

***Bacillus sp.* SUŞLARINDAN LİPAZ TARANMASI, LİPAZ
ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, KİSMİ
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN
ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL UYGULAMALARI**

Maoulida ABDOU



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus sp.* SUŞLARINDAN LİPAZ TARANMASI, LİPAZ ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL
UYGULAMALARI**

Maoulida ABDOU

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

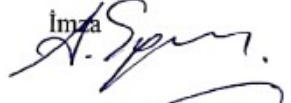
BURSA-2019

TEZ ONAYI

Maoulida ABDOU tarafından hazırlanan “*Bacillus* sp. SUŞLARINDAN LİPAZ TARANMASI, LİPAZ ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL UYGULAMALARI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Başkan : Prof. Dr. Aysun ERGENE
Kınıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza


Üye : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat
Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza


Üye : Prof. Dr. Dilek KUT
Bursa Uludağ Üniversitesi, Mühendislik
Fakültesi,
Tekstil Mühendisliği

İmza


Üye : Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza


Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER
Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa
Bilimleri Fakültesi,
Biyomühendislik Anabilim Dalı

İmza


Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Akşel EREN
Enstitü Müdürü



B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ☐ tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - ☐ görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - ☐ başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - ☐ atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - ☐ kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ☐ ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

12/07/2019

Maoulida ABDOUN

ÖZET

Doktora Tezi

Bacillus sp. SUŞLARINDAN LİPAZ TARANMASI, LİPAZ ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DETERJAN ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL UYGULAMALARI

Maoulida ABDOU

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada, 341 *Bacillus* sp. suşundan 141'i hücre dışı lipaz üreticisi olarak bulunmuştur. En iyi lipaz üreten suş 16S rRNA ile tanımlandı ve *Bacillus cereus* ATA179 olarak adlandırıldı. Fiziksel parametreler arasında en iyi sonuçlar 45 ° C, pH 7.0, çalkalama hızı 50 rpm, aşılama miktarı %7 ve aşılama yaşı 24 saat idi. En iyi karbon kaynağı olarak süktroz, en iyi nitrojen kaynağı olarak (NH₄)₂HP0₄, en iyi metal iyonu olarak CaCl₂ elde edildi. Fiziksel parametreler arasında en iyi sonuçlar 45 ° C, pH 7.0, çalkalama hızı 50 rpm, aşılama miktarı %7 ve aşılama yaşı 24 saat olarak belirlenmiştir. ATA179 suşu, besinsel ve fiziksel koşulları optimize ederek yaratılan modifiye ortamda enzim üretiminde %51,1 artış göstermiştir. Kısmen saflaştırılmış enzimin optimum sıcaklığı ve pH değeri, sırasıyla 55 ° C ve 6.0 idi. Termostabilite ve pH stabilite çalışmaları, enzimin termostabil ve asidofilik olduğunu göstermiştir. CaCl₂, Tween 20, Triton X-100, enzim aktivitesi üzerinde aktifleştirici bir etkiye sahipti. V_{max} ve K_m kinetik değerleri sırasıyla 18,28 U / ml ve 0,11 mM olarak bulunmuştur. Moleküler ağırlık yaklaşık 47 kDa olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin -20°C'de 75 güne kadar stabil kaldığı bulunmuştur. Enzimin deterjan sanayiinde potansiyel gücü araştırılmış ve enzimin deterjan katkı maddelerinden etkilenmediği ayrıca yağlı maddelerle kirletilmiş kumaşlarda yağın çıkarılmasında etkili olduğu saptanmıştır. ATA179 bakterilerinin lipazı deterjan endüstrisinde kullanılma potansiyeline sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *Bacillus*, Besinsel ve Fiziksel Faktörler, Kısmi Saflaştırma, Karakterizasyon, Deterjan Uygulaması

2019, xii+119

ABSTRACT

PhD Thesis

SCREENING OF LIPASE FROM *Bacillus* sp. STRAINS, OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION CONDITIONS, PARTIAL PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND POTENTIAL APPLICATIONS IN THE DETERGENT INDUSTRY

Maoulida ABDOU

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, 141 out of 341 *Bacillus* sp. strains were found as extracellular lipase producers. The best lipase producing strain was identified by 16S rRNA and named as *Bacillus cereus* ATA179. The best results among the physical parameters were 45 ° C, pH 7.0, shaking speed 50 rpm, inoculation amount 7% and inoculum age 24 hours. Sucrose as the best carbon source, (NH₄)₂HPO₄ as the best nitrogen source, CaCl₂ as the best metal ion were obtained. The best results among the physical parameters were determined at 45°C, pH 7.0, shaking rate 50 rpm, inoculation amount 7% and inoculum age 24 hours. ATA179 strain showed a 51,1% increase in enzyme production in the modified medium created by optimizing nutritional and physical conditions. Optimum temperature and pH of the partially purified enzyme were 55° C and 6.0, respectively. Thermostability and pH stability studies showed that the enzyme is thermostable and acidophilic. CaCl₂, Tween 20, Triton X-100 had an activating effect on enzyme activity. Vmax and Km kinetic values were found as 18,28 U/ml and 0,11 mM, respectively. The molecular weight was determined as about 47 kDa. The activity of enzyme was found to be stable up to 75 days at -20°C. The potential strength of the enzyme in the detergent industry was investigated and it was found that the enzyme was not affected by detergent additives; and effective in removing fat in fabrics contaminated with oily substances. The lipase of ATA179 bacteria may have the potential to be used in detergent industry.

Key Words: Lipase, *Bacillus* sp., Nutritional and Physical Factors, Partial Purification, Characterization, Detergent Application

2019, xii+119

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana her türlü araştırma olanağı sağlayan ve çalışmamın her aşamasında yakın ilgi gösteren, yardım ve önerileri ile beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN' a,

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Baran Enes GÜLER'e, Arş. Gör. Tuba SEVGİ'ye, Dr. Aynur AYBEY'ye ve Buşra ÖZALPAR'a,

Yüksek lisans ve doktora süresince maddi olarak destekleyen Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na (YTB),

KUAP(F)-2018/5 No'lu Proje ile tezimi katkı maddi destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi Başkanlığı'na,

Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personellerine,

Bugüne kadar hep yanımda olan ve bana güç veren başta sevgili eşim Mariama SOULAİMANE ve canım kızım Eşranur'a,

Bugünlere gelmemde en sıkıntılı zamanlarda bile esirgemedikleri maddi, manevi desteklerini ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım aileme, tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

12/07/2019

Maoulida ABDOL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Lipazların tarihçesi	4
2.2. Lipaz - katalizli reaksiyonlar	4
2.2.1. Hidroliz	5
2.2.2. Sentez reaksiyonları	7
2.2.2.1. Esterifikasyon	7
2.2.2.2. Transesterifikasyon	8
2.3. Lipazların adlandırılması ve sınıflandırılması	12
2.3.1. Lipazların adlandırılması	12
2.3.2. Lipazların Sınıflandırılması	13
2.3.2.1. Spesifikliğine göre lipazların sınıflandırılması	14
2.3.2.1.1. Substrat spesifik lipazları	14
2.3.2.1.2. Regioselektif lipazlar	15
2.3.2.1.3. Enantiyoselektif lipazlar	15
2.3.2.2. Kaynaklarına göre lipazların sınıflandırılması	16
2.3.2.2.1. Bitkisel lipazlar	16
2.3.2.2.2. Hayvansal lipazlar	17
2.3.2.3. Mikrobiyal lipazlar	18
2.3.2.3.1. Fungal (mantar) lipazlar	18
2.3.2.3.2. Maya lipazları	20
2.3.2.3.3. Bakteriye Lipazlar	21
2.4. Lipazların yapısı	23
2.5. Lipaz katalizli Reaksiyonların Endüstriyel Kullanım Alanı	25
2.5.1. Deterjanlar	28
2.5.2. Biyodizel	29
2.5.3. Gıda endüstrisi	29
2.5.4. Süt ve Aroma Endüstrisi	30
2.5.5. Atık su arıtımı	31
2.5.6. Sıvı ve katı yağlar	31
2.5.7. Kozmetik ve parfümeri	32
2.5.8. Deri Endüstrisi	32
2.5.9. Tarımsal Kimyasallar (agrokimyasallar)	32
2.5.10. Biyoremediasyon	33
2.5.11. Medikal ve İlaç Endüstrisi	33
2.6. Bacillus Cinsinin Genel Özellikleri	34
2.6.1. Bacillus Lipazının Genel Özellikleri	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM	39

3.1.	Materyal.....	39
3.2.	Yöntem	39
3.2.1.	Lipaz pozitif bakterilerin kalitatif taranması	39
3.2.2.	16S rRNA analizi (Filogenetik analiz).....	40
3.2.3.	Enzim üretim ortamının belirlenmesi.....	40
3.2.4.	Bakteri üretim koşulları.....	41
3.2.5.	Bakteri üremesinin ve enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	41
3.2.6.	Bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine besinsel faktörlerin etkisi	43
3.2.6.1.	Karbon (C) kaynaklarının etkisi	43
3.2.6.2.	Azot (N) kaynaklarının etkisi	44
3.2.6.3.	Metal iyonu kaynaklarının etkisi	44
3.2.7.	Bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine fiziksel faktörlerin etkisi	44
3.2.7.1.	Sıcaklığın etkisi	44
3.2.7.2.	pH'nın etkisi	45
3.2.7.3.	Havalandırmanın etkisi (Çalkalama hızı).....	45
3.2.7.4.	İnokülasyon miktarının etkisi	45
3.2.7.5.	İnokülasyon yaşının etkisi	46
3.2.8.	Maksimum lipaz üretimi için modifiye ortamın hazırlanması	46
3.2.9.	Lipaz enziminin kısmi saflaştırılması.....	46
3.2.9.1.	Amonyum sülfat çöktürmesi	47
3.2.9.2.	Diyaliz	47
3.2.9.3.	Ultrafiltrasyon ile diyalizatın konsantre edilmesi	48
3.2.9.4.	Protein miktarının belirlenmesi	48
3.2.10.	Lipaz enziminin karakterizasyonu.....	49
3.2.10.1.	Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	49
3.2.10.2.	Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	50
3.2.10.3.	Enzim Aktivitesi Üzerine Potansiyel Bileşiklerin Etkisi.....	50
3.2.10.4.	Kinetik parametrelerin saptanması	50
3.2.10.5.	Enzimin moleküler ağırlığının tespiti.....	50
3.2.11.	Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi.....	51
3.2.12.	Lipaz enziminin deterjan endüstrisinde kullanım potansiyelinin belirlenmesi	51
3.2.12.1.	Lipazın sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi	51
3.2.12.2.	Kirletilmiş kumaşlara lipaz uygulanması	51
4.	BULGULAR	53
4.1.	Lipaz pozitif bakterilerin belirlenmesi	53
4.2.	6S rRNA analizi (Filogenetik Analiz).....	55
4.3.	Lipaz üretim ortamının belirlenmesi	57
4.4.	Enzim Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi.....	59
4.4.1.	Karbon (C) kaynaklarının etkisi	59
4.4.2.	Azot (N) kaynaklarının etkisi	61
4.4.3.	Metal iyonu kaynaklarının etkisi	62
4.5.	Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Fiziksel Faktörler	64
4.5.1.	Sıcaklığın etkisi	64
4.5.2.	pH'nın etkisi	65
4.5.3.	Havalandırmanın etkisi (Çalkalanma etkisi)	66
4.5.4.	İnokülasyon miktarının Etkisi	67
4.5.5.	İnokülasyon yaşının etkisi	68
4.6.	Maksimum Lipaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Belirlenmesi	69

4.7.	Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	70
4.8.	Kısmi olarak saflaştırılan Lipaz Enziminin Karakterizasyonu.....	72
4.8.1.	Sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin etkisi.....	72
4.8.2.	pH ve pH stabilitesinin etkisi	74
4.8.3.	Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi	76
4.8.4.	Enzim Aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	78
4.8.5.	Enzimin moleküler ağırlığının tespiti.....	79
4.9.	Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi	80
4.9.	Lipaz Enziminin Deterjan Endüstrisinde Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi 81	
4.9.1.	Lipazın sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi	82
4.10.	Kirlenmiş Kumaşlara Lipaz Uygulanması	82
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	86
	KAYNAKLAR	103
	ÖZGEÇMİŞ	119

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde orantı
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Diamonyum sülfat
[S]	Substrat Konsantrasyonu
°C	Santigrat Derece
CuSO_4	Bakir sülfat
Dk	Dakika
FeSO_4	Demir sülfat
G	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten sabitesi
KOH	Potasyum hidroksit
LiSO_4	Lityum sülfat
M	Molar
mg	Miligram
MgSO_4	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MnSO_4	Manganez (II) sülfat
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
U	Ünite
V_{max}	Maksimum enzim aktivitesi
ZnSO_4	Çinko sülfat
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram

Kısaltmalar	Açıklama
Bp	Baz çifti (Base Pair)
BSA	Sığır serum albümini
DAG	Diaçilgliserol
DG	Digliserit
dH ₂ O	Distile Su
DNA	Deoksiribonukleik Asit
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	etilendiamin Tetraasetikasit
Eİ	Enzimatik İndeksi
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Molekuler Biyoloji Birliği
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
MAG	Monoaçilgliserol
MG	Monogliserit
MW	Molecular Weight
NB	Nutrient Broth
OD	Optik Yoğunluk (Optik Dansite)
PES	Polyester lifi
PERT	Pankreas Enzimi Replasman Tedavisi
PZR(PCR)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	Revolutions Per Minute
RT	Room Temperatur (Oda sıcaklığı)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAG	Triaçilgliserol
TG	Trigliserit
TBA	Tribütirin Agar
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Trigliserit yapısı	5
Şekil 2.2. (a) Trigliseritin lipaz ile hidrolizi. (b) Bir lipaz molekülünün substrat etkileşimli bölgesinin temsili gösterimi)	6
Şekil 2.3. Lipaz tarafından esterifikasyon reaksiyonu	8
Şekil 2.4. Alkoliz reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler TAG: Triaçilgliserol; MAG: Monoaçilgliserol; DAG: Diaçil gliserol	10
Şekil 2.5. Lipaz katalizli asidoliz reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler Serbest yağ asitleri (free fatty acids (FFAs)), Yapısal lipit (Structured lipid (SL)).....	11
Şekil 2.6. Lipaz katalizli interesterifikasyon reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler	11
Şekil 2.7. Lipaz tarafından aminoliz reaksiyonu	12
Şekil 2.8. Lipaz enziminin EC sınıflandırılması	13
Şekil 2.9. Spesifikliklere ve kaynaklara göre lipazların sınıflandırılması	13
Şekil 2.10. <i>B. subtilis</i> lipaz modeli. Katalitik triad residue'leri Ser78, His157 ve Asp134, sırasıyla S, H ve D. Enzimin N- ve C-terminalleri	24
Şekil 2.11. Küresel enzim pazarının yıllara göre artışı	25
Şekil 2.12. Endüstriyel pazardaki enzim tipleri	27
Şekil 2.13 Zaman dilimleri içinde lipazların endüstride uygulanmaları	27
Şekil 3.1. Protein standart grafiği.....	49
Şekil 3.2. Renk Ölçüm Spektrofotometresi	52
Şekil 4.1 A: Lipaz üreten <i>Bacillus</i> sp. ATA179' un TBA ortamdaki görüntüsü B: Lipaz varlığının fenol kırmızısı ile hidrolitik zon görüntüsü	53
Şekil 4.2 <i>Bacillus cereus</i> ATA179 suşunun 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı..	56
Şekil 4.3. <i>Bacillus cereus</i> ATA179'in 3 farklı içerikli besiyerinde bakteri üremelerinin karşılaştırılması	58
Şekil 4.4. <i>Bacillus cereus</i> ATA179'in 3 farklı içerikli besiyerinde lipaz enzim üretimlerinin karşılaştırılması	58
Şekil 4.5. <i>Bacillus cereus</i> ATA179'in Besiyeri 3 (Çizelge 3.1)'de lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	59
Şekil 4.6. Karbon kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	61
Şekil 4.7. Azot kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri.....	62
Şekil 4.8. Metal iyonlarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	64
Şekil 4.9. Sıcaklığın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	65
Şekil 4.10. pH'nın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	66
Şekil 4.11. Çalkalamanın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	67
Şekil 4.12. İnokülasyon miktarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri.....	68
Şekil 4.13. İnokülasyon yaşının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	69
Şekil 4.14. Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi	73
Şekil 4.15. Sıcaklık stabilitesinin lipaz aktivitesi üzerine etkisi	74
Şekil 4.16. pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi	75
Şekil 4.17. pH stabilitesinin lipaz aktivitesi üzerine etkisi	76
Şekil 4.18. Potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesine etkileri	77
Şekil 4.19. Lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği ve Michaelis-Menten Grafiği).	79

Şekil 4.20. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bant görünümü	80
Şekil 4.21. Farklı sıcaklıkta ham enzimin depolanma stabilitesi	81
Şekil 4.22. A) Kirletilmemiş kumaş, B) Zeytinyağı ve Gres yağı ile kirletilmiş kumaşlar	83
Şekil 4.23. Gres yağı ile kirletilmiş kumaşlara farklı deterjan, deterjan+enzim uygulaması sonrası elde edilen beyazlık indeksi değerlerinin karşılaştırılması.....	85
Şekil 4.24. Zeytinyağı ile kirletilmiş kumaşlara farklı deterjan, deterjan+enzim uygulaması sonrası elde edilen beyazlık indeksi değerlerinin karşılaştırılması.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Spesifiklerine göre lipazların sınıflandırılması	14
Çizelge 2.2. Bitki Kaynaklı Lipazlar	17
Çizelge 2.3. Hayvansal kaynaklı lipazlar	18
Çizelge 2.4. Mantar kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar	19
Çizelge 2.5. Mantar kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Devam).....	20
Çizelge 2.6. Maya kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar	20
Çizelge 2.7. Maya kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Devam).....	21
Çizelge 2.8. Bakteriyel kaynaklardan elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar	22
Çizelge 2.9. Bakteriyel kaynaklardan elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Devam).....	23
Çizelge 2.10. Lipaz içeren ticari deterjanlar	29
Çizelge 2.11. Bacillus lipazlarının biyokimyasal özellikleri	37
Çizelge 2.12. Bacillus lipazlarının biyokimyasal özellikleri (Devam)	38
Çizelge 3.1. Lipaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besi yerleri	40
Çizelge 3.2. Lipaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besi yerleri (Devam)	41
Çizelge 3.3. Lipaz aktivite tayin basamakları	42
Çizelge 3.4. Lipaz aktivite tayin basamakları (Devam).....	43
Çizelge 4.1. Lipaz pozitif bakterilerin 48. saatteki zon çapları.....	54
Çizelge 4.2. Lipaz pozitif bakterilerin 48. saatteki zon çapları (Devam)	55
Çizelge 4.3. Bacillus cereus ATA179 suşunun 27F_D03 primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	56
Çizelge 4.4. Bacillus cereus ATA179 suşunun 907R_E03 primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	57
Çizelge 4.5. Bacillus cereus ATA179'in 3 farklı ortamdaki üreme ve lipaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	57
Çizelge 4.6. Bacillus cereus ATA179'in 3 farklı ortamdaki üreme ve lipaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (Devam).....	58
Çizelge 4.7. Farklı karbon kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etki	60
Çizelge 4.8. Farklı azot kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	62
Çizelge 4.9. Metal kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	63
Çizelge 4.10. Sıcaklığın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	64
Çizelge 4.11. Sıcaklığın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri (Devam).....	65
Çizelge 4.12. pH'nın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	66
Çizelge 4.13. Çalkalanmanın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri	67
Çizelge 4.14. İnokülasyon miktarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri.....	68
Çizelge 4.15. İnokülasyon yaşının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri.....	69
Çizelge 4.16. Kontrol ortamı ile modifiye ortamda üreme ve lipaz enzim üretim kapasitesinin karşılaştırılması	70
Çizelge 4.17. Farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat çöktürmesi	71

