aktivitesi 48. saatte maksimum seviyeye ulaşmış, 48-60. saatler arasında kadar sabit kalmış ve 60. saatten sonra azalmıştır. 48-60

saatler arasında lipaz aktivitesinde herhangi bir artışın olmaması ortamda atık yağın tamamen parçalanması ile açıklanmıştır. 60.saatten sonra enzim aktivitesinde görülen parçalanma ise enzim stabilitesinin bozulması veya enzimin parçalanması ile açıklanmıştır.

**Çalışma sonucunda elde edilen bulgular göstermektedir ki;**

- 1- Sucul böceklerin bağırsak florasında lipaz aktivitesine sahip olan bakteriler yaşamaktadır. Bu bulgu dünya literature açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.
- 2- Bu bakterilerin bazıları gelişmek için zengin besiyerlerine ihtiyaç duyarken bazıları ise bazı mineraller ve atık kızartma yağı ile hazırlanan basit besiyerlerinde gelişebilmektedirler.
- 3- Bu bakterilerin lipolitik aktiviteleri farklılık gösterebilmektedir.
- 4- En iyi lipaz üretici izolat olan *Bacillus megaterium* F25'in lipaz üretme kapasitesini sıcaklık, pH, yağ, pepton ve Tween 80 konsantrasyonunun yanısıra inkübasyon süresi etkileyebilmektedir.
- 5- Gelecek çalışmalarda, bu bakteri ile üretilen lipaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve gıda endüstrisinde kullanılabilme potansiyelinin araştırılması düşünülmektedir.
- 6- Dahası, gelecek çalışmalarda invertaz, selulaz ve pektinaz gibi diğer endüstriyel ve biyoteknolojik öneme sahip olan enzimleri üretme kapasitesine sahip olan bakterilerinde sucuk böceklerin bağırsak mikroflorasından izole edilmesi planlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Açikel, Ü., Erşan, M., & Açikel, Y.S., 2011. The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. Turkish Journal of Biology, 35-1, 35-44.
- Açikel, Y.S., Erdoğan, M., Açikel, Ü., 2013. *R. Delemar*'ın Üremesi Ve Lipaz Üretimi Üzerine Karıştırma Ve Havalandırma Hızlarının Etkisinin Glukoz Veya Melas Sakkarozu Ve Pfr İçeren Ortamlarda Araştırılması, Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 28, 811-818.
- Adams, A.S., Jordan, M.S., Adams, S. M., Suen, G., Goodwin, L.A., Davenport, K.W., & Raffa, K.F., 2011. Cellulose-degrading bacteria associated with the invasive woodwasp *Sirex noctilio*. The ISME journal, 5-8, 1323.
- Adlakha, N., Rajagopal, R., Kumar, S., Reddy, V.S., Yazdani, S.S., 2011. Baş. Environ. Microbiol. Bir Böcek Gut Bakterisinden Selülaz ve Ksilanaz Esaslı Kimerik Proteinlerin Sentezi ve Karakterizasyonu, 77 (14) 4859-4866; DOI:10.1128 AEM.02808-10.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484s.
- Akbari, E., Beheshti-Maal, K., Nayeri, H., 2016. Production and optimization of alkaline lipase by a novel psychrotolerant and halotolerant strain *Planomicrobium okeanokoites* ABN-IAUF-2 isolated from Persian Gulf. Health Sci. 5, 139-148.
- Akpınar, M., Görgün, S., Dağ, Ş., 2009. Ergin ve Ergin Olmayan Gökkuşluğu Alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'in (Osteichthyes: Salmonidae) Karaciğer Lipaz Enzimi (E.C 3.1.1.3) Aktivitesinin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, 2 (34), 101-106. Retrieved from <http://dergipark.gov.tr/sufefd/issue/23102/246780>
- Almas, S., Hameed, A., Shelly, D., Mohan, P. 2009. Purification and Characterization of a Novel Protease from *Bacillus* Strain SAL1. African Journal of Biotechnology, 8(15): 3603-3609.
- Altun, B., Besler; T. ve Ünal, S. 2002. Ankara'da Satılan Sütlerin Değerlendirilmesi. [www.ttb.org/STED/sted0202/sut.pdf](http://www.ttb.org/STED/sted0202/sut.pdf) (10.02.2017)
- Anbu, Noh, MJ., Kim, DH., Seo, JS., Hur, BK. and Min, KH., 2011. Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. African Journal of Biotechnology, 10, 4147-4156.
- Anonyamous, 2019a. [www.alsphotopage.com/image/show/id/8729](http://www.alsphotopage.com/image/show/id/8729) (15.02.2019)
- Anonyamous, 2019b. [www.gbif.org/species/1038574](http://www.gbif.org/species/1038574) (13.02.2019)
- Anonyamous, 2019c. [www.gbif.org/species/5753539](http://www.gbif.org/species/5753539) (13.02.2019)
- AU-KBC, 2016. 'Applications of Lipases', <http://www.abc.org/beta/bioproj2/uses.html>, (23.11.2016)
- Aykıl, M.H., 2014. Lipazın Trichoderma Citrinoviride'den Üretimi Ve Enzimin Bazı Kinetik Özelliklerinin Saptanması (Yüksek Lisans), Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Azambuja, P., Garcia, E.S., & Ratcliffe, N.A., 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology*, 21-12, 568-572.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1986. "Biochemical Engineering and Biotechnology", 2nd Edition, McGraw Hill, New York, 1-6.
- Balcao, V.M., Malcata F.X., 1998. "lipase catalyzed modification of milkfat", *Biotechnology advances*, 16, no 2, 309-341.
- Baltaci, M. O., Orak, T., Taskin, M., Adiguzel, A., & Ozkan, H. 2018. Enhancement of Amylase and Lipase Production from *Bacillus licheniformis* 016 Using Waste Chicken Feathers as Peptone Source. *Waste and Biomass Valorization*, 1-11.
- Basharat, M., Aziz, A., Andleeb, S., Ali, N. M., & Ali, S. 2018. Enhanced bacterial lipase production through different fermentation conditions.
- Behar, A., Yuval, B., Jurkevitch, E., 2008. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. *J Insect Physiol* 54: 377–1383.
- Bhumihamon, O., Phattayakorn, OF., 2011. Lipase-Producing Microorganisms for Use in Contaminated Fat and Oil Kitchen Wastewater Treatment, *Kasetsart Journal: Natural Science*, 37, 327-333.
- Bjoling, F., Godtfredsen, S.E., Kirk, O., 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends in Biotechnology*, 9: 360- 363.
- Bradoo, S., Saxena, R. K., Gupta, R., 1999. Two Acid thermotolerant Lipases from New Variants of *Bacillus spp.*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15: 87-91.
- Cardoza, Y.J., Klepzig, K.D., Rafa, K.F., 2006. Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecological Entomology* 31: 636–645.
- Celep, S.G., 2010. Siirt I. Ulusal El Sanatları Sempozyumu: Enzimler Tekstil Endüstrisindeki Yeri ve Önemi.
- Chandel, K., Mendki M.J., Parikh R.Y., Kulkarni G., Tikar S.N., Sukumaran D., Prakash S., Parashar B.D., Shouche Y.S., Veer V., 2013. Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. *PLoS One*.
- Chaplin, M.F., and Bucke, C., 1990. "Enzyme Technology", Cambridge University Press, Cambridge, 20-35.
- Chennai, 2012. <http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html> Anna University, (11.09.2016)
- Chesterfield, D., M., Rogers, P., L., Al-Zaini, E., O., Adesina, A., A., 2012. Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase, *sChemical Engineering Journal*, 207–208, 701–710.
- Chiou, S.H., Wu, W.T., 2004. "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups", *Biometarials*, 25: 197-204.
- Cho A-Ra, Yoo S. and Kim E. 2000. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovarans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*. 186: 235-238.
- Copeland, R. A., 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed., Wiley-VCH, New York, 1-7.
- Dalmau, E., Montesinos, J.L., Lotti, M., Casas, C., 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 657– 663.