Çizelge 4.18. Lipaz enziminin saflaştırma basamakları.....	71
Çizelge 4.19. Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi	72
Çizelge 4.20. Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi (Devam)	73
Çizelge 4.21. Sıcaklık stabilitesinin lipaz aktivitesi üzerine etkisi	73
Çizelge 4.22. pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi	74
Çizelge 4.23. pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi (Devam)	75
Çizelge 4.24. pH stabilitesinin lipaz enzimi üzerine etkisi	75
Çizelge 4.25. Potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesine etkileri	77
Çizelge 4.26. Lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	78
Çizelge 4.27. Ham enzimin depolanma stabilitesi	81
Çizelge 4.28. Liyofilize edilmiş lipaz enzimi aktivitesine farklı sıcaklık ve farklı ve farklı konsantrasyonlardaki deterjan katkılarının etkisi.....	82
Çizelge 4.29. Farklı kirleticiler elde edilen liyofilize lipaz enziminin uygulandığı kumaşlarda beyazlık indeksi ölçümleri.....	84

1. GİRİŞ

Hücrel yapılar için önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Binlerce yıl öncesinde enzimlerin ve enzim üreten organizmaların kullanılmasına karşılık, enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda gözlenmeye başlanmıştır. Endüstride kullanılan kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında enzimlerin kullanımı pek çok avantaj sağlamaktadır. Yüksek katalitik etkinlik ve özgüllüklere sahip olmaları, gereksiz yan ürünleri oluşturmaması, enzimlerin protein yapıda olmaları biyolojik olarak bozulabilmelerine olanak tanınması ve atık bertarafını kolaylaştırması nedeni ile enzimlerin endüstriyel olarak kullanımı 1960'lerden bu yana artan bir ivmeyle yaygınlaşmaktadır (Aehle 2004, Krajewska 2003). Enzimler başta gıda sanayisi olmak üzere deterjan endüstrisinde, kâğıt üretiminde, deri işlenmesinde, tekstil endüstri gibi diğer endüstriyel alanlarda da kullanıldığı gibi tıpta teşhis ve tedavide de geniş bir kullanım alanına sahiptir (Kirk ve ark. 2002, Daniels 1992). Dünya genelinde kullanılan ticari enzimlerin %60'ını proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %5'ini lipazlar ve geri kalan kısmını diğer enzimler oluşturmaktadır (Zimmerman ve ark. 2014, Sidhu ve ark. 1997).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %80'nini polimerlerin doğal yapısını bozabilen hidrolazlar oluşturmaktadır (Kasavi 2006). Endüstride en geniş yer bulan hidrolaz grubundaki enzimler proteazlar, amilazlar, lipazlar ve fitazlardır. Bu enzimler arasındaki lipazlar (Triaçilgliserol açılhidrolazlar; EC 3.1.1.3) uzun zincirli yağ asitlerinin gliserol esterlerini parçalayan enzimlerdir (Babu ve Rao 2007, Prazeres ve ark. 2006). Lipazlar çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için kullanımı hızlı ve istikrarlı bir şekilde arttığı için fizyolojik ve ticari olarak önemli bir enzim grubudur (Jaeger ve Eggert 2002). Lipazların kullanım alanları çok geniştir. Genel olarak, lipazlar organik kimyasal işleme, deterjan formülasyonu, biyosülfonat sentezi, zirai kimyasal endüstri, kâğıt imalatı, gıda, kozmetik ve farmasötik işlemede gelecek vaat eden uygulamalara sahiptir (Houde ve ark. 2004, Sharma ve ark. 2002). Lipazlar hayvan yemlerinde de büyük bir uygulama alanı bulmaktadır. Tıpta lipaz yardımıyla yapılan kan testi akut pankreatit ve yağların lipitlere parçalanmasına yardımcı olarak pankreas enzimi

replasman tedavisi (PERT) gören hastalara da yardımcı olmaktadır. Diğer yandan, yüksek seçicilik avantajına sahip olan lipazlar polifenol ve polyester gibi polimerlerin sentezini katalizlemek için kullanılırlar. Çoklu reaktif gruplara sahip yapısal olarak karmaşık monomerler, farklı kaynaklardan elde edilen ticari lipazlar kullanılarak yüksek verimle polimerleştirilirler. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Günümüzde endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin yaklaşık %96'sı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Wolfgang 2004). Bunların yaklaşık %60'ı filamentöz fungi, %24'ü bakteriler, %6'sı hayvanlar, %4'ü mayalar ve %2'si *Streptomyces* tarafından üretilmektedir (Lowe, 2001). Çeşitli endüstri alanlarında kullanılan enzimlerin dağılımlarına bakıldığında gıda endüstrisinde %41, deterjan endüstrisinde %34, tekstilde %11, deri endüstrisinde %3, kağıt endüstrisinde %1 ve diğer uygulamalarda %6 oranında enzim kullanılmaktadır (Smith 2004).

Deterjan endüstrisi endüstriyel enzimlerin büyük piyasasını oluşturmaktadır (Saeki ve ark. 2007). Deterjan katkı maddesi olarak enzimlerin kullanımı hem değer hem de hacim olarak endüstriyel enzimlerin hala en geniş uygulaması görünümündedir (Kirk ve ark. 2002). Enzim teknolojisindeki hızlı gelişmeler ile birlikte, deterjan endüstrisinde mikrobiyal lipazlara olan talebi de arttırmıştır. Mikrobiyal lipazlar, yüksek verimdeki çeşitliliği, genetik modifikasyon kolaylığı ve katalitik aktiviteleri nedeniyle hayvanlardan ve bitkilerden elde edilen lipazlardan daha etkili olabilir. Endüstride daha çok bakteri ve mantar lipazları tercih edilmektedir. Bakteriler içerisinde *Bacillus* türleri önemli bir yer tutmaktadır. Çünkü bazı *Bacillus* türleri termostabil lipaz üretimine sahiptir ve termostabil lipazlar endüstride geniş yer bulmaktadırlar (Bhosale ve ark. 2016). Bakteriyel lipazlar çoğunlukla ekstraselülerdir ve sıcaklık, pH, azot ve karbon kaynakları, inorganik tuzlar, havalandırma ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi beslenme ve fiziko-kimyasal faktörlerden büyük ölçüde etkilenirler (Gupta ve ark. 2004). Mikrobiyal yolla enzim üretiminin ilk aşaması uygun mikroorganizmanın seçimidir. Kültür ortamı ve fermentasyon koşulları da enzim üretimini etkileyen önemli parametrelerdir. Ortam içeriğinin optimize edilmesi amacıyla farklı kaynaklı karbon,

azot ve metal iyon kaynakları kullanılmaktadır (Khalil ve ark. 2003). Enzim üretiminde mikroorganizmaların yüksek bir paya sahip olması nedeni ile üretimi artırmak için üretim ortamının modifiye edilmesi kadar modifiye edilmiş mikroorganizmaların kullanılması yoluna da gidilmektedir.

Bu tez projesinin amacı, doğal kaynaklarımız olan toprak örneklerinden (50 farklı şehir) daha önceden izole edilmiş toplam 341 *Bacillus sp.* suşlarından lipaz enzimi üretim kapasitelerinin saptanması, en yüksek lipaz üretimine sahip bir adet *Bacillus sp.* suşunun seçilerek 16S rRNA ile tür seviyesinde tanımlanması, lipaz enziminin üretim koşullarının optimizasyonu, kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve deterjan endüstrisinde kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Lipazların tarihçesi

300 yıldan uzun süredir trigliseritleri hidrolize eden enzimler incelenmiş ve lipazların hidrolizi katalizleyebilme ve esterlerin sentezini yapma kabiliyeti 1927 yılında tanınmıştır (Van Der Walle 1927). Claude Bemard lipazları 1846 yılında, insan pankreas hücreleri üzerinde çalışırken keşfetmiştir. Pankreas suyunda, çözünmez yağ damlacıklarını hidrolize eden ve bunları çözünür ürünlere dönüştüren bir enzim olarak gözlenmiştir. Lipazlar geleneksel olarak hayvan pankreasından elde edilir. Lipazlar diğer hidrolazlarla (pankreatin) ham bir karışımı ya da saflaştırılmış halinde insan tüketimi için sindirimin yardımcısı olarak kullanılır. Pankreas sıkıntısı ve mevcut malzemelerin toplanmasındaki zorluklarla mikrobiyal lipazlara ilk ilgi gelişmiştir (Hasan ve ark. 2006). 1901'de, varlıkları *Bacillus* cinsi bakterilerde gözlemlenmiştir (Jaeger ve ark. 1994) ve daha sonra başka mikroorganizmalarda da tespit edilmiştir bu mikroorganizmalar *Candida*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderi* ve *Streptomyces*'dir (Anjali Ve Hareesh 2013).

Bugün en iyi araştırılmış lipaz üreten bakterileri temsil edenler *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* ve *B. Fluorescens* olarak verilmektedir (Jaeger ve ark. 1994). Daha sonraları lipazların sentezinden sorumlu olan genler dizinlenmiş ve otuzun üzerinde doğal kaynaktan elde edilen lipaz geni çeşitli konak hücrelerine aktarılmıştır (Jawed ve ark. 2019). Bugün halen lipaz üreten yeni mikroorganizmalar doğadan izole edilmekte ve karakteristik özellikleri ortaya çıkarılmaktadır.

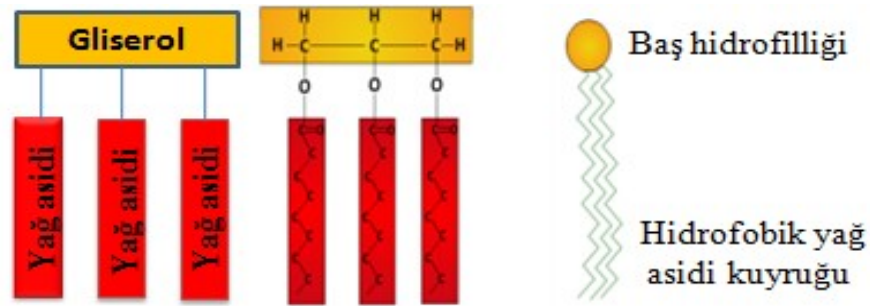
2.2. Lipaz - katalizli reaksiyonlar

Genellikle lipaz katalizli reaksiyonlar esas olarak sulu ve susuz sistemlerde hidroliz ve sentez olmak üzere iki kategori altında gruplanır (Sharma ve ark. 2001). Sentez reaksiyonları esterifikasyon ve transesterifikasyon (aminoliz, interesterifikasyon, alkoliz ve asidoliz) olarak sınıflandırılmaktadır (Castillo ve ark. 2015). Bu reaksiyonlarda oluşturulabilen farklı bağ tipleri içerisinde en öne çıkanlar C-C, C-N, C-O veya C<S bağlarıdır (Cai ve ark. 2011). Farklı reaksiyon özelliklerinden dolayı endüstride geniş

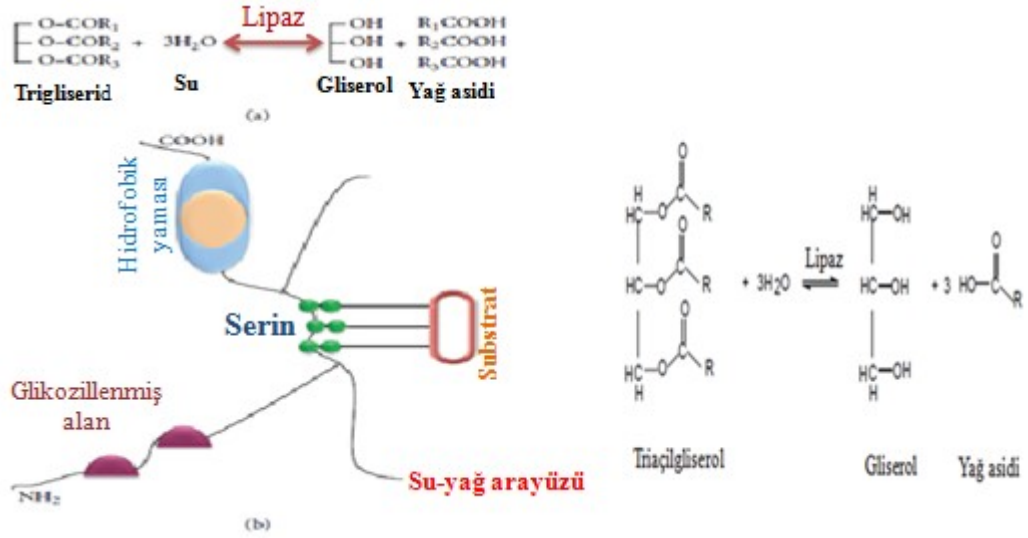
bir uygulama alanına sahiptir (Divakar ve Manohar 2007). Lipazlar hem kökenleri (bakteriyel, fungal, memeli vb.) hem de özellikleri bakımından büyük ölçüde farklılık gösterirler ve geniş bir aralıkta yer alan farklı karboksilik esterlerin hidrolizini veya sentezini katalize ederek organik asitler ve gliserol açığa çıkartabilirler (Hasan ve ark. 2006). Lipaz katalizli reaksiyonlar ağırlıklı olarak biyoproses endüstrilerinde gübreler, biyodizel, kozmetikler, aroma verici yiyecekler, vs. gibi çeşitli önemli ürünlerin üretimi için kullanılmaktadır.

2.2.1. Hidroliz

Genel olarak, enzimatik hidroliz bilim, teknoloji ve endüstride önemli kabul edilir, lipazlar su moleküllerinin varlığında triağılgiserollerin ester bağlarını katalizler ve bu olaya hidroliz denir. Triağılgiseroller lipazların ana substratlarıdır. Bunlar yüksüz lipidlerdir. Trigliseritler, bir gliserol molekülü ve ester bağlarıyla birbirine bağlanan üç yağ asidi molekülünden oluşan en yaygın lipid tipleridir (şekil 2.1). Herhangi bir lipiddeki gliserol molekülü her zaman aynı kalır. Yağ asitleri, genellikle son ucunda bir karboksil grubu (-COOH) bulunan 14-24 karbon içeren hidrokarbon kuyruğundan oluşan organik asitlerdir (Anonim 2010). Lipoliz olarak da bilinen olayda lipaz varlığında yağ veya esterin karşılık gelen yağ asitlerine ve gliserol veya alkole parçalanmasını içeren bir hidroliz reaksiyonu gerçekleşmektedir (şekil 2.2).



Şekil 2.1 Trigliserit yapısı (Anonim 2010)



Şekil 2.2. (a) Trigliseritin lipaz ile hidrolizi. (b) Bir lipaz molekülünün substrat etkileşimli bölgesinin temsili gösterimi) (Gopinath ve ark. 2013).

Yağların enzimatik parçalanmasında lipazları kullanmak yüksek verimlilik ve spesifikliğin yanında düşük sıcaklık ve basınçta gerçekleştirildiğinden oldukça caziptir. Bu reaksiyonlar ile yağ asitleri, diaçil gliseroller, monoasilgliseroller, günlük ürünler, tatlandırıcı maddeler ve deterjanların üretiminde kullanılmaktadır (Villeneuve ve ark. 2000, Sökmen 2005). Bu esterolitik reaksiyonlar, N-izopropilakrilamid ve süksinik asite dayanan polimerik matrisler gibi çok çeşitli ürünlerin sentezinde büyük bir potansiyele sahiptir (Sarmah ve ark. 2018). Ayrıca, gliserol ve karşılık gelen serbest yağ asidi üretmek için yüksek oleat ayçiçeği yağı rasemik esterolitik reaksiyonunu katalize etmek için *C. rugosa*'dan lipaz kullanılmıştır (Milasinovic ve ark. 2014). Ayrıca, bebek sütü formülleri, hidrolitik katalizör olarak lipaz kullanılarak üretilir (Kim ve Akoh 2015). Değerli yağ asitleri üretmek için zeytinyağının enzimatik hidrolizinin, uzun alkil zinciri iyonik sıvıları tarafından oluşturulan emülsiyon sistemleri ile geliştirilebileceği bildirilmiştir (Santos ve ark. 2015).

2.2.2. Sentez reaksiyonları

2.2.2.1. Esterifikasyon

Esterifikasyon, alkoller ve karboksilik asitler arasında ester ve su ile sonuçlanan çift yönlü bir reaksiyondur (şekil 2.3). Esterifikasyonda lipaz bir yağ asidini bir kovalent bağla bir alkole bağlayarak bir ester sentezler ve bir su molekülü açığa çıkartır (Castillo ve ark. 2015). Esterifikasyon hidrolizin tam tersi gerçekleşen bir reaksiyondur. Esterifikasyon reaksiyonları tersinir reaksiyonlardır ve susuz ortamda gerçekleşirler. Reaksiyon ortamında aşırı su olması durumunda denge hidroliz yönündedir. Fakat ortamda su miktarı sınırlı ise denge esterifikasyon tarafındadır (Şeleci 2007). Lipaz katalizli esterifikasyon, organik ester üretimi alanında tek yan ürün olarak elde edilen su açısından cazip olduğu ve konvansiyonel kimyasal sentez işlemlerinin aksine herhangi bir tehlikeli çözücü kullanımını içermemesi nedeniyle organik ester üretimi alanında büyük önem kazanmaktadır. Ek olarak, esterleşme işlemi sırasında suyun yerinde çıkarılmasıyla tam dönüşümler sağlanabilir (Stergiou ve ark. 2013).

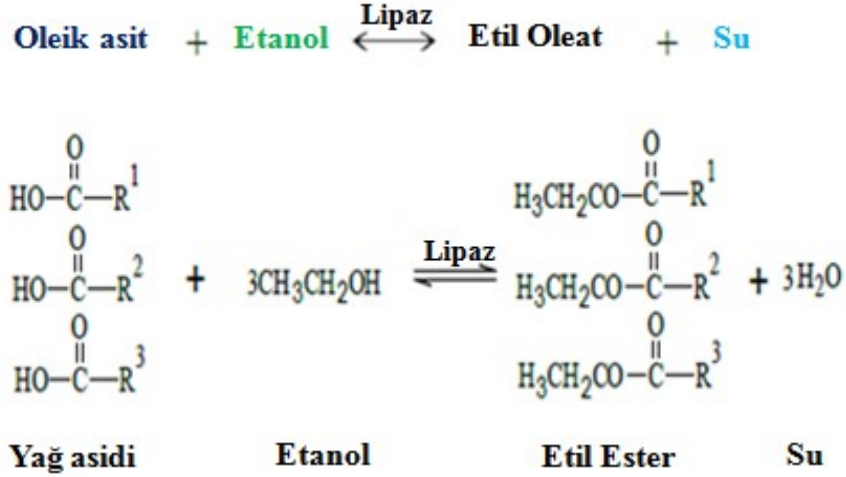
Esterlerin geniş bir kullanım yelpazesine sahip olması nedeniyle, esterleşme son derece önemlidir. Esterifikasyon sonucunda monoaçılgliceroller diaçılgliceroller ve triaçılgliceroller oluşmakta ve bunlar kozmetik, gıda, eczacılık gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Clementz ve ark. 2016). Lipaz katalizli esterifikasyon, emülgatör olarak kullanılan monoasilgliceroller ve kozmetik endüstrisinde kullanılan jojoba yağına benzeyen balmumu esterleri gibi çeşitli ürünler verir (Kumar 2009).

Bazı önemli örnekler arasında, laktik asitleri veya alkol içeren karboksilik asitleri kapsayan esterleşmeyi katalize etmek için *C. Antarktika*'dan lipaz kullanılmaktadır. Ayrıca *R. meihei* 'den elde edilen lipaz kullanılarak di hidroksi stearik asidin esterlenmesi sağlanmaktadır (Phuah ve ark. 2015).

Lipaz katalizli esterleşme reaksiyonlarının çoğu, gıda endüstrisinde, özellikle katı ve sıvı yağlardan gliseritlerin üretiminde kullanılır (Reis ve ark. 2009).

Bu reaksiyonlar, bitkisel yağların insan kullanımı için değiştirilmesinden saf kimyasalların üretilmesine kadar değişen uygulamalara sahiptir. Lipazla katalizlenmiş şekerlerin ve şeker alkollerinin biyobozunurlukları ve düşük toksisiteleri nedeniyle geleneksel yöntemlere göre avantajlı olduğu bulunmaktadır (Sharma ve Kanwar 2014).

Lipaz katalizi, esterifikasyon yoluyla oleik asit, bitkisel yağ ve mikroalgdan biyodizel üretiminde iyi bilinmektedir (Fernandez ve ark. 2010).



Şekil 2.3. Lipaz tarafından esterifikasyon reaksiyonu (Ganasen ve ark. 2014).

2.2.2.2. Transesterifikasyon

Transesterifikasyon, prensip olarak esterlerin alkoller, karboksilik asitler ve diğer esterlerle reaksiyon gerçekleştirmesidir (Nikul ve ark. 2015). Bir esterin organik grubu, alkol (alkoliz), asit (asidoliz), ester (interesterifikasyon) ve amin veya amonyak (aminoliz) grubuyla yer değiştirir. Dolayısıyla, lipazlar tarafından katalize edilen transesterifikasyon reaksiyonları alkoliz, asidoliz, aminoliz ve interesterifikasyonu reaksiyonlarını içermektedir (Castillo ve ark. 2015).

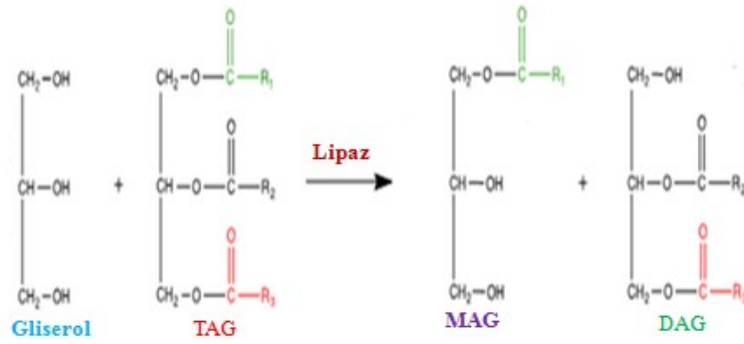
Kimyasal modifikasyon endüstride yaygın olarak kullanılır, ancak yalnızca randomize ürünler yapılabilir. Enzimatik modifikasyon avantajlıdır, çünkü sadece hafif reaksiyon koşulları gereklidir, minimal yan ürün oluşumu ürün verimini artırır ve lipazların spesifikliğı ürün özellikleri ve uygulamaları üzerinde daha iyi kontrol yapılmasına izin verir.

Çeşitli ticari açıdan önemli kimyasallar transesterifikasyon reaksiyonları yanı sıra alkoliz, asidoliz ve interesterifikasyon ile üretilmektedir. Bunun nedeni, esas olarak lipaz katalizlenen reaksiyonların daha az enerji harcadığı ve kolay ürün geri kazanımı sergilemesidir. Biyodizel üretiminde lipaz katalize eden reaksiyonlar en önemlisi

transesterifikasyondur. Bu tip reaksiyon çevre dost ve ekonomik verimli açıdan biyodizel uygulama süreçleri çok cazip bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, lipaz katalizli transesterifikasyon ile gıda endüstrisindeki ucuz, yok edilemeyen ve bol miktarda bulunan atık yağları kullanarak biyodizel sentezi için etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Borrelli ve Trono 2015).

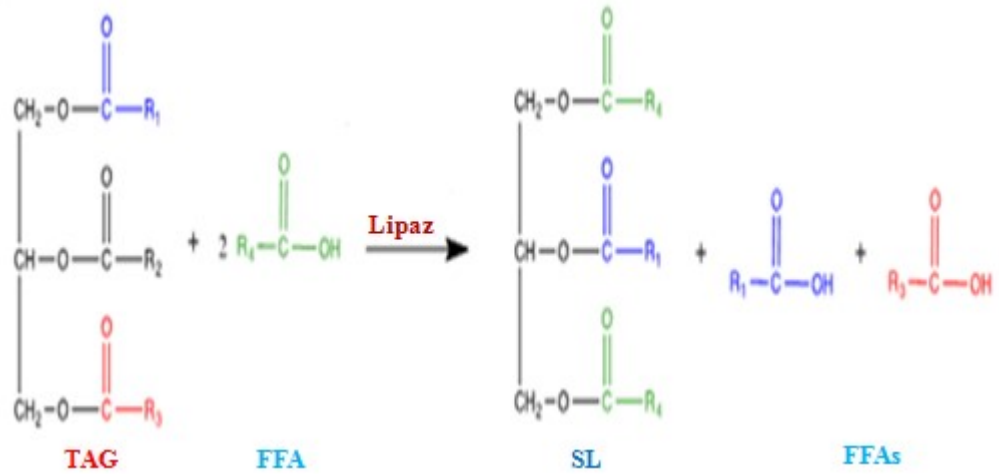
Diğer uygulamalar çeşitli kaynaklardan arasında lipazlar kullanılarak sükroz esterlerinin sentezlenmektedir. Örneği *M. Meihei* sükroz ve metanol transesterifikasyonu ile emülsiferler, kişisel bakımın ve kozmetik ürünlerin önemli üretim uygulamalara sahip olmaktadır (Shahla ve ark. 2010). Daha ucuz yiyecek maddelerinden kakao yağı üretimi de örnek olarak verilebilir. Bu ürün palm yağı ve stearik asit veya palm yağı ve tristearogliserol içeren lipaz katalizli transesterifikasyonu ile gerçekleştirilmektedir (Villeneuve ve ark. 2000). Ayrıca, palm stearin karışımlarının ve ticari lipozim bazlı mango lipitlerinde *T. lanuginosus* bakterisinin interesterifikasyonu ile özel yağlar sentezlenmektedir.

Alkoliz reaksiyonları; triaçilgliserol (TAG) moleküllerinden yağ açıl gruplarının gliserol (gliseroliz) veya etanol (etanoliz) gibi bir alkole aktarıldığı reaksiyondur (Rousseau ve Marangoni 2008). Yani alkoliz, bir alkol ve bir ester arasında gerçekleşen esterleşme reaksiyonudur (şekil 2.4) (Akdere 2003). Bu ürünler kozmetik, gıda ve eczacılık gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır (Gunstone 2001). Alkoliz reaksiyonlarında metanol, bütanol, propanol gibi basit alkoller kullanılır. Bu alkoller arasında en çok metanol kullanım alanı bulmaktadır. Çünkü metanol kısa zincirli bir alkoldür ve polar bir bileşiktir (Willis ve Marangoni 2002).



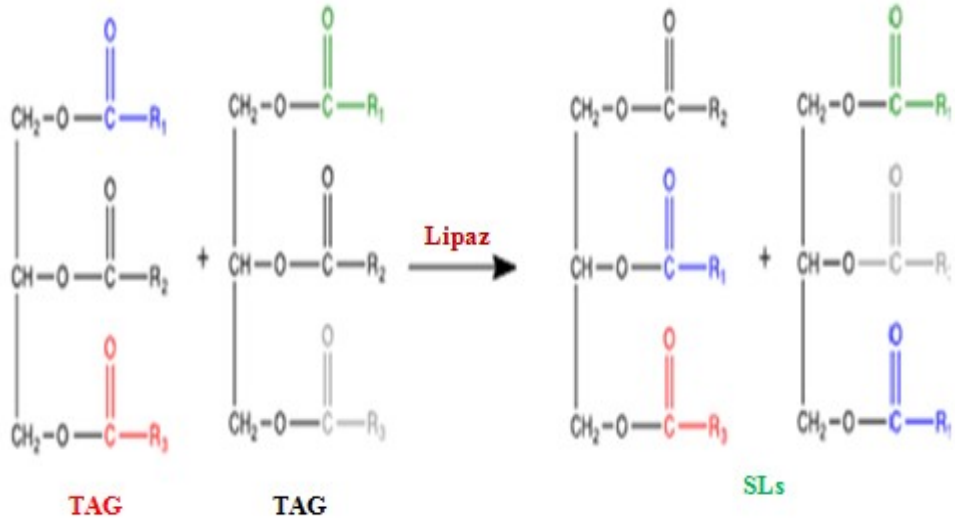
Şekil 2.4. Alkoliz reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler TAG: Triaçilgliserol; MAG: Monoaçilgliserol; DAG: Diaçil gliserol (Rousseau ve Marangoni 2008).

Asidoliz reaksiyonları; yağ açıl gruplarının serbest yağ asitlerinden (serbest yağ asitleri: FFA'lar) triaçilgliserol (TAG) moleküllerine dahil edilmesini içerir (Rousseau ve Marangoni 2008). Yani asidoliz, bir asit ve bir TAG arasında açıl gruplarının yer değiştirmesi reaksiyonudur (şekil 2.5) (Fomuso ve Akoh 2002). Asidoliz, yeni serbest yağ asidinin triaçilgliserole katılımını gerçekleştirmede son derece etkili bir yöntemdir (Willis ve Marangoni 2002). Belirli fonksiyonlara sahip serbest yağ asitlerini bitkisel yağlara bağlayarak, bu yağların besin değerleri yükseltilebilir (Senanayake ve Shahidi 2002). Bitkisel yağlar ve balık yağlarından yaygın olarak asidoliz yöntemi ile yapılandırılmış yağ üretilmektedir (Willis ve Marangoni 2002). Asidoliz reaksiyonları sonucu elde edilen ürünler enerji içeceklerinde de kullanılmaktadır. Daha ucuz yiyecek maddelerinden kakao yağı üretimi de örnek olarak verilebilir. Bu ürün palm yağı ve stearik asit veya palm yağı ve tristearogliserol içeren lipaz katalizli asidoliz ile gerçekleştirilmektedir (Villeneuve ve ark. 2000).



Şekil 2.5. Lipaz katalizli asidoliz reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler Serbest yağ asitleri (free fatty acids (FFAs)), Yapısal lipit (Structured lipid (SL)) (Rousseau ve Marangoni 2008)

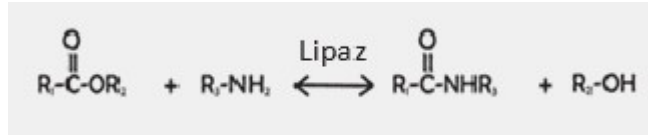
İnteresterifikasyonu (iç esterleşme) reaksiyonları; iki veya daha fazla TAG molekülü arasında yağ açıl gruplarının değişimini içerir (şekil 2.6). Azaltılmış kalorili yağlar ve düşük trans/trans serbest yağlar lipaz varlığında interesterleşme reaksiyonu ile üretilir. Bu yağlar atıştırmalık ürünlerde, trans serbest margarin yapımında, soslar ve çipslerde kullanılmaktadır (Anonim 2018).



Şekil 2.6. Lipaz katalizli interesterifikasyon reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler (Rousseau ve Marangoni, 2008).

Aminoliz; esterlerin aminolizi elektrofil ve bir nükleofil bir arasındaki bir model reaksiyonudur. Reaksiyon esas olarak bir molekülün bir amin veya amonyak ile

reaksiyona girmesini içerir (Sarmah ve ark. 2018). Lipaz katalizli aminoliz reaksiyonları (şekil 2.7), özellikle farmasötik endüstrisinde, önemli anahtar kiral olarak saf ürünlerin doğrudan sentezini kolaylaştırdığı için önemli endüstriyel uygulamalara sahiptir. Dikkate değer farmasötik uygulamaların bazıları, domuz pankreas lipazı ve *C. cylindracea* lipazı tarafından üretilen olağan ve olağandışı amino asitleri içeren peptit sentezlerini içerir (Hassan 2014). Diğer örnekler, birçok ilacın baş bileşenleri olan asit amino asit esterlerinin sentezidir (Xu ve ark. 2015); fibromiyaljinin klinik tedavisine yardımcı olan milnacipran gibi ilaçların sentezi, (Sanfilippo ve ark. 2014) ve anti-sıtma ilaçlarının sentezi ve hormon reseptörlerinin sentezi (Hassan ve ark. 2015). Lipaz katalizli aminolizin diğer uygulama alanları kozmetik ve agrokimyasal ürünleri içerir (Couturier ve ark. 2009).



Şekil 2.7. Lipaz tarafından aminoliz reaksiyonu (Borrelli ve Trono 2015)

2.3. Lipazların adlandırılması ve sınıflandırılması

2.3.1. Lipazların adlandırılması

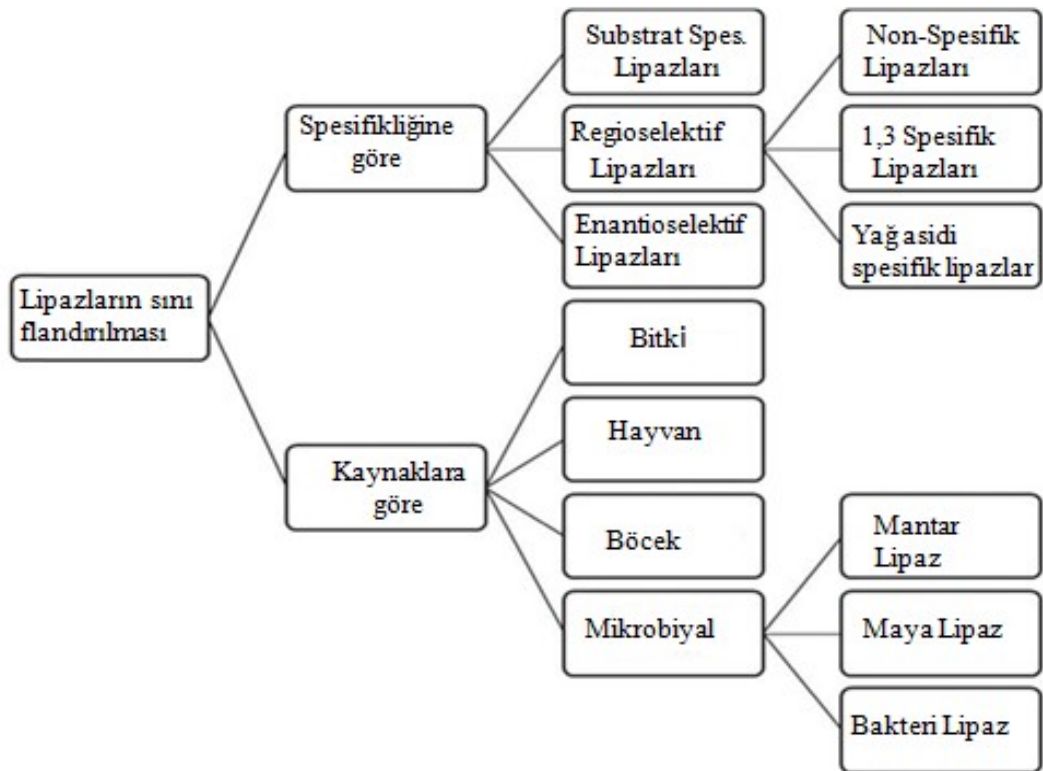
Lipolitik enzimler en önemli biyokatalistlerden biridir. Lipolitik enzimler gerçek lipazlar ve esterazları kapsamaktadır. Lipaz (EC 3.1.1.3) ve esteraz (EC 3.1.1.1) “Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komitesi” tarafından serin hidrolazlar sınıfına alınmıştır ve bunlar çok geniş substrat spesifitesi göstermektedir. Gerçek lipazlar (EC 3.1.1.3), 10 karbon atomundan daha uzun açıl zincir uzunluklarına sahip uzun zincirli açilgliserollerinin hidrolizini ve sentezini katalize eden karboksilesteraz olarak tanımlanmaktadır (şekil 2.8). Buna karşılık, esterazlar (EC 3.1.1.1) suda çözünür substratları tercih eder ve kısa asil zincir uzunluklarında, 10 karbon atomlu veya daha az olan gliserollerin hidrolizini katalize eder (bunlar adlandırma 4 nolu). Lipazlar trigliseritlerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolizini sağlayan enzimlerdir. Lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar çift yönlüdür (Nwuche ve Ogbonna 2011).



Şekil 2.8. Lipaz enziminin EC sınıflandırılması (Gül 2013)

2.3.2. Lipazların Sınıflandırılması

Genel olarak lipazlar, spesifikliklerinin (özelliklerinin) yanı sıra kaynaklarına göre sınıflandırılabilir (şekil 2.9).



Şekil 2.9. Spesifikliklere ve kaynaklara göre lipazların sınıflandırılması (Sarmah ve ark. 2018)

2.3.2.1. Spesifikliğine göre lipazların sınıflandırılması

Spesifiklik; üç ana kategoride gruplandırılabilir olan lipazların endüstriyel uygulamalarının gösterilmesinde önemli bir kriterdir; (i) substrata özgü, (ii) regioselektif (bölgesel seçicilik) ve (iii) enantioselektif (enantiyo seçicilik). Farklı lipaz sınıflarının spesifikliğine göre işlevselliği çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Spesifiklerine göre lipazların sınıflandırılması (Sarmah ve ark. 2018)

Ana sınıflandırma	Substrat-Enzim Sistemi	Tipi	Doğruluk Zaman Uygulamaları	Kaynaklar
Substrat spesifiği	Kamelya yağı + <i>P. Camembertii</i> lipaz	Esterifikasyon	dişil gliserol yüksek saflığın üretimi	Zheng ve ark. (2014)
Regioselektif	<i>Antarctica</i> lipaz + Kanola yağı	Asidoliz	Yapısal lipitler Üretimi	Savaghebi ve ark. (2012)
	<i>R. miehei</i> 'nin lipaz + Ceviz yağı + kaprilik asit	Asidoliz	Yapısal lipitler Üretimi	Todorova ve ark. (2015)
	<i>R. oryzae</i> 'nin lipaz + zeytinyağı + metanol + heksan	Transesterifikasyon	Biyodiyetel	Clementz ve ark. (2016)
	MJ2 <i>A. Oryzae</i> 'nin lipaz + metil butirat	Hidroliz	Yakıtı, atık su denitrifikasyonu, Yakıtı hidrojen üretimi, biyodizel Transesterifikasyon	Song ve ark. (2008)
Enantiospesifik	<i>C. antarctica</i> 'nin lipazı + alkol	Transesterifikasyon	İlaç endüstrisi	Borza ve Peter (2015)

2.3.2.1.1. Substrat spesifik lipazları

Lipazların spesifikliği, enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Spesifik tipleri; I. Substrat: (a) aynı enzim ile farklı TG, DG ve MG lipoliz oranları; (b) TG, DG ve MG için aynı kaynaktan ayrı enzimler; II. Konumsal: (a) primer esterler; (b) sekonder esterler ve (c) spesifik olmayan hidroliz; III. Yağ asidi, Yağ asidi, benzer yağ asitleri için tercih edilir; IV. Stereospesifiklik: Bir primer esterine diğerine kıyasla daha hızlı hidrolizini kapsamaktadır (Jensen ve ark. 1983).

Genel olarak, substrata özgü lipazlar tarafından etki edilebilecek substratlar arasında yağ asitleri ve alkol bulunur (Kapoor ve Gupta 2012). Son zamanlarda yapılan bir araştırma, endüstriyel olarak ilgili çeşitli işlemlerde lipazlardan yararlanmak için enzim stabilitesi ile birlikte substrat spesifikliğin önemi bilmektedir (Brigida ve ark. 2014). Substrat-spesifik lipazlar reaksiyonlarda etkili bir şekilde kullanılabilir, örneğin, biyodizel (Ribeiro ve ark. 2011) ve yüksek saflıktaki diasilgliserollerin üretimi (Borza ve ark. 2015).

2.3.2.1.2. Regioselektif lipazlar

Lipaz regioselektifitesi, yapısal lipidlerin üretiminde önemli olan triasilgliserol molekülünde primer ve sekonder ester fonksiyonlarını ayırt etme yeteneğidir (Chandler, 2011). Bu tür bir lipaz özelliği, özellikle spesifik konfigürasyonda optimal fonksiyon gösteren izomerik bileşiklerin üretiminde, kimya ve farmasötik endüstrileri için büyük önem taşımaktadır.

Yakın zamanda meydana gelen regioselektif lipaz bulgularından bazıları, flavonoid türevlerini sentezlemek için *Rhizopus (R.) oryzae* lipaz kullanılarak ferulik asit ile kueteretin açılması (Kumar ve ark. 2016), *C. antarctica* lipaz B (Novozym 435) ve *Burkholderia cepacia* lipaz (Amano PS-IM) kullanılarak akasetin ve resveratrol 3,5-di-O-beta-glikopiranosid sentezi (Hanamur ve ark. 2016).