- Damaso, M.C.T., Passianoto, M.A., Freitas S.C., Lago R.C.A., Couri, S., 2008. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Braz J Microbiol* 39(4).
- David, M. H., Günther, H., & Röper, H. (1987). Catalytic properties of *Bacillus megaterium* amylase. *Starch- Stärke*,39(12), 436-440.
- De Oliveira, C.T., Pellenz, L., Pereira, J.Q., Brandelli, A., Daroit, D.J., 2016. Screening of bacteria for protease production and feather degradation. *Waste Biomass Valor.* 7, 447-453.
- De Vries, E.J., Van Der Wurff, A.W.G., Jacobs, G., Breeuwer, J.A.J., 2008. Onion thrips, *Thrips tabaci*, have gut bacteria that are closely related to the symbionts of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *J Insect Science*.
- De Pascale, D., Cusano A.M., Autore F., Parrilli E., Di Prisco G., Marino G., Tutino M.L. 2008. The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family.
- Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K., Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, Trabzon.
- Devlin, T. M., 2006. "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 6th ed.", Wiley-Liss pub., Hoboken, 367, 390.
- Dhar, S.C., Sreenivasulu S., 1984. Studies on the use of dehairing enzyme for it enzyme family. *Extremophiles*. 12: 311-323.
- Dharne, M., Patole, M., Shouche, Y.S., 2006. Microbiology of the insect gut: tales from mosquitoes and bees. *J Biosci* 31-3: 293– 295.
- Di Luccio, M., Capra, F., Ribeiro, N. P., Vargas, G. D., Freire, D. M., & De Oliveira, D. 2004. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113(1-3), 173-180.
- Dillon, R.J., Dillon, V.M., 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49:71–92.
- Dillon, R.J., Vennard, C.T., Buckling, A., Charnley, A.K., 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol Lett* 8: 191–1298.
- Dodia, M.S., Rawal, C.M., Bhimani, H.G., Joshi, R.H., Khare, S.K., Singh, S.P. 2008. Purification And Stability Characteristics of an Alkaline Serine Protease From a Newly Isolated Haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 121-131.
- Dominguez, A., Deive, F., J., Sanroman, M., A., Longo, M., A., 2003. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 1166- 1170.
- Dong, H., Gao, S., Han, S., Cao, S., 1999. Purification and Characterization of a *Pseudomonas* sp. Lipase and Properties in Non-aqueous Media. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30: 251-256.
- Eddehech, A., Zied, Z., Aloui, F., Smichi, N., Noiriél, A., Abousalham, A., & Gargouri, Y., 2019. Production, purification and biochemical characterization of a thermoactive, alkaline lipase from a newly isolated *Serratia* sp. W3 Tunisian strain. *International journal of biological macromolecules*, 123, 792-800.
- Elibol, M., Ozer, D., 2001. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem*, 6, 325-329.