Regioselektif lipazlar ayrıca, seçici işlevlerine göre de sınıflandırılabilir. Non-Spesifik lipazlar: genellikle triasilgliserollerin serbest yağ asitlerine hidrolizini ve ara ürün olarak mono ve diaçilgliserollerle gliserolü katalize ederler; 1,3 spesifik lipazlar: bunlar yağ asitleri, 2-monoaçilgliseroller ve 1,3 veya 2,3 diaçilgliseroller üreten C1 ve C3 pozisyonlarında triasilgliserollerin hidrolizini katalize ederler; yağ asidine özgü lipazlar: bu lipazlar, C-9'da çift bağları olan uzun zincirli yağ asitlerine sahip esterleri hidrolize ederler (Ribeiro ve ark. 2011).

2.3.2.1.3. Enantiyoselektif lipazlar

Bu lipazlar tercihen rasematın izomerlerinden birini prokiral öncüllerinden diğerine hidrolize eder ve rasemik bir karışımdaki enantiyomerleri ayırt edebilir (Barros ve ark.

2010). Enatiyospesifik lipazlar tarafından katalize edilen işlemlerin bazıları, sekonder alkollerin farmasötik ürünlere transesterifikasyonunu (Borza ve ark. (2015), mentol benzoatın kozmetik / gıda ürünlerine hidrolizini (Dhake ve ark. (2013) ve glisidik asit metil esterinin tıbbi / sağlık bakım ürünlerine hidrolizini içerir (Su ve ark. 2014).

2.3.2.2. Kaynaklarına göre lipazların sınıflandırılması

Lipazlar bitkiler, hayvanlar, böcekler ve mikrobiyal organizmalar tarafından üretilir (Maldonado ve ark. 2014, Ray 2012).

2.3.2.2.1. Bitkisel lipazlar

Lipazlar, bitkinin çeşitli yerlerinden (kepekler, meyveler, lâteks vb), tohumlar veya fasulye de dâhil olmak üzere elde edilebilir. Bitki lipazları çoğu tohum kaynaklarından elde edilir. Ayrıca hint fasulyesi, afrika fasulyesi, karaağaç, ayçiçeği, acı bakla, keten tohumu, hindistancevizi, badem, kara kimyon, buğday, tahıl, pirinç, mısır, yulaf, arpa, susam, sorgum, vb dahil olmak üzere lipazlar bulunmaktadır. Tohumlarda, diğer kaynaklardan daha yüksek lipaz aktivitesi görülür. Yüksek konsantrasyonlarda triaçilgliseroller içerirler ve bitkilerin büyümesi için hidroliz edilen yağları enerji kaynağı olarak sağlamaktadır. Bitki tohumlarındaki lipaz aktivitesi çimlenme sırasında artar, burada lipazın etkisiyle triaçilgliseroller çözünerek şekerlere dönüştürür (Patil ve ark. 2011). Bitki kaynaklı lipazlar çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Meyve kaynakları dikkate alındığında, palm meyveli mesokarp’tan üretilen lipazın, çeşitli farmasötik, deterjan, yiyecek ve kozmetik ürünleri imalatında etkili olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda, son yapılan çalışmalar, davul çubuk ağacından üretilen lipazın obezitenin tedavisinde çok etkili olduğu tespit edilmiştir (Suwanno ve ark. 2017). Bitki lipazları düşük maliyetlerinden dolayı (özel uygulamalar, kolay işletmesi ve direk biyokatalizör olarak kullanması) çok çekici görünmektedir. Farklı yağ asitlerinin hidrolizle biyodizel üretimi için yenmez bitki kaynaklarından lipazlar elde edilmesi için çalışmalar devam etmektedir (Bankovic’ ve ark. 2012).

Çizelge 2.2. Bitki Kaynaklı Lipazlar (Sarmah ve ark. 2018)

Lipaz Kaynağı	Uyugulama	Kaynakça
Hint fasulye	Bitkisel yağların hidroliz	Salaberria ve ark. (2017)
Arpa	Düşük moleküler ağırlıklı suda çözünür substratların ve uzun zincirli çözünmeyen trigliseritlerin hidrolizi	Schneider ve ark. (2016)
Pirinç/pirinç kepeği	Fosfatidilkolin Sn-2 pozisyonun öncelikli hidrolizi	Qi ve ark. (2015)
Badem	Yağ hidrolizi	Huang ve ark. (2017)
Ay çekirdeği	Diğer yağlara etki ederek yapısal lipit (SL)'lerin üretimi	da Silva Serres ve ark. (2017)
Süpürge darısı	Alkollü içki üretimi	Moreau ve ark. (2016)
Palmiye meyveleri mezokarpı	İlaç, endüstriyel deterjan, yiyecek ve kozmetik	Suwanno ve ark. (2017).
Susam	Spesifik olmayan lipazlar	Oliveira ve ark. (2017)
Mısır	Yağ asitlerini serbest bırakmakda etkili olmak	Eze ve ark. (2017)

2.3.2.2.2. Hayvansal lipazlar

Hayvan hücreleri, yağların ve lipitlerin sindirimi sağlayan lipazlar sentezlemektedir (Patil ve ark. 2011). Ancak ürün manipölasyonu ve ürün ayrımı gibi karmaşık faktörler nedeniyle ticari üretime kıyasla klinik teşhis daha çok tercih edilmektedir. Bitkiler ve mikroorganizmalardan lipazlarla karşılaştırıldığında, bu lipazların üzerinde daha az çalışma vardır. Çeşitli hayvansal lipazları arasında, primer alkol esterlerin hidrolizi etkin biçimde katalize eden biyokimya yanı sıra, lipit kimyası alanları, pankreas lipazı bir araştırma aracı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Pahoja ve Sethar 2002). Ayrıca lipazlar, böcek dokularından elde edilebilir ve öncelikle larva gelişiminde rol oynadığı da belirtilmektedir (Rong ve ark. 2014, Roudsari ve ark. 2014).

Hayvansal lipaz kaynakları çizelge 2.3'te göstermiştir.

Çizelge 2.3. Hayvansal kaynaklı lipazlar

Lipaz Kaynağı	Kaynakça
İnsan pankreası	Borrelli ve Trono (2015)
Domuz pankreası	Borrelli ve Trono (2015)
Kangal balığı	Patil ve ark. (2011)
Akrep	Patil ve ark. (2011)
Levrek karaciğeri (Balık)	Sae-leaw ve Benjakul (2018)

2.3.2.3. Mikrobiyal lipazlar

Mikrobiyal lipazlar çok yaygındır ve üretimi kolay olduğu için endüstriyel uygulamaların daha ilgili çekmiştir (Ray 2012). Mikrobiyal lipazları biyoteknolojik uygulamalar için olağanüstü özgülüğü, güçlü ve daha detaylı bir araç haline getirmektedir. Mikrobiyal lipaz kaynakları mantar, maya ve bakterilerdir. Mikrobiyal lipazların çoğu ekstraselüler bakteri ve mantar türlerinden elde edilmektedir.

Üretimleri, sıcaklık, pH ve çözünmüş oksijen gibi fizikokimyasal faktörlerin yanı sıra ortam içeriğinden de büyük ölçüde etkilenmektedir.

2.3.2.3.1. Fungal (mantar) lipazlar

Lipaz üreten funguslar yağlarla kirlenmiş topraklardan, bitkisel yağların atıklarından, süt ürünleri sanayinden, tohumlardan ve bozulan gıdalar gibi çeşitli habitatlardan izole edilebilir (Sharma ve ark. 2001).

Tüm mikrobiyal lipazlar arasında, fungal lipazlar, termal ve pH stabilitesi, substrat özgülüğü, ekstraksiyondaki düşük maliyet ve organik çözücülerdeki etkin aktiviteleri gibi benzersiz özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılan lipazlardır (Patil ve ark. 2011). Bu lipazlar, ortamın karbon ve azot bileşimine bağlı olarak hem ekstrasellüler hem de intrasellülerdir (Sharma ve ark. 2011). Fungal kaynaklarından alınan lipazların genel görünümü ve bazı ilgili örneklerle ilgili endüstriyel uygulamaları Çizelge 2.4'te verilmiştir. Fungal lipazlarının hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon, deasetilasyon, alkoliz, asidoliz, sabunlaştırma, etanoliz gibi birçok reaksiyonda görev aldığı rapor edilmiştir. Fungal lipazlarında bildirilen gelişmeler katı hal

fermentasyonunu üretim için ümit verici bir teknoloji olarak vurgulamaktadır (Ramos ve ark. 2015).

Çizelge 2.4. Mantar kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Sarmah ve ark. 2018)

Reaksiyon tipi	Fungal kaynağı	Uygulama alanı	Substrat	Kaynakça
Hidroliz	<i>A. oryzae</i>	Miso üretimi	Soya fasulyesi	Abe ve ark. (2006)
	<i>A. nidulans</i>	Gıda ve kozmetik endüstrileri	Orta ve uzun yağ asidi zincirler	Shukla (2014)
	<i>Pythium ultimum</i>	Biyokontrol ajanları	Bitki lipitleri	Horner ve ark. 2012
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Yapısal lipitler üretimi (SL)	Atık yemeklik yağı	Kumar ve Negi (2015)
Esterifikasyon	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Gıda endüstrisi	Butil butirat	Sande ve ark. (2015)
	<i>Rhizomucor meihei</i>	Biyolojik yüzey aktif maddeler	Jatrofa (süt bitkisi) yağı	Gofferj ve ark. (2014)
	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Tıbbi, kozmetik, plastik katkı maddeleri	Laurik asit	Thakur (2012)
	<i>Penicillium roqueforti</i>	SL üretimi	Endüstriyel yağları ve atık yağları	Mioso ve ark. (2015)
Transesterifikasyon	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Kimya endüstrisi	Kısa zincirli alkoller	Sande ve ark. (2015)
	<i>T. lanuginosus</i>	Biyodizel	Kolza yağı	Gog ve ark. (2012)
	<i>Penicillium camemberti</i>	Pastane, kozmetik, ilaç	Doymuş monoglisitler	Padhi ve ark. (2012)
	<i>A. niger</i>	Biyodizel	Kolza yağı, Ayçiçek yağı	Zdarta ve Jesionowski (2016)
	<i>R. miehei</i>	Gıda endüstrisi	Heksanol	Dhake ve ark. (2013)
Alkoliz	<i>R. miehei</i>	Farklı yağ asitlerin katması	tripalmitin	Dias ve ark. (2013)

Çizelge 2.5. Mantar kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Devam)

	<i>R. oryzae</i>	Deterjanlar, Kozmetikler, Yağlamalar, Hidrolik sıvılar	Soya Fosfolipitleri	(Patil ve ark. (2011).
		Tat endüstrisi, koku	Triasilgliseritler	Dhake ve ark. (2013)
Asidoliz	<i>R. oryzae</i>	Biyo yağlamalar, ilaç, gıda endüstrisi	Oleik asit	Ray ve ark. (2013)
	<i>Rhizopusoryzae</i>	Gıda, Sağlık	Sızma zeytinyağı	Borrelli ve Trono (2015).
Sabunla şma	<i>Penicillium solitum</i>	Sabun üretimi	Uzun zincirleme Yağlar, Katı yağlar	Chinaglia ve ark. (2014)
Etanoliz	<i>R. arrhizus</i>	Biyodizel üretimi	Triolein	Sinkuniene ve ark. (2014)

2.3.2.3.2. Maya lipazları

Maya lipazları eczacılık, kimya, biyodizel gibi birçok endüstri tarafından kullanılan önemli bir lipaz kaynağı oluşturur. En önemli lipaz üreticileri olan *C. antarctica*, *C. rugosa*, *C. utilis* ve *Saccharomyces* türler geniş bir reaksiyon dizisini katalize eden lipazlara sahiptirler. Çizelge 2.5'te maya kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar ve uygulama alanları verilmiştir.

Çizelge 2.6. Maya kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Sarmah ve ark. 2018)

Reaksiyon tipi	Maya kaynağı	Uygulama alanı	Substrat	Kaynakça
Hidroliz	<i>C. rugosa</i>	Yağlı boyalar, vernikler, kozmetik, hızlı kuruyan yağlar	Linoleik asit	Kobayashi ve ark. (2012)
		Biyodizel	Palmiye yağı	Pirajan ve Giraldo (2011)
	<i>T. lanuginosus</i>	Biyodizel, yağlama, gıda endüstrisi.	Soya yağı	Oliveira ve ark. (2011)
	<i>C. lipolytica/Yarrowia lipolytica</i>	Biyo-sürfaktanlar	Trigliseritler	Brigida ve ark. (2014)

Çizelge 2.7. Maya kaynaklarından elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Devam)

	<i>C. antarctica</i>	Değerli yağ asidi sentezi	Zeytinyağı	Santos ve ark. (2105)
	<i>C. rugosa</i>	Parfüm endüstrisi	Metilfural tiyoasetat, furfural tiyoasetat	Dhake ve ark. (2013)
Esterifikasyon	<i>C. antarctica</i>	Gıda, kozmetik, ilaç, kimya endüstrisi.	Laktik asit	Primozić ve ark. (2016)
		Biyodizel, ilaç, tekstil, deri işleme, kozmetik	Yağ asitleri, yağ asidi esterleri	Xiao ve ark. (2015)
		Gıda, sabunlar, kozmetikler	Palmitik asitli gliserol	Kapoor ve Gupta (2012)
Transesterifikasyon	<i>C. antarctica</i>	Biyodizel	Ayçiçek yağı	Garlapati ve ark. (2013)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Medikal, zirai ilaç	Tributirin	Sharma ve ark. (2011)
	<i>C. antarctica</i>	Atık arıtma	Atık yağı	Gog ve ark. (2012)
Alkoliz	<i>C. antarctica</i>	İlaç, Kozmetik ve Gıda pekiştirmeler	Açıl ribonükleozitler	Baldessari ve Iglesias (2012)
Asidoliz	<i>C. antarctica</i>	Kozmetikler, deterjanlar	Tereyağ	Garcia ve ark. (2001)
		Gıda endüstrisi, kozmetik, ilaç	Açıl gliseroller Hodan bitkisinin yağı	Senanayake ve Shahidi (2002)

2.3.2.3.3. Bakteriyel Lipazlar

Bakteriyel lipazlar ekstrasellüler, intrasellüler veya zara bağlı olarak bulunabilirler. Lipazların çoğu glikoproteinlerdir, ancak bazı ekstrasellüler bakteriyel lipazlar lipoproteinlerdir (Sarmah ve ark. 2018). Bakteriyel lipazlar ilk olarak 1901 yılında *Serratia marescens* ve *Pseudomonas auroginosa* türlerinde gözlemlenmiştir (Hasan ark. 2006). *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* ve *Pseudomonas* cinsleri önemli bakteriyel lipaz kaynaklarıdır.

Çizelge 2.6’da bakteri kaynaklı lipazlar için gerçekleştirilen bazı endüstriyel uygulamalar verilmiştir. Son zamanlarda bildirilen çalışmalardan, termofilik bakteriler olarak, *B. licheniformis*’den elde edilen lipazlar Rashid ve ark. (2013) ve tabakhane sularından izole edilen *B. pumilus* lipazı endüstriyel uygulama için termal olarak kararlı ve ümit verici olduğu rapor edilmiştir (Laachari ve ark. 2015). Tekstil endüstrisinde

Pseudomonas cinsi bakterilerin ürettikleri lipazlar, kumaşlarla yağ lekelerinin temizlenmesinde kullanılmıştır.

1995 yılında Genencor International, AU-KBC Research Center, LifeSciences, Anna University kuruluşları tarafından ilk defa endüstriyel amaçlı lipaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Lumafast adı verilen ticari lipaz *Pseudomonas mendocina* ve Lipomaxadı verilen lipaz *Pseudomonas alcaligenes* bakterilerinden üretilmiştir.

Çizelge 2.8. Bakteriyel kaynaklardan elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Sarmah ve ark. 2018)

Reaksiyon tipi	Bakteriyel Kaynağı	Uygulama alanı	Substrat	Kaynakça
Hidroliz	<i>B. pumilus</i>	Biyoorganik sentez, yiyecek ve deterjan endüstrisi	Uzun zincirli triaçilgliseroller	Laachari ve ark. (2015)
	<i>B. licheniformis</i>	Petrol ve yağ endüstrisi	Trimiristin	Rashid ve ark. (2013)
	<i>B. thermoleovorans</i>	Petrol ve yağ endüstrisi	Yağlar ve trigliseritler	Patil ve ark. (2011)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gıda endüstrisi	Tribütirin	Xie ve ark. (2012)
Esterifikasyon	<i>B. coagulans</i>	Gıda işleme endüstrisi	Oleik asit ve etanol	Thakur (2012)
	<i>B. licheniformis</i>	Medikal ve sağlık	Kumarik asit	Sharma ve Kanwar (2014)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tadı endüstrisi	Yağ asidi ve alkoller	Patil ve ark. (2011)
Transesterifikasyon	<i>B. subtilis</i>	Biyodizel	Atık pişirme yağı	Treichel ve ark. (2010)
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Biyodizel jet yakıtı, hafif hidrokarbon yağı	Hint fıstığı	Bajaj ve ark. (2010)
	<i>Geobacillus. sps</i>	Biyodizel üretimi	Bitkisel yağı	Christopher ve ark. (2015)

Çizelge 2.9. Bakteriyel kaynaklardan elde edilen lipazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Devam)

	<i>B. stearothe mophilus</i>	Farklı yağ asitlerin birleşmesi	Tripalmitin	Thakur (2012)
Alkoliz	<i>Pseudomonas sps.</i>	Biyodizel üretimi, Hızlı kuruyan yağ	Trigliseritler	Salis ve ark. (2009)
Enantiyoselektif hidroliz.	<i>Serratiamarcescens</i>	Medikal ve sağlık bakım ürünleri	Glisidik asit metil ester	Su ve ark. (2014)

2.4. Lipazların yapısı

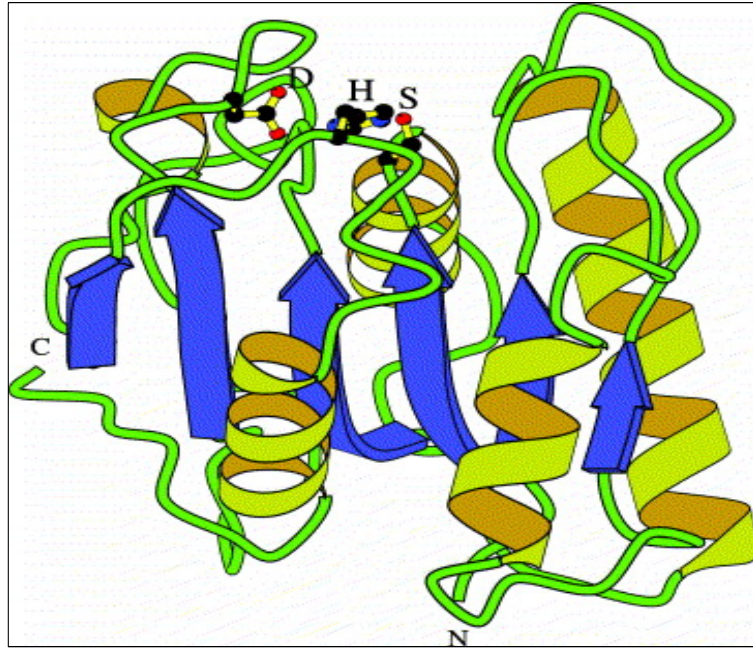
Lipazlar (EC 3.1.1.3) veya triaçilgliserol açılhidrolazlar, serin hidrolaz grubunun bir parçasını oluşturan enzimlerdir (Todd ve ark. 2001). Hidrolaz enzim ailesi ilk defa Ollis (1992) tarafından ortaya konmuştur. Yapısal olarak lipazlar ortak bir α/β hidrolaz katlanmasına sahiptir. Ortak α/β hidrolaz katlanmasının bileşenleri bir merkez, sekiz beta iplikli paralel β tabakalıdır. Burada sadece ikinci iplik (β_2) antiparaleldir, β_3 ile β_8 ipliklerini birbirine bağlayan merkez β -tabakasının yanlarında altı α helikal yapısı bulunmaktadır (Casas-Godoy ve ark. 2012). Bununla birlikte, β tabakasının organizasyonunun sayısı da farklı kaynaklı lipazlarda değişebilir (Gupta ve ark. 2015).

Enzimin aktif bölgesinde katalizden sorumlu iyi korunmuş bir katalitik üçlü (katalitik triad) bulunmaktadır. Katalitik bölgede katalizden sorumlu amino asitler nükleofilik serin, histidin ve glutamat veya aspartat'dır (katalitik triad) (Strzelczyk ve ark. 2016). Katalitik kısmı G-X1-S-X2-G motifi içerir, buradaki G glisin, S serin, X1 histidindir ve X2 glutamik veya aspartik asidi belirlemektedir (Vaquero ve ark. 2016).

Lipazın ana yapısal bileşenleri arasında kapak, bağlama cebi, oksianyon deliği ve disülfür bağı bulunur (Sarmah ve ark. 2018). Üç boyutlu lipaz yapılarının analizi, aktif bölgeyi kapsayan “kapak” olarak bilinen yapısal bir bileşeni ortaya çıkarmıştır (Casas-Godoy ve ark. 2012). Kapağın temel bileşeni, aktif bölgeyi kaplayan esnek bir yapı ile lipazın ana yapısına bağlanmış bir veya daha fazla α helikstir. Lipazların inaktif veya

kapalı konformasyonunda kapak aktif bölgeyi engeller. Bir lipit-su ara yüzünün varlığında (veya organik çözücü içinde), kapak aktif bölgeyi açar ve lipaz aktif hale gelir (Brzozowski ve ark. 2000, Reis ve ark. 2009).

Lipazların bağlanma cebi merkez β tabaka üzerinde bulunur. Burası hidrofobik, protein yüzeyinin yakınında bulunan çatlak benzeri bağlanma bölgesi ya da huni benzeri veya tünel benzeri bağlanma alanları olabilir (şekil 2.10).



Şekil 2.10. *B. subtilis* lipaz modeli. Katalitik triad residue'leri Ser78, His157 ve Asp134, sırasıyla S, H ve D. Enzimin N- ve C-terminalleri (Eggert ve ark. 2001).

Lipazların diğer bir önemli yapısal bileşeni, katalitik mekanizma sırasında oluşan tetrahedral ara ürünü stabilize eden oksianyon deliğidir (Casas-Godoy ve ark. 2012) Hidroliz sırasında, negatif yüklü bir tetrahedral ara ürün üretilir ve böylece oluşan oksijen iyonu, oksianyon delik residue'lerinin (aminoasit kalıntıları) rolü ile hidrojen bağı yoluyla stabilize olur (Gupta ve ark. 2015). Oksianyon deliği kalıntıları, bu oksijen iyonunun hidrojen bağı ile stabilize edilmesinde kilit bir rol oynar. Oksianyon deliğini çevreleyen diziden, üç tip tanımlanmıştır: GX, GGGX ve Y (Pleiss ve ark. 2000), Fischer ve ark. 2006). Lipazlar, reaksiyonu gerçekleştirmek için oksianyon deliğindeki

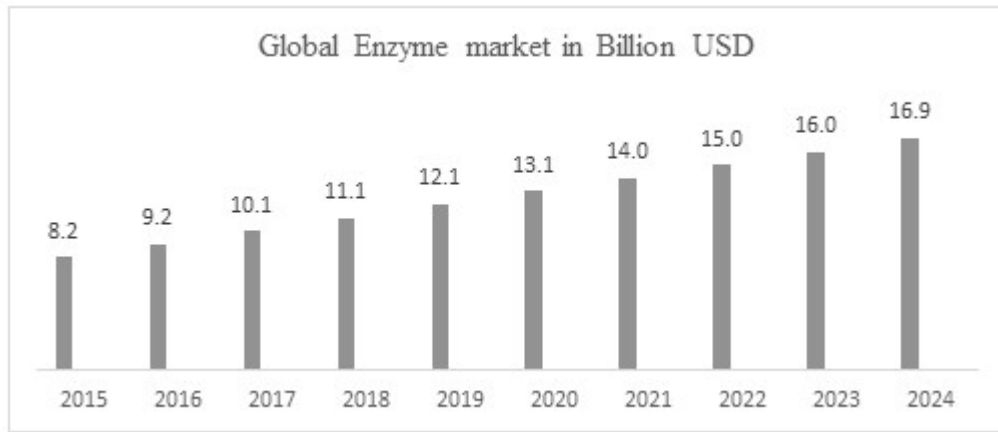
Thr ve Gln ve katalitik üçlünün His ve Asp kapsayan katalitik bölgenin çoğunu kullanır (Priego ve ark. 2009).

Ek olarak, lipazlar yapılarını korumak için bir ila dört disülfür bağı içeren sistein bakımından zengin proteinlerdir. Sistein kalıntıları arasında oluşan disülfid köprüleri, protein entropisini azaltarak konformasyonel stabiliteye önemli ölçüde katkıda bulunur (Gupta ve ark. 2015). Farklı kaynaklardan saflaştırılan lipazların üç boyutlu yapılarının birbirine büyük oranda benzerlik gösterdiği görülmüştür. Yapılan çalışmalarda 11 değişik lipaz türünün yüksek çözünürlükteki yapısı açıklanmıştır (Öztürk 2002).

2.5. Lipaz katalizli Reaksiyonların Endüstriyel Kullanım Alanı

Günümüzde yaklaşık 4000 kadar enzim bilinmektedir ve bunların 200 kadarı ticari amaçlı olarak kullanılmaktadır. 1960'lara kadar enzimlerin toplam yıllık satışı birkaç milyon dolar iken bu pazar olağanüstü şekilde büyümüştür

Küresel enzim pazarı 2018 yılında 11,1 milyar ABD doları olarak değerlendirilmiş ve 2024'te 16,9 milyar ABD doları olacağı tahmin edilmektedir ve enzim pazarının 2015 ve 2024 yılları arasında %6,6'lık sabit bir CAGR (The compound annual growth rate: Bileşik yıllık büyüme oranı)'da büyüyeceği düşünülmektedir (şekil 2.11).

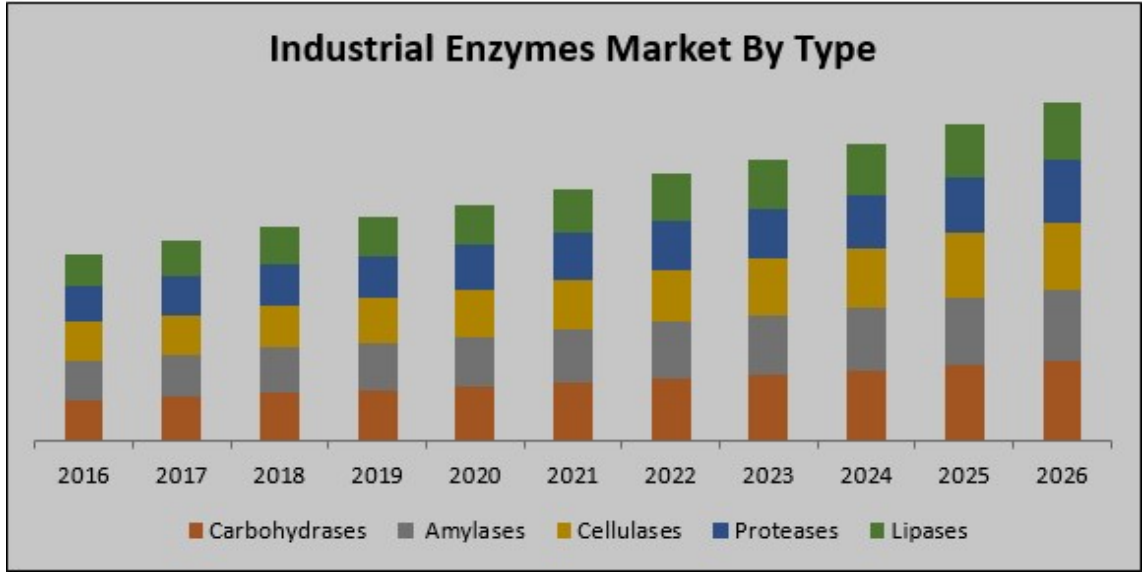


Şekil 2.11. Küresel enzim pazarının yıllara göre artışı (Anonim 2019).

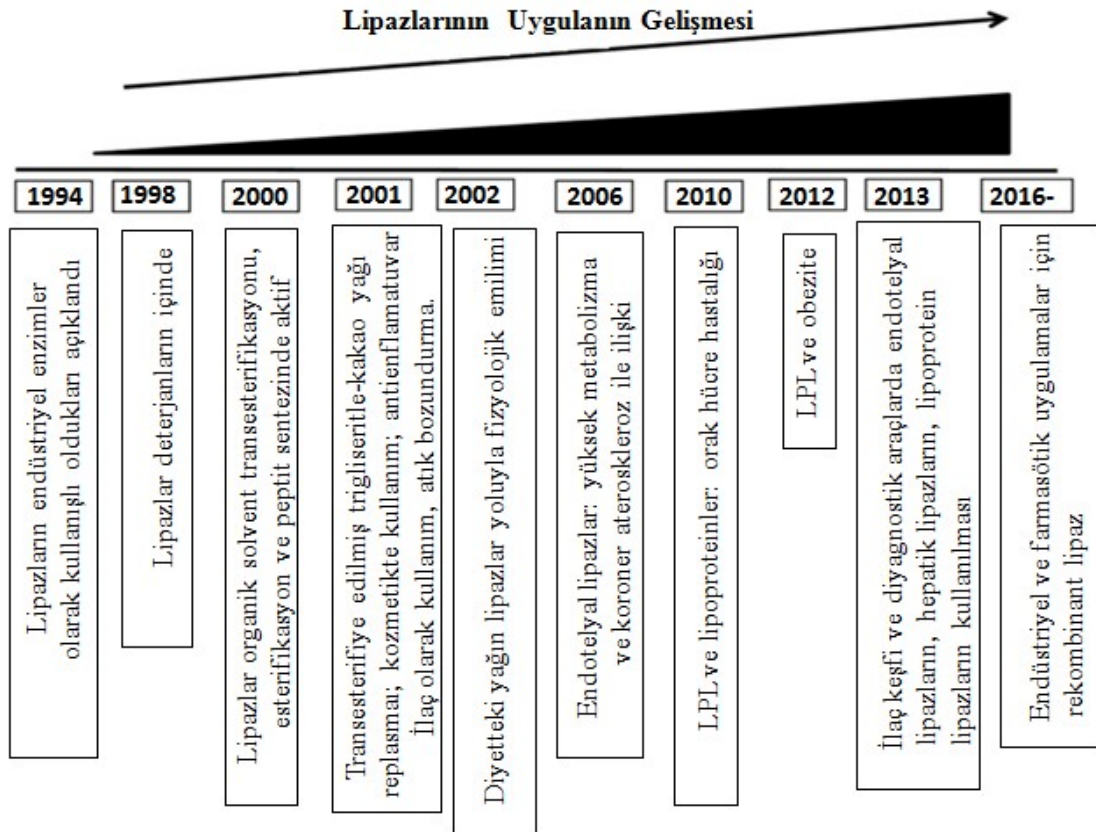
Gıda ve İçecek Endüstrisi 2017'de 1,4 milyar ABD dolarına eşdeğer olarak %26'lık bir payla endüstriyel enzimler için en yüksek pazar olup, bunu sırasıyla %18 (969,3 milyon

ABD Doları) ve %14 (%754,4 milyon ABD Doları) ile Biyo-Yakıtlar ve Deterjanlar izlemektedir (Anonim 2018).

Endüstriyel anlamda kullanılan enzimlerin %80'ini polimerlerin doğal yapısını bozabilen hidrolazlar oluşturmaktadır (Kasavi 2006). Endüstriyel enzimler pazarı karbohidrazlar, amilazlar, selülozlar, proteazlar, lipazlar, fitazlar ve diğerleri şeklinde sınıflandırılır. Karbonhidratlar en büyük pazar payına sahiptir, arkasından proteaz, selüloz ve lipaz gelmektedir (şekil 2.12). Lipazlar, yüksek büyüme potansiyeline sahip küresel endüstriyel enzimler pazarındaki önemli bir yere sahiptirler.1994'ten itibaren lipazlar endüstriyel uygulama alanına girmiş ve günümüze kadar değişik alanlarda farklı amaçlarla kullanılmaktadır (şekil 2.13). Lipazlar, farklı alanda uygulanır: deterjanlarda ve temizlik sektöründe, kimyasalların sentezinde, eczacılıkta, gıda sektöründe, küspe, kağıt ve enerji endüstrisinde, biyoremediasyon ve çevresel süreçlerde kullanım alanları mevcuttur (Casas-Godoy ve ark. 2012). Lipazlar, dünya enzim talebinin %5'ini teşkil etmekte ve pazarın 2017 yılında 345 milyon ABD dolarına ulaşmıştır (Zimmerman ve ark. 2014). Lipazın küresel pazar büyüklüğünün 2020 yılına kadar 590,5 milyon ABD dolarına ve 2015 ile 2020 arasında %6,5 CAGR'a ulaşacağı tahmin ediliyor (Hubert 2017). Future Market Insights'a göre ise küresel lipaz pazarının 2026'nın sonunda 1 milyar ABD dolarını aşması beklenmektedir (Anonim 2018). Lipaz enzimi endüstriyel boyutta en çok Kuzey Amerika, Avrupa, Asya Pasifik, ve dünyanın geri kalanında (Rest of the World, RoW) üretilmektedir. Küresel lipaz pazarında faaliyet gösteren şirketler arasında Novozymes A/S (Danimarka), Koninklijke DSM N.V. (Hollanda), Chr. Hansen Holdings A/S (Danimarka), Amano Enzymes Inc. (Çin), Associated British Foods PLC (İngiltere), E. I. Du Pont De Nemours and Company (ABD), Advanced Enzymes (Hindistan), Clerici-Sacco Group, Renco (Yeni Zelanda) ve Enzyme Development Corporation (ABD) yer almaktadır (Anonim 2018).



Şekil 2.12. Endüstriyel pazardaki enzim tipleri (Anonim, 2019)



Şekil 2.13 Zaman dilimleri içinde lipazların endüstride uygulanmaları (Jawed ve ark. 2019).

2.5.1. Deterjanlar

Lipazlar, proteazlar ve amilazlar ile birleşim halinde, deterjanların etkinliğini arttırmak için formülasyonlarda kullanılmıştır. Deterjan endüstrilerinde lipazların uygulanması hızla artmaktadır. Lipazlar, deterjanların formülasyonunda çok önemli bir fonksiyonel bileşik oluşturur ve üretilen toplam lipazların yaklaşık %32'si deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır (Barros ve ark. 2010). Lipaz kumaş yüzeyine adsorbe olur ve su ilavesi üzerine kimyasal bağların parçalanmasını katalize ederek oturmuş bir kumaş lipaz kompleksi oluşturulmaktadır (Hasan ve ark. 2006). Lipazların termofilik, alkalofilik, suda çözünür, düşük substrat spesifikliğı, deterjan proteazlarına toleranslı ve diğer yüzey aktif cisimlerinin, sıvıların yanı sıra yıkama tozlarında da kullanılabileceğı belirtilmiştir (Chauhan ve ark. 2013). Son zamanlarda, pasifik beyaz karides hepatit pankreasından izole edilen bir lipaz hem katı hem de sıvı çamaşır deterjanlarına karşı önemli bir uyumluluk ve stabilite göstermiştir (Kuepethkaew ve ark. 2017). Ayrıca, lipazlardan bazılarının geniş bir pH aralığında (7.0-12.0) aktif olduğu ve 9.0 pH'da en yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Ji ve ark. 2015). Deterjan endüstrisinde kullanılan yaygın lipaz kaynakların bazıları *Staphylococcus arlettae*, *Burkholderia cepacia*, *P. fluorescens* ve *Candida* türlerini içermektedir (Phuah ve ark. 2015, Su ve ark. 2015, Ahmed ve ark. 2010).

Genel olarak, ticari deterjanlardaki şelatlama ajanları enzimin etkisizleşmesine neden olur, ancak *B. licheniformis*'den lipazı varlığında enzim-deterjan kompleksine kalsiyum klorür ilavesi, aktivitenin geri kazanılmasına yardımcı olmuştur (Romdhane ve ark. 2010). Benzer şekilde, anyonik yüzey aktif maddeler üzerine yapılan son araştırmalardan bir tanesinde, lipazın stabilitesini ve aktivitesini, iki etilen oksit ünitesi ile sodyum loril eter sülfat varlığında korunduğı kaydedilmiştir (Magalhaes ve ark. 2016). Son zamanlarda *T. thermophilus*'un, *P. aeruginosa*'nın ve birçok yeni lipazların deterjan endüstrisindeki potansiyelleri ortaya çıkarılmıştır (Kanjanas ve ark. 2010, Grbavcic ve ark. 2011). Aynı zamanda, bir yünlü kumaş üzerine immobilize olan *P. fluoresces*'in lipazi, mükemmel yağ lekeli çıkarma kabiliyeti sergilemiştir (An ve ark. 2014). Lipaz katkılı deterjanlar artık piyasada yer edinmiş ve bu konuda ilgili firmalar geniş çaplı araştırmalar yapmaktadır (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.10. Lipaz içeren ticari deterjanlar (Schmid ve Verger 1998)

Lipazlar	Lipaz kaynağı	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Firma
Lipolase	<i>Humicola lanuginosa</i> kaynaklı, <i>Asprgillus oryzae</i> 'de eksprese edilmiş	10	40	Novo-Nordisk (Denmark)
Lipomax	<i>Pseudomona spseudoalcalgens</i> 'te yeniden klonlanıp aynı organizmada eksprese edilmiş	11	45	Genencor (USA)
Lumafast	<i>Bacillus</i> sp.'de eksprese edilmiş	10.5	40	Advanced Biochemical (İndia)

2.5.2. Biyodizel

Gelecek vaat eden bir alternatif yakıt formu olan biyodizel, çeşitli yağların alkol ile transesterleştirilmesiyle elde edilmektedir. Enzimatik transesterifikasyon, yan ürün gliserolün saflaştırılmış formda kolay geri kazanılması asgari atık üretimi, daha az enerji tüketimi, vb. durumlarda kimyasal işlemlere göre birçok avantaja sahiptir (Lukovic ve ark. 2011). Kaynaklarda, çeşitli atık ve atık olmayan yağları kullanılarak lipaz katalizli biyodizel sentezi üzerine birçok çalışma bildirilmiştir (Ahmia ve ark. 2014). Yenilebilir olmayan bir yağ olan hintyağı yağının transesterifikasyonunu katalize etmek için *Burkholderia cepacia*'dan lipaz dâhil olmak üzere biyodizel üretimi için çeşitli lipazlar rapor edilmiştir (Baron ve ark.2014). Aguieiras ve ark. (2015) mantar lipazları kullanarak biyodizel üretimini gerçekleştirmişlerdir. *A. oryzae*'de ifade edilen *Fusarium heterosporum* kaynaklı lipazlar, biyodizel sentezi için kullanılmıştır (Amoah ve ark. 2016). Bazı endüstriyel atık yağlar kullanılarak biyodizel üretimin 3 kat arttığı ifade edilmiştir. Örneğin, *Geotrichum* sp. lipazı kullanılarak atık yemeklik yağdan ve *P. fluorescens* lipaz kullanılarak atık ayçiçek yağından biyodizel üretimleri gerçekleştirilmiştir (Yan ve ark. 2011).

2.5.3. Gıda endüstrisi

Lipazlar, yağların ve yağların seçici hidroliziyle yağ asitlerini gıda ürünlerine serbest bırakmak için gıda endüstrisinde katalizör olarak başarıyla kullanılmaktadır (Barros ve ark. 2010). Lipazların özgülüğü ve seçicilik özellikleri, birçok gıda ve unlu mamülün sentezini kolaylaştırmaktadır. Lipazlar ayrıca meyve suları, pişmiş gıdalar ve sebze

fermantasyonu, süt zenginleştirmesi gibi çeşitli ürünlerin üretiminde endüstriyel olarak kullanılır (Ray 2012, Gerits ve ark. 2014). Karmaşık biyomalzemelerin modifikasyonu ve parçalanması, et ve balık ürünlerinden yağ giderilmesi, mayonez üretiminde ve bitkisel yağların rafine edilmesinde yağ gideriminde kullanılırlar (Sharma ve Kanwar 2014). Lipazların gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanılan L-askorbik asit yağ asidi esterlerini, düşük kalorili gibi yapısal lipidlerin, diyetetik triaçilgliserollerin ve tokoferoller (E vitamini)'in sentezini katalize ettiği bilinmektedir (Dias ve ark. 2013) Bu enzimler ekmek yapımında denatüre olurken ekmeğin ve diğer unlu mamullerin dokusunun ve estetik çekiciliğinin iyileştirilmesine yardımcı olur. *B. subtilis*'in lipazı, ekmek yapımında büyük rol oynamaktadır (Sangeetha ve ark. 2011, Ray 2012). Lipazların fırıncılık alanındaki diğer uygulama özellikleri unlu mamullerin raf ömrünün uzamasında, dokusunda, yumuşaklığında ve hacim artışında önemli rolleri bulunmaktadır (Moayedallaie ve ark. 2010).