- Enzymes Business, 2011.  
<http://report2010.novozymes.com/Menu/Novozymes+Report+2010/Report/Sales+and+markets/Enzyme+Business> (05.11.2016).
- Enzymes in Industrial Applications: Global Markets, 2011.  
<http://www.marketresearch.com/product/display.asp?ProductID=6060223>  
 (20.10.2016).
- Erbey, Y.İ., 2015. Bazı Curculionidae (Coleoptera) Familyası Bireylerinin Sindirim Sistemlerindeki Bakteri Florasının İncelenmesi (Yüksek Lisans), Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir.
- Ertuğrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S., 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149-3, 720-724.
- Espinosa, E., Sanchez, S., & Farres, A., 1990. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. *Biotechnology letters*, 12-3, 209-214.
- Fanoly, G., Armas, J. C., Mendoza, J.C.D., Hernandez, J.L.M., 2006. 'Production of *A. Niger Lipase*', *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2): 235-240.
- Faunaeur. [http://www.faunaeur.org/full\\_results.php?id=119252](http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=119252) (02.10.2016).
- Feng, W., Wang, X. Q., Zhou, W., Liu, G. Y., & Wan, Y. J. 2011. Isolation and characterization of lipase-producing bacteria in the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on different forage. *Journal of Insect Science*, 11(1): 135.
- Fickers, P., Nicaud, J.M., Gaillardin, C., Destain, J., Thonart, P., 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 742-749.
- Frederick, B.A., Caesar, A.J., 2000. Analysis of bacterial communities associated with insect biological control agents using molecular techniques. In: *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds 4-14 July 1999, Montana State University, Bozeman, Montana, USA* Neal R. Spencer ed., 261-267.
- Fuentes, I.E., Vıseras C.A., Ubialı D., Terreni M., Alcantara A.R., 2001. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 657-663.
- Fukatsu, T., Hosokawa, T., 2002. Capsule transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*, *Appl Environ Microbiol.*, 68, 389-396.
- Galabova, D., Tuleva, B., Spasova, D., 1996. Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100. *Enzyme Microb. Technol.* 8,18-22 .
- Ghaly, A.E., David, D., Brooks, M.S., Budge, S., 2010. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6 (2): 54-76.
- Ghorbel, S., Kammoun, M., Soltana, H., Nasri, M., Hmidet, N., 2014. *Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and characterization of extracellular proteases and their compatibility with laundry detergents. *BioMed Research International*, 1-8.
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S., 1996. Microbial lipases: production and applications. *Science Progress*, 79 (2): 119- 157.
- Gilbert, E. J., Drozd, J. W., Jones, C. W., 1991. Physiological Regulation and Optimization of Lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2215-2221.