2.5.4. Süt ve Aroma Endüstrisi

Lipazlar, süt endüstrisinde, süt yağının hidrolizinde, şarapların sentezinde, unlu mamullerin, emülgatörlerin, takviyelerin ve süt ürünlerinin sentezinin katalizlenmesinde önemli bir rol oynadığından kapsamlı uygulamalara sahiptir (Sae-leaw ve ark. 2018, Salihu ve Alam 2012). Lipazlar, süt ürünlerinde yoğunluğunu ve aromasını arttırmak için lipolizlenmiş katı süt yağı (lipolysed milkfats (LMFs)) üretimi yaygın olarak kullanılmaktadır (Tambe ve ark. 2015, Jooyandeh ve ark. 2009). Lipazlar, peynir üretiminde tipik aromalar için kullanılır, burada lipaz, yağ asidi serbestliğini artırarak lezzet gelişimini hızlandırır (Choudhury ve Bhunia 2015). Özellikle lipazlar, büyük oranda kaşar türü peynirler olan çedar, provolon ve ras gibi birçok peynir türünün olgunlaşma ve lezzet gelişimini hızlandırmak için kullanılır (Ray 2012). Peynirin aroması yüksek sıcaklıkta lipaz kataliziyle oluşmaktadır, lipaz ayrıca dip, sos, çorba ve atıştırmalık gibi diğer ürünlerin üretiminde de yardımcı olur (Aravindan ve ark. 2007). Lipaz, interesterifikasyon ile palm yağından kakao yağına eşdeğer yağ üretiminde kullanılır, bu yağ çikolata üretiminde önemli rol oynar (Zarringhalami ve ark. 2012). Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalarda *C. rugosa* lipazlarının etil kaprilat gibi aroma bileşiklerinin sentezi ve dondurma üretiminde kullanıldığı bildirilmektedir (Patel ve ark. 2015, Sharma ve Kanwar 2014).

2.5.5. Atık su arıtımı

Lipazlar, atık suyun arıtılmasında hem aerobik hem de anaerobik yöntemlerle yaygın olarak kullanılmaktadır. *C. rugosa*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* lipazları kullanarak çok kirli yağlar kolayca parçalanabilir (Choudhury ve Bhunia 2015). Lipazlar endüstriyel atık suların özellikle gıda atığının (Meng ve ark. (2015), süt atığının (Adulkar ve Rathod 2015), yünden gres yağının (Saravanan ve ark. 2014), gübrenin (Rodrigues ve ark. 2014) ve petrol fabrikalarındaki atık suların arıtılmasında (Kanmani ve ark. 2015) yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipaz üreten bakterilerin atık sulara inokülasyonu ile gıda işleme, tabakhane, otomobil endüstrileri, restoran ve fast food'dan kaynaklanan atık suların arıtılmasına da yardımcı olmaktadır (Nelson ve Rawson, 2010). Bazı atık sular, arıtılmış su olarak son derece arıtılabilir ve yeniden kullanılabilir. Prasad ve Manjunath (2011) *Bacillus subtilis*, *Serratia marsescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakteri lipazı ve Basheer ve ark. (2016) marine *Aspergillus awamori* lipazı kullanarak ağır lipit içeren olan atıkların temizlenmesinde kullanıldığını ifade etmişlerdir.

2.5.6. Sıvı ve katı yağlar

Lipazlar kullanılarak yağ ve yağ modifikasyonu ile gıda ürünlerinin elde edilmesi gıda işleme endüstrisinde önemli uygulama alanlarından biridir. Lipazlar ayçiçek yağı, hindistancevizi, zeytin, omega 6 yağ asitleri bakımından zengin olan mısır ve pirinç kepeği yağı, omega 3 yağ asitleri bakımından zengin keten tohumu yağı, ceviz gibi bitkisel yağların lipit özelliklerini değiştirmek için kullanılır. Bunlar esansiyel yağ asidi seviyelerini izin verilen sınırlar içinde tutarak, bireyin sağlığında önemli bir rol oynarlar (Sangeetha ve ark. 2011). Lipazlar, esterifikasyon ve interesterifikasyon reaksiyonları yoluyla yapısal lipitler (SL)'nin sentezinde önemli olduğunu bilinmektedir (Kim ve Akoh 2015). Lipazlar, mayonez ve diğer emülgatörlerin üretimi için yumurta sarısı muamelesinde endüstriyel olarak, lesitin modifikasyonunda ve bitkisel yağların rafine edilmesinde yağ alma aşaması için kullanılır (Ray 2012).

2.5.7. Kozmetik ve parfümeri

Lipazlar kozmetik ve parfüm endüstrisinde çok sayıda yüzey aktif madde ve aroma bileşiği üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. MAG'lere ve diasilgliserollere dayanan çeşitli yüzey aktif cisimleri, lipaz katalizli transesterifikasyon ve rasemik ara maddelerin çözünürlüğü ile üretilir. Bundan başka, balmumu, sinamik asit, ellagik asit, ferulik asit esterleri, aroma/koku bileşikleri, farmasötik öncüleri ve kozmetik ve güneş kremlerinde katkı maddeleri olarak kullanılabilen lipaz katalizli esterleştirme yoluyla sentezlenir (Sharma ve Kanwar 2014, Ganguly ve Nandi 2015). Ayrıca, lipazlar, topikal kremlerdeki primer bileşenlerdir veya yağların alınmasıyla kilo vermeye yardımcı olan oral yoldan verilen ilaçlardır (Sonne ve ark 2015). Güzellik endüstrisinde yer alan patentli lipazla katalize edilmiş işlemlerin bir örneği, ağız yıkamalarında ve tıraş kremlerinde nane aroması sağlayan mentol esterleri üretmek için *P. fluorescens* ve *P. cepacia* lipazların kullanılması rapor edilmiştir (Chaplin ve ark. 2006).

2.5.8. Deri Endüstrisi

Deri işleme işlemleri üç gruba ayrılır: derilerin temizlendiği yerde ön tabaklama, bunları stabilize etmek için tabaklama ve son tabaklama sonrasıdır (Thanikaivelan ve ark. 2004). Lipazlar, uygulamalarını pahalı ve tehlikeli solventlerden ziyade enzimlerle yapılabilecek ıslatma, banyo ve yağ alma aşamalarında kullanılırlar (Choudhary ve ark. 2004). *R. nodosus* lipaz katalizli yağdan arındırma işleminden sonra yünlü koyun derilerinden elde edilen süet giyim derileri, geleneksel çözücü muamelesiyle elde edilenlere kıyasla daha iyi kalite göstermiştir. Genel olarak, daha iyi deri işlemesi için lipazlar, proteazlar gibi diğer hidrolitik enzimlerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Thanikaivelan ve ark. 2007).

2.5.9. Tarımsal Kimyasallar (agrokimyasallar)

Birçok güçlü agrokimyasallar (pestisit veya gübre gibi tarımda kullanılan bir kimyasallar), lipazlar gibi enzimlerden yararlanılarak enzimatik olarak sentezlenmiştir (Barbosa ve ark. 2011). Örneğin, *Pseudomonas*'tan lipaz katalizli transesterifikasyon

yoluyla böcek öldürücülerin (insektisit) ve mantar öldürücülerin (fungistisit) üretimi için çalışmalar yürütülmüştür. Özellikle yabancı ot ve yabancı otlara karşı kullanılan herbisitlerden (*S*)-indanofan'ın başarılı olduğu kanıtlanmıştır (Sangeetha ve ark. 2011) Ayrıca, optik olarak aktif pestisit formları lipaz kullanılarak sentezlenmiştir. *B. subtilis* kaynaklı lipazlar, rasemik alkol veya karboksilik ester karışımları için çözünürlüğü rapor edilmiştir (Bhushan ve ark. 2011).

2.5.10. Biyoremediasyon

Biyoremediasyon, petrol sızıntılarının oluşturduğu kirliliklerin, endüstriyel atıkların, yağlarla kirlenmiş atık suların arıtılmasında mikroorganizmaların kullanıldığı işlemdir. Lipaz katalizli biyoremediasyon yağ işleme fabrikaların ve restoran atıklarının etkin bir şekilde arıtılması uygulanabilir (Verma ve ark. 2012). *Staphylococcus pasteurii* COM-4A, *B. subtilis* COM-B6, *Arthrobacter* sp. ve bunu gibi lipaz üreten mikroorganizmaların kirleticilere karşı etkili bir şekilde kullanıldığı rapor edilmiştir. Kısmen saflaştırılmış ve immobilize edilen bir formda *Staphylococcus pasteurii* COM-4A'dan lipazın, sterilize edilmemiş hindistancevizi yağı atık sularının hidrolizi için başarıyla uygulandığını bildirilmiştir (Selvam ve Vishnupriya 2013, Kanmani ve ark. 2015)

2.5.11. Medikal ve İlaç Endüstrisi

Enzimler, genel olarak, tıbbi ihtiyaç ve hizmetleri ile ilgili çok sayıda ürünün üretiminde önemli bir rol oynar. Lipaz, yağ metabolizması için birincil enzimdir ve eksikliği, sağlık olarak tehdit oluşturur ve bu nedenle farmasötik endüstrilerin işlemlerinde lipazlar kullanılmaktadır. Mikrobiyal lipazlar, rasemik esterlerin hidrolizi için kullanılmaktadır. Aynı zamanda kiral bileşiklerin üretimi için optik olarak saf enantiyomerler üretecek şekilde transesterifikasyon ve rasemizasyon kullanılmıştır. Örneğin, steroidal olmayan anti-enflamatuar bir ilacı önemli grubu olan profens (2- aril propiyonik asitler), *C. antarctica* ve *C. rugosa* kaynaklı lipaz ile katalizlenen esterifikasyon enantioselektif tarafından sentezlenir (Sikora ve ark. 2014).

Lipaz katalizli aminoliz, tıbbi ve farmasötik uygulamalara çeşitli ana kiral saf ürünleri direkt sentezinde çok faydalı bulunmaktadır. Ayrıca lipaz, akut pankreatit teşhis etmesi, pankreas yaralanması ve kan serumundaki aktivitesini veya seviyesini belirleyerek kalp rahatsızlıklarının teşhisi etmesini gibi koşulları görev yapmaktadır (Hofmeyr ve ark. 2014). Bakteriyel lipazları, kistik fibroz ve pankreatit tedavisinde kullanılan pankreas lipazları yerini alabilir ve tümör nekroz faktörü için aktivatör olarak görev yapabilir ve bu nedenle malign tümörlerin tedavisinde kullanılabilir (Ye ve ark. 2011). Son araştırmalar, Angina pectoris (göğüs ağrısı), hipertansiyon ve diğer vasküler bozuklukların, bir kalsiyum blokeri olan diltiazem ile etkili bir şekilde tedavi edilebileceğini bildirmiştir. Diltiazem üretimi, saf (-) trans-metoksilfenilgidik asit metil ester (MPGM) gerektirir ve MPGM'nin biyo-çözünürlüğü, *Serratia marescens*'ten lipaz ile verimli bir şekilde katalizlendiği rapor edilmiştir (Ganguly ve Nandi 2015). Son zamanlarda, monogliserit lipazın terapötik potansiyeli, kanser, nörodejeneratif ve enflamatuvar hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi rahatsızlık için ümit verici bir ilaç hedefi olduğu kabul edilmiştir (Loli ve ark. 2015, Grabner ve ark. 2017).

2.6. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Bacillaceae familyası içerisinde *Bacillus* ve *Clostridium* olmak üzere iki ana alt grup yer almaktadır (Garrity 2004). Carl Woese tarafından 16 ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla sınıflandırmaya alınan *Bacillus* cinsi *Eubakteri* (gerçek bakteriler) domanini içerisine dahil edilmiştir (Woese ve Wolfe 1985, Woese 1999). *Bacillus* cinsi, 34 tür ve çok sayıda alt türden oluşan çok büyük bir gruptur. *Bacillus* cinsinin metabolizmaları da oldukça farklı türler bulunur.

Bacillus bakterileri çoğu basil saprofitir ve genel özellikleri Gram (+), spor oluşturabilen, çubuk şeklinde, aerob bazıları fakültatif anaerob gelişen, katalaz pozitif mikroorganizmalardır (Claus ve Berkeley 1986). Vejetatif hücreler 0,5x1,2 µm ile 2,5x10 µm çapındadır (Lennete ve ark. 1985). Tek ya da gruplar halinde gelişebilirler. Çift veya zincir şeklinde koloniler oluştururlar. Genellikle beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklere pigmentli kolonilere de rastlanır (Buchanan ve Gibbons 1974).

Bacillus 'ların habitatları toprak olmasına rağmen doğada hemen hemen her yerde hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamda bulunabilirler. Bu cins bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi özellikleri ve kolay üretilebilmeleri nedeni ile bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardır (Ediz ve Beyatlı 2005). Çöl kumları, kaynarcalar ve kutup toprakları gibi ekstrem özelliklere sahip ortamlarda yaşamalarına izin veren birçok fizyolojik özelliğe sahiptirler. *Bacillus* türleri termofilik, psikrofil, asidofilik, alkalifilik, halotoleranslı/halofilik özellikleri gösterilmektedir. Sadece birkaç organizmanın hayatta kalabileceği sıcaklık, pH değerleri ve tuz konsantrasyonlarında gelişebilme özellikleri gösterirler. Bu yüzden basiller medikal kullanımlarının yanında, ısı sterilizasyonu teknikleri ve kimyasal dezenfektanların test edilmesinde kullanılırlar. Bu özellikleriyle aynı zamanda önemli enzimleri sentezleme becerisi nedeniyle deterjan üretim endüstrisinde de kullanıları gözlenmektedir.

Bacillus türleri, farklı karbon kaynakları kullanarak, yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlılığı yüksek ürünler üretebilmektedirler. *Bacillus* 'ların üremeleri için gereken maksimum sıcaklık 25 ile 75°C arasında değişim göstermekte, minimum sıcaklık -5'den 45°C'a kadar değişmektedir. pH aralığı ise 7.5 ile 8.0'den pH 2.0 düzeyine kadar değişiklik göstermektedir (Kalender 1999).

Bacillus türlerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, hızlı büyümesi nedeni ile kısa fermentasyon süresine sahiptirler. Sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı biyoteknolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle ürettikleri antibiyotik, enzim, toksin gibi önemli metabolik özelliklerinden dolayı endüstriyel alanlarda büyük çapta öneme sahiptir ve dikkatleri üzerine çeken mikroorganizmalardır (Rosovitz ve ark. 1998).

2.6.1. *Bacillus* Lipazının Genel Özellikleri

Bugüne kadar *Bacillus* cinsinden 70'ten fazla lipaz elde edilmiştir, ancak sadece birkaçının temel biyokimyasal özellikler bildirilmiştir (Guncheva ve Zhiryakova 2011).

Çizelge 2.8. *Bacillus* lipazlarının biyokimyasal özellikleri verilmiştir.

Genel olarak, *Bacillus* lipazları kolayca üretilir ve organik çözücülere karşı yüksek tolerans gösterir ve bunların gıda endüstrisi, kozmetik ve biyodizel üretimi için esterlerin sentezinde kullanıldıkları rapor edilmiştir. *Bacillus* lipazları, asidin zincir

uzunluğuna farklı seçicilik gösterir ve birkaç enzim duruma göre özgülük göstermektedir. *Bacillus* lipazları esas olarak batık kültür (submerged culture) fermantasyonu ile üretilmiştir. Lipaz salgılanması hücre büyümesiyle ilişkilidir ve geç üssel fazda maksimum lipaz üretim hızı saptanmıştır (Cazaban ve ark. 2017, Diaz ve ark. 2017). Genellikle, durağan faz sırasında muhtemelen enzimin termal kararsızlığı ve proteazların kültür ortamında bulunması nedeniyle lipaz aktivitesinde bir azalma gözlenir (Strzelczyk ve ark. 2016). Ancak *Bacillus sp.* DH4 ve H1, *B. licheniformis*'in fermantasyonun durağan fazında yüksek düzeyde lipaz üretimi tespit edilmiştir (Vaquero ve ark. 2016).

Bacillus hücreleri karbon, azot ve fosfor kaynakları ve mineral tuzları içeren bir besin ortamında üretilmektedir. Doğal yağlar (zeytin, pamuk tohumu, hardal, susam, soya fasulyesi, balık, pirinç kepeği, mısır yağı), trigliseritler (triolein, tribütirin) veya serbest yağ asitleri (oleik asit) gibi lipitler karbon kaynağı olarak kullanılır ya da poli- ve oligosakaritler (nişasta, maltoz, mannoz, glukoz, ksiloz) veya polioller (gliserol veya mannitol) ile kombinasyon halinde halindedir. *Bacillus halodurans* LBB2 hücreleri, karbon kaynağı olarak metanol kullanılarak üretilmiştir (Kartal 2016) Maya ekstresi, pepton, casamino asit veya tripton yaygın olarak kullanılan organik azot kaynaklarıdır (Rivera ve ark. 2017).

Genellikle besiortamına amonyum nitrat, sodyum nitrat, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür veya amonyum fosfatlar gibi inorganik azot tuzları eklenir (Clementz ve ark. 2016). Lipazların üretimi çoğunlukla indükleyiciye bağlıdır ve çoğu durumda yağlar iyi indükleyiciler olarak işlev görür (Cazaban ve ark. 2017). Safra tuzları, SDS, Tween 80, Triton X-100 gibi bazı diğer bileşiklerin *Bacillus sp.* lipazlarının salgılanmasını uyardığı bildirilmiştir (Hanamura ve ark. 2016). *Bacillus* cinsi, özellikle alkalın pH'da aktif olan lipaz üretmektedir. *Bacillus* lipazlarının çoğu nötr ortamda, orta derecede alkali ortamlarda kararludur (pH 7.5-9.0), bir kısmı ise daha yüksek pH'da optimum düzeyde kararludur (Zin ve ark. 2017). Bazı *Bacillus* lipazları asidik pH aralığında (pH <6.0) optimum pH'a sahiptir. Bazı *Bacillus sp.* suşları pH = 5.5–7.2'de maksimum aktivite gösterir (Salaberrıa ve ark. 2017) Deri endüstrisinde, deri işleminde kullanılan kimyasalların cilde erişimini engelleyen yağların giderilmesi için asidik pH optimum değerine sahip lipazlar gerekir. Lipazlar bu uygulamada pahalı ve toksik organik çözücülerin ve yüzey aktif maddelerin yerini alabilir. Genel olarak,

Bacillus lipazları pH 7.0-9.0'da kararlıdır. *Bacillus* lipazlarının çoğunluğu termostabildir ve sıcaklıkları 45-50°C civarındadır. Bazı *Bacillus* sp. suşlarının 60-70°C'de maksimum aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Vaquero ve ark. 2016). Termostabil lipazlar, esasen trigliserit ve balmumlarından oluşan ziftin çıkarılması için kâğıt ve kağıt hamuru işleminde uygulanır. Lipaz aktivitesinin iki değerli katyonlarla aktivasyonu çeşitli *Bacillus* türleri için rapor edilmiştir. *Bacillus* lipazlarının çoğunun üretimi kalsiyum iyonlarının varlığında artmıştır (Niyonzima ve More 2014). Çoğu *Bacillus* lipazının moleküler ağırlığının 20-112 kDa aralığında olduğu rapor edilmiştir (Sugihara ve ark. 1991).

Çizelge 2.11. *Bacillus* lipazlarının biyokimyasal özellikleri (Sarmah ve ark. 2018)

Lipaz orijin	Moleküler Ağırlığı (kDa)	Optimum pH	Optimum Sıcaklığı	Metal İyonlar	Kaynakça
<i>Bacillus alcalophilus</i> BM-20	-	10.0-11.0	60 °C	Ca ²⁺	Zin ve ark (2017)
<i>Bacillus atrophaeus</i> SB-2	-	7.0	50°C	-	Miettinen ve ark. (2013)
<i>Bacillus cereus</i> C7		8.0	60°C	Ca ²⁺ , Zn ²⁺ Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Mg ²⁺	Clementz ve ark. (2016)
<i>Bacillus cereus</i> C71	42	9	33°C	Na ⁺ ; Ca ²⁺ ; Mg ²⁺ K ⁺ Ni ²⁺ Co ²⁺ ; Mn ²⁺	Peng (2013)
<i>Bacillus coagulans</i>	31	8.5	55°C	Hg ²⁺ ; K ⁺ ; Mg ²⁺ ; Fe ³⁺ ; Na ⁺	Ribeiro ve ark. (2011)
<i>Bacillus coagulans</i> MTCC-6375	103	8.5	45°C	Hg ²⁺ ; Al ³⁺ ; Fe ³⁺ ; Mg ²⁺ ; Ca ²⁺ ; K ⁺ ; Co ²⁺ ; Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O ;	Kaur ve ark. (2016)
<i>Bacillus</i> sp. A30-1	65	9.5	60°C	5 U/ml subtilisin (bakteriye ait)	Gupta ve ark. (2015)
<i>Bacillus</i> sp. GK 8	108	8.0	45-50°C	Aktif: 10 mM Mg ²⁺ ; Ba ²⁺ ; Na ⁺ (NaCl; Na ₂ CO ₃) Etkisiz: 10 mM K ⁺ ; Li ⁺ ; Ca ²⁺ İnhibitör: 10 mM Hg ²⁺ ; Co ²⁺ ; Zn ²⁺ ; Ni ²⁺	de Miranda ve ark. (2015)

Çizelge 2.12. *Bacillus* lipazlarının biyokimyasal özellikleri (Devam)

<i>Bacillus sp.</i> H1	19.4	7.2	70°C	1 mM Ba ²⁺ ; Co ²⁺ ; Ca ²⁺ ; Na ⁺ ; K ⁺ ; Ni(NO ₃) ₂ Mg ²⁺ ; Al(NO ₃) ₃ ; FeSO ₄ ; Hg ²⁺	Vaquero ve ark. (2016)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	19	10	35°C	10 mM Ca ²⁺ ; Cu ²⁺ ; Mn ²⁺ ; Zn ²⁺	Fickers ve ark. (2011)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada doğal kaynaklarımız olan toprak örneklerinden (50 farklı şehir ve bazı şehirlerin farklı bölgelerinden birden fazla toprak örneği alınmıştır) izole edilmiş ve Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvar *Bacillus* kültür koleksiyonunda bulunan toplam 341 adet *Bacillus* sp. suşları lipaz enzimi üretim kapasitelerinin taranması için kullanılmıştır. En iyi lipaz üretimine sahip 1 adet *Bacillus* sp. seçilmiş ve çalışmalara bu suş ile devam edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Lipaz pozitif bakterilerin kalitatif taranması

Lipaz üreten bakterilerin taranması için ortam içeriğinde litrede: pepton 5g; meat ekstrakt 3g; tribütirin 10 mL ve agar 20g bulunan (pH 7.0) TBA (Tribütirin Agar) katı besiyeri kullanılmıştır (Kumar, 2012). *Bacillus* sp. suşları önce Nutrient Brothlu (NB) ortamda canlandırılmış ve steril petri kaplarındaki TBA ortamına ekilerek 37 °C'de 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda petri kapında etrafında açık renkli zon oluşturan koloniler lipaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Hidrolitik zonların genişliği cetvel ile ölçülmüştür (mm). Aşağıdaki formül kullanılarak enzimatik indeks (EI) hesaplanmıştır (Florencio ve ark.2012). EI 0,07'den yukarı gösteren suşlar potansiyel enzim üreticileri olarak alınmıştır.

$$E.I = \frac{\text{Hidroliz zonunun çapı}}{\text{Koloninin çapı}}$$

Bu çalışmada hidrolitik zon çapı en geniş olan suş seçilmiş ve saf kültür olarak nütrient agarlı ortamda kültüre edilerek, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca lipaz hidrolitik zon varlığı fenol kırmızısı varlığında da gösterilmiştir. Bu amaçla, içeriğinde litrede; yeast ekstrakt 3g; meat ekstrakt 2,5g; CaCl₂ 1g; tribütirin 10 mL; agar 30g ve fenol kırmızı 0,1g (Abdel-Fattah ve ark. 2008) bulunan katı besi yerine steril koşullarda 7 mm çapında kuyucuklar açılmış ve tarama sonucunda elde edilen en iyi zona sahip suşun lipaz ürettiği besi ortamından 100 µl

kuyucuklara konulmuştur. Petri kapları 37 °C’de 48 saatlik inkübasyon sonucunda hidrolitik zon varlığı gösterilmiştir.

3.2.2. 16S rRNA analizi (Filogenetik analiz)

En yüksek lipaz aktivitesine sahip *Bacillus* sp. suşunun hizmet alımı ile 16S rRNA analizi yapılmış (Ref Gen, Ankara) ve bakteri tür düzeyinde adlandırılmıştır. Genomik DNA T4 suşu kullanılarak FastDNA kiti (Qbiogene, Montreal, PQ, Canada) ile ekstrakte edilmiştir. 16S rRNA geni genomik DNA’dan 27F (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) ve 1492R (5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’) primerleri kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) cihazı ile amplifiye edilmiştir. ABI 3100 Genetic Anaylzer kullanılarak sekanslar yürütülmüştür. Amplifiye edilen 1,449 bp sekansı otomatik olarak ABI PRISM 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) ile tespit edilmiştir. Sonuçlanan sekanslar BLAST kullanılarak GenBank databazı (NCBI) ile karşılaştırılmıştır (Altschul ve ark. 1990). Sekanslar CLUSTAL W programı ile alignment yapılmıştır (Thompson ve ark. 1994). Neighbour joining yöntemi ile *Bacilluslar* arasındaki akrabalık ilişkileri MEGA versiyon 6.0 ile belirlenerek filogenetik ağaç çizilmiştir (Tamura ve ark. 2007).

3.2.3. Enzim üretim ortamının belirlenmesi

Enzim üretim ortamını belirlemek üzere Çizelgede 3.1’de verilen 3 farklı içerikli besi ortamı kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Lipaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besi yerleri

İçerik (%g)	Besi Ortamı 1 (Dahiya ve Purkayastha 2011)	Besi Ortamı 2 (Hasan ve ark.2006)	Besi Ortamı 3 (Kumar ve ark. 2005)
Pepton	0,5	-	0,5
Yeast Ekstrakt	0,1	-	0,5
NaCl	0,5	0,05	0,05
Glukoz	0,5	0,4	-
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	-	0,7	-
NH ₄ Cl	-	0,1	-

Çizelge 3.2. Lipaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besi yerleri (Devam)

K ₂ HPO ₄	-	0,3	-
MgSO ₄	-	0,025	-
CaCl ₂	-	0,002	0,005
Zeytinyağı	1	1	1
Ph	7.0	7.0	7.0

3.2.4. Bakteri üretim koşulları

Kültür saklama ortamı olan Nutrient agarlı ortamdan steril öze ile alınan bakteri kültürü, içerisinde 30 mL NB bulunan 100 mL’lik erlene aşılanmış, 37°C’ de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat süre ile üretilmiştir. Bakterinin enzim üretim kapasitesini saptamak amacıyla 18 saatlik bakteri kültürlerinin 600 nm’deki optik yoğunlukları (O.D) spektrofotometre (Beckman Coulter- DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3’e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür çözeltisinden içerisinde 150 mL enzim üretim besi yeri bulunan 500 mL’lik erlenlere %5 oranında aşılanmış ve 37°C’ de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 72 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

3.2.5. Bakteri üremesinin ve enzim aktivitesinin ölçülmesi

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besi yerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 3.2.4’de belirtildiği şekilde inkübasyona bırakılan besi yerlerinden belirlenen saatlerde örnek alınarak 600 nm dalga boyunda okunmuştur. Lipaz üretiminde kullanılan besi yeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir (Sarıkaya 1995). Elde edilen OD değişimleri zamana karşı grafiklenerek bakteri üreme eğrisi çıkarılmıştır.

Lipaz enzim aktivitesinin tayini için titrimetrik analiz metodu kullanılmıştır. Serbest enzimin aktivitesi Sugihara ve ark. (1991)'nın yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle belirlenen saatlerde kültür ortamından 10 mL örnek alınarak 15 dakika +4 °C' de santrifüj edilmiş (5000 devir/dk) ve bakteri hücrelerinin bulunduğu alttaki pelet kısmı ile enzim içeren üstteki sıvı kısım (süpernatant) birbirinden ayrılmıştır. Süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Çizelge 3.2.'de lipaz aktivite tayin basamakları verilmiştir. Enzim aktivitesi ölçmek amacıyla inkübasyon ortamına 1 mL zeytin yağ (olive oil), 4.5 mL 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0,5 mL 0,1 M CaCl₂ ve 1 mL ham enzim konulmuştur. Kör olarak kullanılacak tüpe diğer tüpteki tüm kimyasallar konularak, ham enzim yerine tampon konulmuştur. Tüpler vorteks ile iyice homojenize edilmiş ve tüpler 30°C'de 150 rpm hızda 30 dakika çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda reaksiyonun durulması amacıyla ortama %99,8 etanolden 20 mL eklenmiştir. Daha sonra 50 mM KOH içeren büret kullanılarak inkübasyon ortamının pH'sı 10.5'e kadar titre edilmiştir.

Çizelge 3.3. Lipaz aktivite tayin basamakları

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek Tüpü	Kontrol (Kör) Tüpü
Substrat çözeltisi (zeytinyağı)	1 mL	1 mL
50 mM Tris-HCl (pH 7.0),	4,5 mL	4,5 mL
0.1 M CaCl ₂	0,5 mL	0,5 mL
İnkübasyon sıcaklığına getirmek üzere 37 °C' de su banyosunda 5 dakika bekletilir		
Enzim çözeltisi		-
50 mM Tris-HCl (pH 7.0),	1 mL	1 mL
	-	
Vorteksle karıştırılır ve 37 °C' de çalkalamalı su banyosunda 30 dakika bekletilir		
Etanol (%98,8)	20 mL	20 mL
Vorteksle karıştırılır.		

Çizelge 3.4. Lipaz aktivite tayin basamakları (Devam)

50 mM KOH pH 10.5 'e kadar titre edilir

Enzim aktivitesi Unit (U/mL) cinsinden hesaplanmış olup, standart deney koşullarında 1 µmol yağ asidini açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Akyıl, 2013).

$$\frac{50 \times \text{Harcanan KOH miktarı}}{30 (\text{süre (Dk)}) \times \text{Harcanan enzim miktarı (mL)}} = U/mL$$

3.2.6. Bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine besinsel faktörlerin etkisi

3.2.6.1. Karbon (C) kaynaklarının etkisi

Mikroorganizmaların üremelerine etki eden karbon kaynaklarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı karbon kaynakları denemeye alınmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.1'de içeriği verilen besi yerlerinden, en yüksek lipaz aktivitesinin saptandığı besi yerindeki karbon kaynağı yerine aynı oranda glukoz, sukroz, maltoz, nişasta gibi mono, di ve polisakkaritler, Hindistan cevizi yağı, Mısır yağı, Soya yağı, Ayçiçek yağı, Hint yağı ve zeytin fabrikası atığı olan zeytin karasuyu kullanılarak lipaz enzimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.6.2. Azot (N) kaynaklarının etkisi

Azot kaynaklarının bakteri üreme kapasiteleri ve enzim üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla çeşitli organik ve inorganik azot kaynaklarının enzim üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla çizelge 3.1’de içeriği verilen besi yerlerinden en yüksek lipaz aktivitesinin saptandığı besi yerindeki azot kaynağı yerine aynı oranda organik azot kaynakları olan yeast ekstrakt, pepton, corn step liquer, tripton ve inorganik azot kaynakları olarak $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılmıştır. Üretim işlemi 3.2.4’te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir

3.2.6.3. Metal iyonu kaynaklarının etkisi

Besiyerinde bulunan metal iyonlarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla çizelge 3.1’de içeriği verilen besi yerlerinden en yüksek lipaz aktivitesinin saptandığı besi yerindeki metal iyonu olarak aynı oranda MnSO_4 , LiSO_4 , FeSO_4 , BaCl_2 , CaCl_2 , KCl , CuSO_4 , NaCl kullanılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.4’te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.7. Bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine fiziksel faktörlerin etkisi

3.2.7.1. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın bakteri üremesi ve lipaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, besi ortamının sıcaklığı 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C derecelerde ayarlanmış ve lipaz üretimi için optimum sıcaklık değeri saptanmıştır.

Üretim işlemi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.7.2. pH'nın etkisi

pH'nın bakteri üremesi ve lipaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, besi ortamının pH'sı 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 ve 9.0 değerlerinde ayarlanmıştır ve lipaz üretimi için optimum pH değeri saptanmıştır.

Üretim işlemi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.7.3. Havalandırmanın etkisi (Çalkalama hızı)

Havalandırmanın bakteri üremesi ve lipaz üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, inkübatörün çalkalanma hızının (devir/dakika) 0, 50, 100, 150, 200 ve 250 rpm değerlerine getirilmesi ile saptanmıştır.

Üretim işlemi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.7.4. İnokülasyon miktarının etkisi

Bakteri üremesi ve lipaz üretimi üzerine inokülasyon miktarının etkisini belirlemek amacıyla, bakterinin optik yoğunluğu OD₆₀₀ 0.3 olan ön inkübasyon kültüründen % 5, % 6, % 7, % 8, % 9 ve % 10 olacak şekilde enzim üretim ortamına ekim yapılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.7.5. İnokülasyon yaşının etkisi

Bakteri üremesi ve lipaz üretimi üzerine inokülasyon yaşının etkisini belirlemek amacıyla, 18 saat (kontrol), 24 saat ve 48 saat olarak farklı inokülüm yaşları kullanılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.8. Maksimum lipaz üretimi için modifiye ortamın hazırlanması

Maksimum lipaz üretiminin gözlemlendiği besinsel ve fiziksel koşulların biraya getirilmesi ile yeni oluşturulan modifiye ortamda enzim üretim veriminin artırılması yoluna gidilerek temel besi yerindeki verim ile karşılaştırılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.9. Lipaz enziminin kısmi saflaştırılması

En yüksek lipaz aktivitesine sahip *Bacillus* sp.' den elde edilen lipaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu amaçla, temel besiyerinde maksimum enzim üretim zamanına kadar üretilen kültür ortamı +4°C' de, 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Ham enzim üç basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Her bir basamakta enzim aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır. Protein tayini, standart olarak 'Sığır Serum

Albumin'i kullanılarak Lowry ve ark. (1951) metoduna göre belirlenmiştir tüm saflaştırma basamakları +4 ° 'de yapılmıştır.

3.2.9.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Ham enzimin en iyi çöktüğü tuz konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla süpernatant +4°C de farklı konsantrasyonlardaki (%20, %40, %70 ve %80) amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Buz dolu kap içerisinde ham enzim çözeltisi içeren behere havanda toz haline getirilmiş % amonyum sülfat çok yavaş bir şekilde eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan örnek manyetik karıştırıcıda karıştırılarak bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Çöktürme sonrası oluşan karışım 10.000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüjlenmiş, pellet ve süpernatant birbirinden ayrılmıştır. Pellet diyaliz için kullanılmıştır.

3.2.9.2. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen pellet 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözülmüştür. Yarı geçirgen bir membrana sahip diyaliz tüpü (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) istenilen boyutlarda kesilmiş, gözeneklerin temizlenmesi ve kirleticilerin giderilmesi amacıyla distile sudan geçirilmiştir. Diyaliz tüpü yumuşayınca bir ucu sıkıca ipe bağlanmıştır. Hazırlanan diyaliz tüpüne tampon içerisinde çözündürülmüş pellet örneği aktarılmış ve tüpün diğer ucu da ipe sıkıca bağlanmıştır. Diyaliz tüpü, 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda 4°C'de bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Diyaliz işlemi boyunca tampon çözeltisi tuzun tamamen giderilmesi amacıyla birkaç kez değiştirilmiştir. Amonyum sülfat tuzlarının ortamdan tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığını belirlemek için tampondan birkaç damla alınıp üzerine 0,1 N HCl ve doygun BaCl₂ çözeltisinden 1-2 damla damlatılmıştır. Diyaliz işlemi bulanıklık görülmediği zamana kadar devam ettirilmiştir (Trautwein ve Kuhlmann 1982).

3.2.9.3. Ultrafiltrasyon ile diyalizatın konsantre edilmesi

Diyalizat, ultra filtrasyon (MW cut-off 30,000 ve 10,000) tüpüne alınmış ve +4°C’de 5000 rpm’de 15 dk sürelerle istenilen hacme ulaşana kadar konsantre edilmiştir. Konsantre edilen örnekte aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır.

3.2.9.4. Protein miktarının belirlenmesi

Her bir saflaştırma basamağında elde edilen protein miktarlarının tayin edilmesi için Lowry Metodu kullanılmıştır (Lowry 1951). Protein standart grafiğinin oluşturulması için 5 mg BSA 10 mL distile suda çözölmüştür. Konsantrasyonu 0-500 µg/mL olacak şekilde uygun sulandırma yapılarak hazırlanan örneklerin absorbansları 546 nm’de ölçölmüş (Beckman Coulter-UD 700) ve standart eğri grafiğı hazırlanmıştır.

Ayıraç A: % 3’ lük Na₂CO₃ (0.1 N NaOH’da çözönmüş)

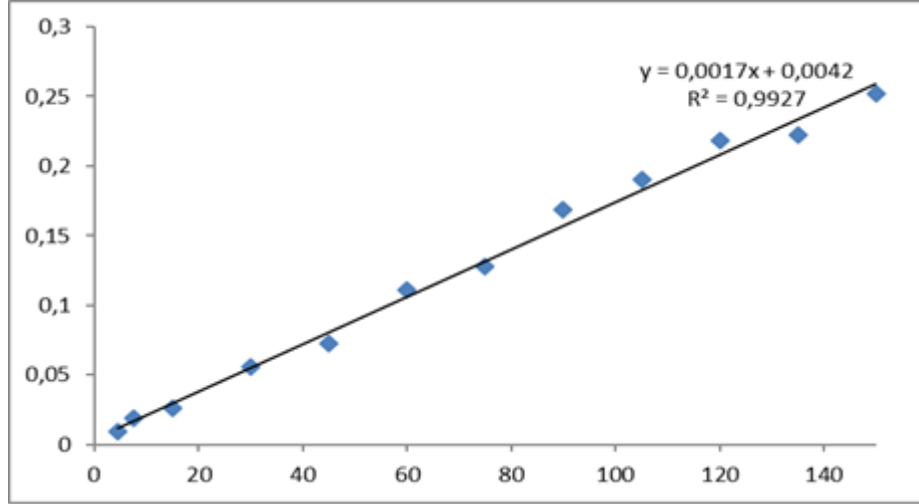
Ayıraç B: % 2’lik K-Na-tartarat

Ayıraç C: % 1’ lik CuSO₄.5H₂O

Ayıraç D: İhtiyaca göre günlük A, B ve C ayıraçlarından hazırlanır (50:1:1 oranında).

Ayıraç E: 1,1 oranında seyreltilmiş Folin ciocalteus fenol ayıracı

1 mL enzim örneğinden alınmış ve üzerine 5 mL D ayıracından eklenip karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Kör için ise 1 mL distile su ve D ayıracından 5 mL konularak aynı işlemler yapılmıştır. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerlerine 0,5 mL E çözeltisi eklenerek vortekslenmiş, karanlık bir ortamda 20 dakika boyunca bekletilmiştir. 546 nm’de köre karşı, absorbansları okunarak sonuçlar elde edilmiştir. Okunan bu absorbanslar standart protein konsantrasyonlarına karşı grafiğı geçirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Protein standart grafiği

3.2.10. Lipaz enziminin karakterizasyonu

Kısmi saflaştırılan lipaz enziminin karakterize edilmesi amacı ile enzim aktivitesi üzerine sıcaklık, pH ve potansiyel bileşiklerin etkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte enzimin moleküler ağırlığı, V_{max} ve K_m değerleri de saptanmıştır.