- Gochev, V., Montero, G., Kostov, G., Toscano, L., Stoytcheva, M., Krastanov, A., Georgieva, A., 2012. Nutritive Medium Engineering Enhanced Production of Extracellular Lipase by *Trichoderma longibrachiatum*, *Biotechnology and biotechnological equipment*, 2875-2883.
- Godfrey, T. and West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology (T. Godfrey and S. West editör) *Industrial Enzymology*, 2nd Edition, Stockton Pres, New York.
- Gracilenta CBMAI 1583: Effect of carbon sources on enzyme production, biochemical properties of crude and purified enzyme and substrate specificity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 15-24.
- Grbavčić, S., Bezbradica, D., Izrael-Živković, L., Avramović, N., Milosavić, N., Karadžić, I., & Knežević-Jugović, Z., 2011. Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Bioresource Technology*, 102-24, 11226-11233.
- Gullan P.J., Cranston P.S., 2010. *The Insect Anoutline of Entomology*, Çeviri Editörü : Ali GÖK.
- Gupta, R., Gıgras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial a-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem*, 1-18.
- Gupta, R., Gupta N, Rathi P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 763- 781.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S., 2003. Lipase Assay for Conventional and Molecular Screening: an Overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 63-71.
- Gül, Ü.D., 2013. Fungal Lipazlar ve Endüstride Kullanım Alanları. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, AKU J. Sci. Eng. 13 (2013), 011001 1-8.
- Hammamchi, H., 2014. *Rhodotorula Mucilaginosa*'dan Lipaz Enzimi Üretimi Ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi (Yüksek Lisans), Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hasan F., Shah A.A. and Abul-Hameed A. 2006a. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Micro Technology*. 39: 235-251.
- Hasan, F., Shah A. A. and Hameed A. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 27:782–798.
- Hasan, F., Shah A.A. and Abul-Hameed A. 2006b. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. *Ann. Microbiol.* 56(3):247–252.
- He, H.L., Chen, X.L., Zhang, X.Y., Zhang, Y.Z. and Gao, D., 2009. Tate improvement of refrigerated meat treated with cold-adapted protease. *Food chemistry*. 84: 307-311.
- He, Y., Tan T., 2006. Use of Response Surface Methodology to Optimize Culture Medium for Production of Lipase with *Candida* sp. 99-125. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43: 9-14.
- Henriette, C., Zinebi, S., Aumaitre, M. F., Petitdemange, E., & Petitdemange, H., 1993. Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens* (532 S). *Journal of industrial microbiology*, 12-2, 129-135.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sadra, L. and Comeau, L.C., 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from thermophilic

- Rhizopus oryzae strain isolated from palm fruit, *Enzyme and Microbial Technology*. 26, 421-430.
- Huang, Q., Peng, Y., Li X., Wang, H., Zhang, Y., 2003. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*, *Current Microbiology*, 46: 169-173.
- Huang, S., Sheng, P., & Zhang, H., 2012. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *International journal of molecular sciences*, 13-3, 2563-2577.
- Husseneder, C., Wise, B.R., Higashiguchi, T., 2007. Bugs in bugs: The microbial Diversity of the termite gut. *Proc Hawahan Entomol Soc* 39: 143–144.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S., 2001. Production of Biodiesel Fuel From Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase, *J. Mol. Catal. B Enzymatic*, 16: 53–58.
- Ito, S., Kobayashi T., Ara K., Ozaki K., Kawai S. and Hatada Y. 1998. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. *Extremophiles*. 2: 185–90.
- Izrael-Zivkovic, L., Gojgic-Cvijovic, G., Karadzic, I., 2010. Isolation and partial characterization of protease from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(8), 1041-1052.
- Jackson, T.J., Wang, H., Nugent, M.J., Griffin, C.T., Burnell, A.M., Dowds, B.C.A., 2008. Isolation of Insect Pathogenic Bacteria, *Providencia Rettgeri*, from *Heterorhabditis* spp. *J Appl Microbiol Volume 78 Issue 3*: 237–244.
- Jaeger, K-E., Dijkstra, B. W. and Reetz, M.T., 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315- 351.
- Joshi, G. K., Kumar, S. and Sharma, V., 2007. Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 isolated from lake nainital, Uttaranchal state, India. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 773-779.
- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G., 2014. The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*, 6-11, 4294-4313.
- Juwon, A.D., Emmanuel, O.F., 2012. Experimental investigations on the effects of carbon and nitrogen sources on concomitant amylase and polygalacturonase production by *Trichoderma viride* BITRS-1001 in submerged fermentation. *Biotechnol. Res. Int.*
- Kalaylı, E. ve Beyatlı, Y. 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 01(12). 24-35.
- Kalkan, S., Halkman, K. 2006. *Bacillus cereus* ve içme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar.
- Kambourova, M., Kirilova N., Mandeva R. and Derekova A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22:307–313.
- Kamini, N.R., Fujii T., Kurosu T. and Iefuji H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus sp.* S-2. *Process Biochem.* 36: 317–24.
- Kansu, İ.A., 1982. Genel Entomoloji. Ankara, 430, Türkiye.

- Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1) KSU J. Science and Engineering 5: (1).
- Katı, H., Karaca, B., Gülşen, Ş., 2016. Identification of *Bacillus* species isolated from soil and investigation of their biological properties. Sakarya University Journal of Science, 20 (2): 281-290. DOI: 10.16984/saufenbilder: 04840
- Kaushik, R., Saran S., Isar J., Saxena R.K., 2006. Statistical Optimization of Medium Components and Growth Conditions by Response Surface Methodology to Enhance Lipase Production by *Aspergillus carneus*. J. Mol. Catal. B: Enzym. (40): 121-126.
- Kıran, E.Ö., U., Çömlekçioğlu, N., Dostbil, 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSU. Journal of Science and Engineering, 9(1): 12-19.
- Kim, J.Y., 2003. Overproduction and secretion of *Bacillus circulans* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene (bglBC1) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. Biotechnol Letters 25: 1445-1449.
- Klein, M.G., Kaya, H.K., 1995. *Bacillus* and *Serratia* species for scarab control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 90 -1: 87-95.
- Ko, W. H., Wang, I. T., & Ann, P. J. 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. Soil Biology and Biochemistry, 37(3), 597-599.
- Koç, M., 2013. *GeoBacillus* Türlerinde Termostabil Lipaz Üretimi (Yüksek Lisans), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kudo, T., 2009. Termite-microbe symbiotic system and its efficient degradation of lignocelluloses, Biosci. Biotechnol. Biochem., 73-12, 2561-2567.
- Kumar, C.G., 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*, Letters in Applied Microbiology, 34: 13-17.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., & Gupta, R., 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. Protein Expression and Purification, 41-1, 38-44.
- Lakshmi, B.S., Kanguane, P., Abraham, B., Pennathur, G., 1999. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). Lett Appl Microbiol 29: 66-70.
- Lanser, A. C., Manthey, L. K., Hou, C. T., 2002. Regioselectivity of New Bacterial Lipases Determinated by Hydrolysis of Triolein. Curr Microbiol., 44: 336-340.
- Leadbetter, J. R., Schmidt T. M., Graber J. R. and Breznak J. A., 1999. Acetogenesis from H<sub>2</sub> plus CO<sub>2</sub> by spirochetes from termite guts, Science, 283, 686 – 689.
- Leaf, S.T., H.B.K., DAS, E.D., Chatterjee, S., & Dangar, T., 2008. Characterization of *Eacillus sphaericus*, a gut bacterium of aedes albopictus (skuse) larvae and its. J. Appl. Zool. Res, 19-2, 221-225.
- Lee, D.W., Koh Y.S., Kim K.J., Kim B.C., Choi H.J. and Kim D.S. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS. Microbiol. Lett. 179:393-400.
- Lehane, M.J., Wu, D., Lhane, S.M., 1997. Midgut specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*; Proc Natl Acad Sci USA 94: 11502-11507.

- Lima, V.M., Krieger, N., Sarquis, M.I.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., Fontana, J.D. 2003. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. Food Technol Biotechnol 41, 105-110.
- Marul, B., 2007. Fabrika Atıklarından İzole Edilen *Bacillus Sp.*'den Aktif ve Kararlı Lipaz Üretim Koşullarının ve Üretilen Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanımının Araştırılması. (Yüksek Lisans). Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü. Ankara.
- Mazhar, H., Abbas, N., Ali, S., Sohail, A., Hussain, Z., Ali, S.S., 2017. Optimized production of lipase from *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39. Afr. J. Biotechnol. 16: 1106-1115.
- Messiha, N.A.S., 2007. *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato Brown rot. Eur J Plant Pathol 118: 211–225.
- Metin, M. 1998. Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 33, 388; 632-654. İzmir.
- Minard, G., Mavingui P., Moro C.V., 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. Parasit. Vectors; 6:146.
- Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., Moosavi-Nejad, Z., 2011. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. Iranian Journal of Microbiology, 3(2): 92-98.
- Moraes, A.M.L., Junqueira, A.C.V., Costa, G.L., Celano, V., Oliveira, P.C., Coura, J.R., 2000. Fungal flora of the digestive tract of 5 species of triatomines vectors of *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909. Mycopathologia 151: 41-48.
- Moran N. A., Russell J. A., Koga R. and Fukatsu T., 2005. Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects, Appl. Environ. Microbiol., 71-6, 3302-3310 .
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., 1998. Harper'ın Biyokimyası, 24. Baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, 68-69.
- Nahas, E., 1988. Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* Under Various Growth Conditions. J. Gen. Microbiol., 134: 227-233.
- Neethu, C.S., Rahiman, K.M.M., Rosmine E., Saramma, A.V., Hata A.A.M., 2015. Utilization of agro- industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctican doptimization of physical parameters. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 4, 703–709.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2005. Biyokimyanın İlkeleri, 3.baskı, N. Kılıç, Palme Yayıncılık, Ankara, 115, 244-246, 266.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of Biochemistry, Fourth edition, W. H. Freeman and Company, New York, 192.
- Nie K, Xie F, Wang F, Tan T., 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 43 (1- 4): 142- 147.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., and Gupta, R., 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-resistant alkaline protease from a *Bacillus sp.*, World J. Microbiol Biotechnol., 17: 493-497.
- Okafor N., 2007. Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. Department of Biological Sciences Clemson University, South Carolina. 22: 398-406.

- Oshoma, C., Imarhiagbe, E., Ikenebomeh, M., Eigbaredon, H., 2010. Nitrogen supplements effect on amylase production by *Aspergillus niger* using cassava whey medium. *Afr. J. Biotechnol.* 9.
- Örtücü, S., Albayrak İskender, N., 2017. Determination of Control Potentials and Enzyme Activities of *Beauveria bassiana* (bals.) vull. isolates against *Tetranychus urticae* Koch (acarı: tetranychidae). *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18 (1): 33-38. DOI: 10. 23902/trkjnat.285656.
- Özdal, Ö. G., Özdal, M., Algur, Ö.F., Sezen, A. 2016. Türkiye Ziraat Dergisi: Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Cilt 4; Sayı 4; 248-254-7.
- Öztürk, N., 2006. Hidrofobik Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobilizasyonu A.M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A., 1996. Use of Continuous Culture to Screen for Lipase Producing Microorganisms and Interesterification of Butterfat by Lipase Isolates. *Can. J. Microbiol.* 42: 446-452.
- Panbangred, W., Weeradechapon, K., Udomvaraphant, S., Fujiyama, K. and Meevootisom, V., 2000. High expression of the penicillin G acylase gene (pac) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own pac minus mutant. *J Appl Microbiol* 89: 152-157.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, S., Nigam, C. R., Krieger, P. And Soccol, V. T., 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 119-131.
- Panzavolta F., Soro S., D'amato R., Palocci C., Cernia E., Russo M.V., 2005. Acetylenic Polymers as New Immobilization Matrices for Lipolytic Enzymes, *J of Mol. Cat. B: Enzymatic*, 3267–3276.
- Papaparaskevas D., Christakopoulos P., Kekos D., Macris BJ., 1992. Optimizing Production of Extracellular Lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.* 14: 397-402.
- Park, D. S., Oh, H. W., Bae, K. S., Kim, H. M., Heo, S. Y., Kim, N. J., Park, H. Y. 2007a. Screening of bacteria producing lipase from insect gut: isolation and characterization of a strain, *Burkholderia* sp. HY-10 producing lipase. *Korean journal of applied entomology*, 46(1): 131-139.
- Park, D. S., Oh, H. W., Heo, S. Y., Jeong, W. J., Shin, D. H., Bae, K. S., Park, H. Y. 2007c. Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. *The Journal of Microbiology*, 45(5): 409-417.
- Park, D. S., Oh, H. W., Jeong, W. J., Kim, H., Park, H. Y., & Bae, K. S. 2007b. A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine longicorn beetle species and their exo-enzyme producing properties for degrading xylan and pectin. *The Journal of Microbiology*, 45(5): 394-401.
- Prasanna, V. A., Kayalvizhi, N., Rameshkumar, N., Suganya, T., & Krishnan, M., 2014. Characterization of amylase producing *Bacillus megaterium* from the gut microbiota of silkworm *Bombyx mori*. *Res J Chem Environ*, 18-7, 38-45.
- Prem Anand, A. A., Vennison, S. J., Sankar, S. G., Gilwax Prabhu, D. I., Vasan, P. T., Raghuraman, T., ... & Vendan, S. E., 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, 10-1, 107.

- Priest, F.G., 1993. Systematics and Ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis* and other Grampositive Bacteria. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 3-16.
- Quyen D.T., Schmidt-Dannert C., Schmid R.D., 2003. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. *Protein Expression and Purification*. 28: 102–110.
- Rajendran, A., & Thangavelu, V., 2012. Optimization and modeling of process parameters for lipase production by *Bacillus brevis*. *Food and bioprocess technology*, 5-1, 310-322.
- Rao, C.S., Sathish, T., Ravichandra, P., Parakasham, R.S., 2009. Characterization of Thermo- and Detergent Stable Serine Protease from Isolated *Bacillus circulans* and Evaluation of Eco-Friendly. *Process Biochemistry*, 44: 262- 268.
- Raux, E., Lanois, A., Warren, M.J., Rambach, A., Thermes, C., 1998. Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* cobI operon. *Biochem J* 335: 159-166.
- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringø, E. 2012. Enzyme producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18 (5): 465-492.
- Riyadi, F.A., Alam, M.Z., Salleh, M.N., Salleh, H.M., 2017. Optimization of thermostable organic solvent-tolerant lipase production by thermotolerant *Rhizopus* sp. using solid-state fermentation of palm kernel cake. *3 Biotech* 7: 300.
- Rubin, B. and Dennis, E.A., 1997. Lipases (Part B: Enzyme Characterization and Utilization), *Methods in Enzymology* , 286. P: 50-65.
- Ruiz, C., Blanco, A., Pastor, F. J., & Diaz, P., 2002. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I. 4 bacterial lipase. *FEMS Microbiology Letters*, 217-2, 263-267.
- Rywińska, A., Witkowska, D., Juszczak, P., Rymowicz, W., Kita, A., 2008. Waste Frying Oil as Substrate for Lipase Production by *Geotrichum candidum* Strains. *Polish J of Environ Stud* 17: 925-931.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V., 2008. Comparison among Immobilised Lipases on Macroporous Polypropylene toward Biodiesel Synthesis, *J. of Mol. Catal. B: Enzymatic* 54: 19–26
- Salleh AB., Musani R., Razak CNA., 1993. Extra and Intracellular Lipases from a Thermophilic *Rhizopus oryzae* and Factors Affecting Their Production. *Can. J. Microbiol.* 39: 978-981.
- Saraç, N., Boran, R., Ökmen, G., Uğur, A., 2008. Toprak ve Süt Kökenli Gram Pozitif Bakterilerde Lipaz Üretimi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 1 (2): 23-28.
- Sarıkaya Öztürk, S. B., 2006. Yabani Çuha bitkisinin çiçeklerinden proteaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve peynir üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 1-7.
- Sazama, E. J., Bosch, M. J., Shouldis, C. S., Ouellette, S. P., & Wesner, J. S., 2017. Incidence of Wolbachia in aquatic insects. *Ecology and evolution*, 7-4, 1165-1169.
- Schiraldi, C., De Rosa, M., 2014. Mesophilic Organisms. In: Drioli E., Giorno L. (eds) *Encyclopedia of Membranes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schmid, R.D., 1979. Stabilized Soluble Enzymes, *Adv. Biochem. Eng.*, 12: 41.

- Schmidt-Dannert C., Rúa M.L., Atomi H. and Schmid R.D., 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1301: 105–14.
- Schmidt-Dannert C., Sztajer H., Stocklein W., Menge U. and Schmid R.D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214: 43–53.
- Sekhon, S., Murthy, V., K., Pavithra, M., Mayur, P., Chandavar, A., 2012. Production of extracellular lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 in submerged fermentation, *International Journal of Engineering Research and Applications*, 2, 1775-1781.
- Shah, K., Mody, K., Keshri, J., Jha, B. 2010. Purification and Characterization Of a Solvent, Detergent and Oxidizing Agent Tolerant Protease from *Bacillus cereus* isolated from The Gulf of Khambhat. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67: 85–91.
- Sharma D., Kumbhar B.K., Verma A.K., Tewari L., 2014. Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus sp.* *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3, 205–211.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627- 662.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Begum, Z., Pindi, P. K., Manorama, R., Padmanaban, D.A., Shouche, Y.S., Pawar, S., Vaishampayan, P., Dutt, C.B.S., Datta, G.N., Manchanda, R.K., Rao, U.R., Bhargava P.M. and Narlikar, 2009. *J.V., Janibacter hoylei sp. nov., Bacillus isronensis sp. nov. and Bacillus aryabhatai sp. nov.*, Isolated from Cryotubes Used for Collecting Air from the Upper Atmosphere, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, sayı 59. 2977-2986.
- Sidhu, P., Sharma, R., Soni, S. K., & Gupta, J. K., 1998. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus sp.* *Folia microbiologica*, 43-1, 51-54.
- Sinchaikul S., Sookkheo B., Phuyrakul S., Wu Y.T., Pan F.M. and Chen S.T., 2001. Structural Modeling and Characterization of a thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Biochem and Biophys Res. Com.* 283: 868-875.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., 2000. Serine Alkaline Protease From a Newly Isolated *Bacillus sp.* SSR1, *Process Biochemistry*, 36: 781-785.
- Smaniotto, A., Skovronski, A., Rigo, E., Tsai, S.M., Durrer, A., 2014. Concentration, characterization and application of lipases from *Sporidiobolus pararoseus* strain. *Braz J Microbiol* 45: 294-301.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. ve Wiczorek, J., 1988. Production of exogenous Lipases by Bacteria, Fungi and actinomycetes, *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 492-497.
- Taskin, M., 2013. A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine- and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate. *J. Sci. Food Agric.* 93: 535-541.
- Taskin, M., 2013b. Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Biopro. Biosyst. Eng.* 36, 165-172.
- Taskin, M., Ucar, M. H., Unver, Y., Kara, A. A., Ozdemir, M., & Ortucu, S., 2016. Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast

- Rhodotorula glutinis* HL25. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 97-103.
- Teng, Y., Xu, Y., 2008. Culture Condition Improvement for Whole-cell Lipase Production in Submerged Fermentation by *Rhizopus chinensis* Using Statistical Method. *Bioresour. Technol.* 99: 3900-3907.
- Topal Ş., Pembeci, C., Borcaklı M., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi –I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turk J. Biol* 24, 79-93.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., Çeltik, Ö., 1998. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turk J Biol* 24, 79–93 © TÜBİTAK.
- Treichel, H., Oliveira, D.D., Mazutti, M.A., Luccio, M.D., Oliveira, J.V., 2010. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Tech.*, 31, 82–196.
- Turati, D. F. M., Almeida, A. F., Terrone, C. C., Nascimento, J. M., Terrasan, C. R., Fernandez-Lorente, G., ... & Carmona, E. C., 2019. Thermotolerant lipase from *Penicillium sp.* section .
- Ülker, S., Özel, A., Çolak, A., Alpay Karaoğlu, Ş., 2011. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*, 35, 543-550.
- Valiente-Moro C., Tran F.H., Raharimalala F.N., Ravelonandro P., Mavingui P., 2013. Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol.* 13:70.
- Vary, P.S., 1992. Development of Genetic Engineering in *Bacillus megaterium*. In *Biology of Bacilli: Application to Industry*. Doi, R. and McGloughlin, M. (eds). Boston: Butterworths-Heinemann, 251-310.
- Vary, P.S., 1994. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* 140: 1001-1013.
- Veerapagu, M., Dr. Narayanan, A. S., Ponmurugan, K., Jeya, K. R., 2013. Screening Selektion Identification Production and Optimization of Bacterial Lipase from Oil Spilled Soil. *Asian J Pharm Clin Res*, 6 (3): 62-67.
- Visôto, L. E., Oliveira, M. G. A., Ribon, A. O. B., Mares-Guia, T. R., & Guedes, R. N. C., 2009. Characterization and identification of proteolytic bacteria from the gut of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental entomology*, 38(4), 1078-1085.
- Von Tersch, M.A. and Robbins, H.L., 1990. Efficient cloning in *Bacillus megaterium*: comparison to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* cloning hosts. *FEMS Microbiol Lett* 70: 305-310.
- Wang Q.F., Miao J.L., Hou Y.H., Ding, Y., Wang, G.D. and Li, I.G.Y., 2005. Purification and characterization of an extracellular cold-active serine protease from psychrophilic bacterium *Colwellia sp.* NJ341. *Biotechnology*. 27: 1195-1198.
- Wang, Y., Srivastava, K. C., Shen, G. J., Wang, H.Y., 1995. Thermostable Alkaline Lipase from a Newly Isolated *Thermophilic Bacillus* Strain, A30-1 (ATCC 53841).
- Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P., & König, H., 2002. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Journal of applied microbiology*, 92-1, 32-40.

- Wikipedia, 2011. History of Molecular Biology [http://en.wikipedia.org/wiki/History\\_of\\_molecular\\_biology](http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_molecular_biology) (21.11.2016)
- Wilkinson, T., 2001. Disloyalty and treachery in bug-swapping shocker. *Trends Ecol* 16: 659–661.
- Wilson, S.A., Peek, K. and Daniel, R.M., 1994. Immobilization of a proteinase from the extremely thermophilic organism *Thermus Rt41A*. *Biotechnol Bioeng*, 43: 225–31.
- Wilson, S.A., Young, O.A., Coolbear, T. and Daniel, R.M., 1992. The use of proteases from extreme thermophiles for meat tenderization. *Meat Sci*, 32: 93–103.
- Woodley, J.M., 2000. *Advances in Enzyme Technology-UK Contributions*. (Th. Scheperi editör). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 94-107.
- Wu X., Jaaskelainen S., Linko Y. 1996. An investigation of crude lipase for hydrolysis, esterification, and transesterification. *Enzyme Microb. Technol.* 19: 226–231.
- Xiang, H., Wei, K., 2006. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can J Microbiol* 52 -11: 1085–1092.
- Ye, P., Xu, Z.K., Che, A.F., Wu, Y.C., Seta, P.E, 2005. Chitosan-Tethered Poly(acrylonitrile-co-maleic acid) Hollow Fiber Membrane for Lipase Immobilization, *Biomaterials*, 26: 6394-6403.
- Yılmaz, H., Sezen, K., Katı, H., Demirbağ, Z., 2006. The first study on the bacterial flora of the European spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae). *Biologia Bratislava* 61(6): 679–686.
- Yumoto, I., Hirota, K., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Yokota, Y., & Hoshino, T. 2003. *Psychrobacter okhotskensis* sp. nov., a lipase-producing facultative psychrophile isolated from the coast of the Okhotsk Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53-6, 1985-1989.
- Zhang, J.W., Zeng R.Y. 2008. Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 7323. *Mar Biotechnol* (NY). 10-5: 612–21.
- Zhang, Z., Yuen, G.Y., 1999. Biological control of *bipolaris sorokiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. *Phytopathology* 89 -9: 817–22.

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzurum’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Erzurum illinde bitirdi. 2007-2008 yılında Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünü kazandı. Lisans eğitimini 2012 yılında bitirdi. 2013-2014 yılında Yüksek Lisans yapma hakkını kazanarak Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde öğrenimine başladı.