3.2.10.1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Kısmi saflaştırılmış lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak sıcaklık profili olarak 35, 37 (Kontrol), 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80°C değerleri kullanılmış ve enzimin optimum sıcaklık değeri saptanmıştır. Sıcaklık stabilitesini tespit etmek için enzim yüksek sıcaklık değerlerinde belli saatlerde inkübe edilerek aktivite tayinleri yapılmıştır. Her bir sıcaklık derecesinde elde edilen aktivite değerleri, kontrol olarak kullanılan 37 °C ‘den elde edilen değer (%100) ile kıyaslanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.2.10.2. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine olan etkileri araştırılmış ve bu amaçla 0.1 M glisin-HCl (pH 2.0 ve 3.0), 0.1 M sodyum asetat (pH 4.0-6.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0 ve 8.0), 0.1 M glisin-NaOH (pH 9.0 ve 10) kullanılarak pH 2.0-10.0 arasında aktivite ölçümü yapılmış ve enzimin optimum pH değeri tespit edilmiştir. Enzimin pH stabilitesi pH 6.0, 7.0 ve 8.0 değerlerinde belirli saatlerde belirlenmiştir. Her bir pH değerinde elde edilen aktivite değerleri, kontrol olarak kullanılan pH 6.0'dan elde edilen değer (%100) ile kıyaslanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.2.10.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Potansiyel Bileşiklerin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisini tespit etmek üzere enzim 1 ve 5 mM $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $CaCl_2$, $LiSO_4$, $BaCl_2$, $NaCl$, KCl , SDS, EDTA, Triton X-100 ve Tween 20 ile inkübe edilerek aktiviteleri saptanmıştır. Aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.2.10.4. Kinetik parametrelerin saptanması

Lipaz enziminin V_{max} ve K_m değerleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan tribütirin kullanılarak çizilen Lineweaver–Burk grafiği ile tespit edilmiştir.

Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.10.5. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti

Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Laemmli 1970).

3.2.11. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi

Liyofilize ham enzimin depolanma sıcaklığını saptamak üzere bakteriden üretilen ham enzimin başlangıç aktivitesi tayin edildikten sonra enzim örnekleri oda sıcaklığında (RT), +4 °C' de ve -20 °C' de her 15 günde bir aktivitelerine bakılarak depolama stabilitesi belirlenmiştir. Lipaz aktivitelerindeki değişim, başlangıç aktivitelerine göre hesaplanarak bağıl aktivite (%) olarak verilmiştir.

3.2.12. Lipaz enziminin deterjan endüstrisinde kullanım potansiyelinin belirlenmesi

3.2.12.1. Lipazın sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi

Liyofilize edilmiş lipazın aktivitesine deterjan katkı maddelerinin etkisinin incelenmesi amacıyla %1 ve %5 konsantrasyonlarda Triton X-100, EDTA, SDS ve H₂O₂ ilave edilerek, 100 rpm, 55 ve 65°C koşullarında 1 saat süresince lipaz enzimi bu deterjan katkı maddeleri ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında lipaz enziminin aktiviteleri tayin edilmiştir. Lipaz aktivitelerindeki değişim, başlangıç aktivitelerine göre hesaplanarak bağıl aktivite (%) olarak verilmiştir.

3.2.12.2. Kirletilmiş kumaşlara lipaz uygulanması

Liyofilize edilmiş lipazın ticari deterjanlardaki kararlılığı, farklı ticari deterjan çözeltileri ile inkübe edilmesiyle araştırılmıştır. Ülkemizde çoğunlukla kullanılan sıvı (S1, S2, S3) ve katı (K1, K2, K3) deterjanlar test edilmiştir. Deterjanlar (0,1 g katı ve 0,1 ml sıvı) 1 mL saf suda çözülerek kullanılmıştır. Liyofilize ham lipaz 50 mM Tris-HCl içerisinde çözülerek kumaş uygulamaları için hazır hale getirilmiştir (U/mL). Çalışmada %50 pamuk, %50 Poliester (PES) içeren beyaz kumaş kullanılmıştır. Kumaş B.U.Ü Tekstil Mühendisliği'nden temin edilmiştir. Kirletici olarak zeytinyağı ve gress yağı denemeye alınmıştır.

Her bir kirletici (zeytinyağı ve gress yağı) ile kirletilmiş kumaşlar için 6 deney seti oluşturulmuştur.

1. Kirletilmiş kumaş (kontrol)
2. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Deterjan (katı)
3. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Deterjan (sıvı)
4. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Enzim
5. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Deterjan (katı) + 1mL Enzim
6. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Deterjan (sıvı) + 1 mL Enzim

Beyaz kumaş parçaları 60x60 mm boyutunda kesilmiş ve tüm kumaşı kapsayacak şekilde ayrı ayrı zeytinyağı ve gress yağı ile kirletilmiştir. Yağ içeren kirleticiler ile muamele edilen kumaşlara yukarıda verilen setler uygulanarak 90x90 mm çapındaki petripler içerisinde 1 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu kumaşlar fırçayla hafifçe ovulup, saf su ile durulanarak kurutulmuştur. İşlem uygulanmamış kumaş örnekleri standart kabul edilerek, enzim ve deterjan uygulamaları sonrası meydana gelen beyazlık derecesindeki değişimler B.U.Ü. Tekstil Mühendisliği Bölümü laboratuvarında bulunan Konica Minolta renk ölçüm spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 3.2). Standart (hiçbir işlem görmemiş kumaş) ve numuneye ait “Beyazlık” indisleri karşılaştırılmıştır. Beyazlık indisleri ise Stensby esas alınarak ölçümler yapılmıştır (www.argetek.com).

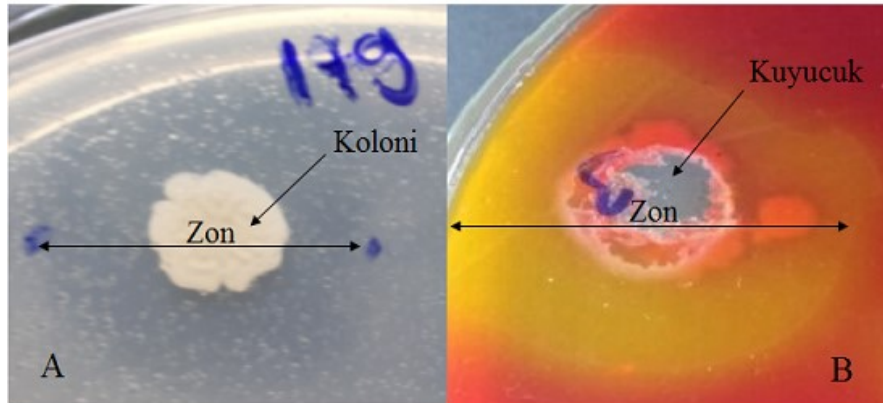


Şekil 3.2. Renk Ölçüm Spektrofotometresi

4. BULGULAR

4.1. Lipaz pozitif bakterilerin belirlenmesi

Bu çalışmada doğal kaynaklarımız olan toprak örneklerinden izole edilmiş toplam 341 *Bacillus* sp. suşlarından lipaz enzimi üretim kapasiteleri kalitatif olarak araştırılmıştır. Tribütirin içeren agarlı ortamda (TBA) 48. saat boyunca inkübe edilen *Bacillus* sp. suşları arasında 141 tanesinde açık renkli hidrolitik zonlar görülmüştür. Bu zonların varlığı bakterinin lipaz ürettiğini göstermiştir. 141 tane bakteriden 74 tanesinin zayıf hidrolitik zon (EI = 0,07-0,30), 42 tanesinde orta hidrolitik zon (EI = 0,30-0,50), 25 tanesinin geniş hidrolitik zona (EI = 0,5-2) sahip olduğu saptanmıştır (çizelge 4.1). Bunlardan EI = 2 olan ve 16 mm hidrolitik zon çapı gösteren *Bacillus* sp. suşu ATA179 olarak adlandırılmıştır (şekil 4.1A). Ayrıca 37 °C’de 48 saatlik inkübasyon sonucunda petri kaplarındaki hidrolitik zon varlığı ortama fenol kırmızısı varlığında da gösterilmiştir (şekil 4.1B).



Şekil 4.1 A: Lipaz üreten *Bacillus* sp. ATA179’ un TBA ortamdaki görüntüsü B: Lipaz varlığının fenol kırmızısı ile hidrolitik zon görüntüsü

Çizelge 4.1. Lipaz pozitif bakterilerin 48. saatteki zon çapları

Bakteri Sıra ve No	İl	Koloni Çapı (mm)	Hidroli k Zon Çapı (mm)	Enzimati k İndeks (Ef)	Bakteri Sıra ve No	İl	Koloni Çapı (mm)	Hidroli k Zon Çapı (mm)	Enzimati k İndeks* (Ef)
1-12	Bilecik	13	4	0,30	53-114	Kastamonu	10	6	0,6
2-16	Kırklareli	15	5	0,33	54-115	Kastamonu	12	3	0,25
3-17	Kırklareli	14	5	0,35	55-118	Sinop	10	3	0,30
4-18	Kırklareli	12	3	0,25	56-119	Sinop	14	3	0,21
5-19	Kırklareli	10	1	0,10	57-123	Malatya	10	3	0,30
6-20	Kırklareli	12	1	0,08	58-124	Malatya	15	2	0,13
7-21	Kırklareli	14	2	0,14	59-128	Malatya	10	3	0,30
8-22	Kayseri	17	2	0,11	60-129	Malatya	15	4	0,26
9-24	Kayseri	10	8	0,8	61-132	Sivas	9	2	0,22
10-25	Kayseri	10	3	0,3	62-135	Sivas	8	6	0,75
11-27	Kayseri	13	1	0,07	63-136	Mersin	12	2	0,16
12-28	Manisa	10	3	0,3	64-138	Mersin	5	8	1,60
13-29	Manisa	11	3	0,27	65-142	Zonguldak	8	4	0,50
14-30	Manisa	12	2	0,16	66-143	Zonguldak	15	4	0,26
15-34	Manisa	10	5	0,5	67-145	Zonguldak	9	3	0,33
16-35	Manisa	13	5	0,38	68-148	Artvin	9	3	0,33
17-36	Kütahya	11	3	0,27	69-151	Tokat	8	7	0,87
18-38	Kütahya	13	4	0,30	70-158	Eskişehir	9	4	0,44
19-40	Kütahya	16	3	0,18	71-159	Eskişehir	9	4	0,44
20-45	Adana	18	2	0,11	72-160	Eskişehir	12	2	0,16
21-46	Adana	8	6	0,75	73-164	Kocaeli	14	2	0,14
22-47	Adana	13	4	0,30	74-166	Kocaeli	12	3	0,25
23-50	Niğde	14	4	0,28	75-167	Kocaeli	11	2	0,18
24-55	Trabzon	12	3	0,25	76-170	Denizli	10	3	0,30
25-57	Trabzon	7	3	0,42	77-171	Denizli	15	2	0,13
26-59	Tunceli	12	5	0,41	78-172	Konya	10	4	0,40
27-60	Tunceli	5	9	1,8	79-173	Konya	13	3	0,23
28-62	Tunceli	13	7	0,53	80-174	Konya	17	2	0,11
29-65	Burdur	7	7	1	81-175	Konya	10	4	0,40
30-68	Burdur	14	1	0,07	82-176	Konya	11	3	0,27
31-74	Ordu	15	1	0,06	83-177	Konya	14	3	0,21
32-78	Balıkesir	13	1	0,07	84-178	Konya	13	4	0,30
33-79	Balıkesir	7	13	1,85	85-179	Konya	8	16	2
34-82	Balıkesir	5	4	0,80	86-185	Kayseri	18	4	0,22
35-83	Hatay	13	3	0,23	87-187	Adana	12	2	0,16
36-85	Hatay	7	13	1,85	88-190	Niğde	15	4	0,26
37-86	Hatay	8	3	0,37	89-191	Tunceli	9	3	0,33
38-87	Hatay	7	3	0,42	90-192	Burdur	12	3	0,25
39-89	Hatay	8	4	0,5	91-193	Burdur	9	3	0,33
40-90	Hatay	9	3	0,33	92-195	Ordu	16	3	0,18
41-91	Hatay	5	4	0,80	93-196	Ordu	14	4	0,28
42-92	Sakarya	18	3	0,16	94-197	Balıkesir	10	4	0,40
43-97	Ardahan	15	2	0,13	95-198	Balıkesir	15	10	0,66
44-98	Ardahan	14	3	0,21	96-199	Trabzon	10	5	0,50
45-100	Bartın	11	4	0,36	97-200	Trabzon	8	3	0,37
46-101	Bartın	10	4	0,40	98-203	Hatay	12	2	0,16
47-103	Bartın	5	4	0,80	99-205	Sinop	20	2	0,10
48-105	Edime	10	3	0,30	100-209	Sivas	11	3	0,27
49-107	Edime	7	5	0,71	101-210	Mersin	12	2	0,16
50-110	Edime	9	5	0,55	102-211	Mersin	9	3	0,33
51-112	Edime	12	3	0,25	103-212	Mersin	5	9	1,8
52-113	Kastamonu	6	10	1,66	104-214	Artvin	11	3	0,27

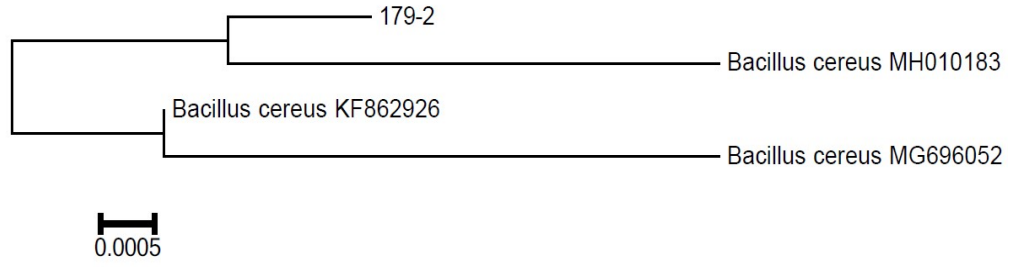
Çizelge 4.2. Lipaz pozitif bakterilerin 48. saatteki zon çapları (Devam)

105-215	Artvin	11	3	0,27	124-274	Balıkesir	11	3	0,27
106-217	Eskişehir	11	2	0,18	125-275	Konya	13	1	0,07
107-220	Kocaeli	10	3	0,30	126-278	Bilecik	13	3	0,23
108-222	Ordu	11	3	0,27	127-283	Alanya	9	4	0,44
109-223	İstanbul	11	3	0,27	128-285	Kayseri	9	4	0,44
110-225	Balıkesir	11	4	0,36	129-286	Manisa	10	4	0,40
111-226	Balıkesir	12	2	0,16	130-287	Konya	12	3	0,25
112-229	Ankara	13	1	0,07	131-294	Adana	12	2	0,16
113-230	Sakarya	13	3	0,23	132-295	Niğde	11	3	0,27
114-233	İzmir	14	1	0,07	133-296	Trabzon	10	3	0,30
115-234	İzmir	9	3	0,33	134-297	Konya	9	4	0,44
116-238	Trabzon	10	4	0,40	135-299	Mersin	11	2	0,18
117-239	Sivas	13	3	0,23	136-302	Alanya	11	3	0,27
118-240	Niğde	14	2	0,14	137-306	İzmir	13	3	0,23
119-241	Niğde	16	3	0,18	138-311	Muğla	11	3	0,27
120-261	Muğla	12	1	0,08	139-312	İstanbul	10	3	0,30
121-262	Kayseri	13	3	0,23	140-314	İstanbul	12	3	0,25
122-267	İzmir	12	2	0,16	141-315	Mersin	9	5	0,55
123-273	Tokat	12	2	0,16					

EI*= Hidroliz zonunun çapı / Koloninin çapı

4.2. 6S rRNA analizi (Filogenetik Analiz)

Bakterinin mikrobiyal düzeyde tür analizi için RefGen-Biyoteknoloji (Ankara) tarafından yapılan 16S rRNA dizi analizi sonucunda *Bacillus* sp. ATA179 suşunun dizini gen bankasında karşılaştırılmış ve *Bacillus cereus* ile %100 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (şekil 4.2). Bu yüzden yeni izole ettiğimiz bakteri *Bacillus cereus* ATA179 olarak adlandırılmıştır. *Bacillus cereus* ATA179 suşunun 16S rRNA analizini yapmak için bu gen bölgesine özel 27F_D03 (Çizelge 4.2) ve 907R_E03 (Çizelge 4.3) primerleri kullanılmıştır. *Bacillus cereus* ATA179 suşunun 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisinin bir bölümünün gösterildiği kromotogram çizelge 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.2 *Bacillus cereus* ATA179 suşunun 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı

Çizelge 4.3. *Bacillus cereus* ATA179 suşunun 27F_D03 primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

```
GAGGAATTGGCGCGTGCCTAATACTCGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTAT
GAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACT
CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGC
GGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAG
AACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCACTGGCGAAAGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTAC
ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACATGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCATGCTGAACGAAATGGAAATTTGGCGGAATTGCTCCC
CCGGGGCCATAATCACTTAGTTAAGGTGCCACTTTGGCATCTGAATGCCATTGATCCACTCG
ACACGT
```

Çizelge 4.4. *Bacillus cereus* ATA179 suşunun 907R_E03 primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

```
ACCTTGCGGCAGTAATCCCAGGCGGGAGTGCTTATGCGTTACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACC
CTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCA
CGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTATCGCCACTGGTGTTCTCCATA
TCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTC
CAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTT
TACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAG
CCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAAC
AACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCA
TTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCCAGTGTTGGCC
GATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAGTCTAAT
GCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTCAATTCGAACCATGCAGTTCAA
AATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGT
GTTACTACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGCATGT
ATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCTGGCCGGGGGTCAAATCTCTA
```

4.3. Lipaz üretim ortamının belirlenmesi

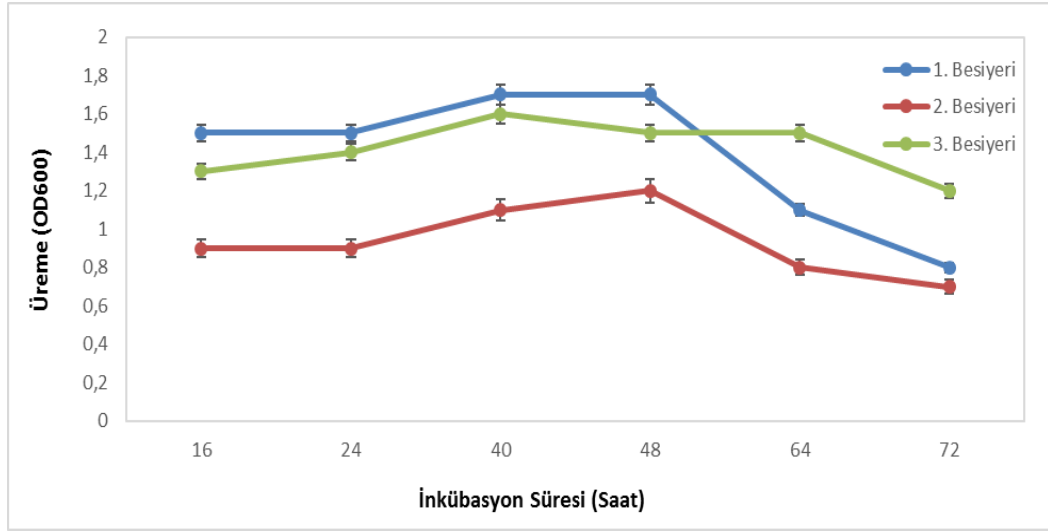
Bacillus sp. ATA179 suşunun lipaz üretim ortamını belirlemek üzere denemeye alınan 3 farklı içerikli besi yerlerinde 72 saat boyunca yapılan üretim sonucunda en iyi besi yeri 3 numaralı besi yeri olarak saptanmıştır. Bu besi yerinde maksimum enzim aktivitesi 6.6 U/mL olarak 48 saatte elde edilirken, maksimum üreme OD₆₀₀ 1,6 olarak 40.saatte elde edilmiştir (çizelge 4.4, şekil 4.3 ve şekil 4.4). Daha sonraki çalışmalara seçilen bu besiyeri ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.5. *Bacillus cereus* ATA179'in 3 farklı ortamdaki üreme ve lipaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması

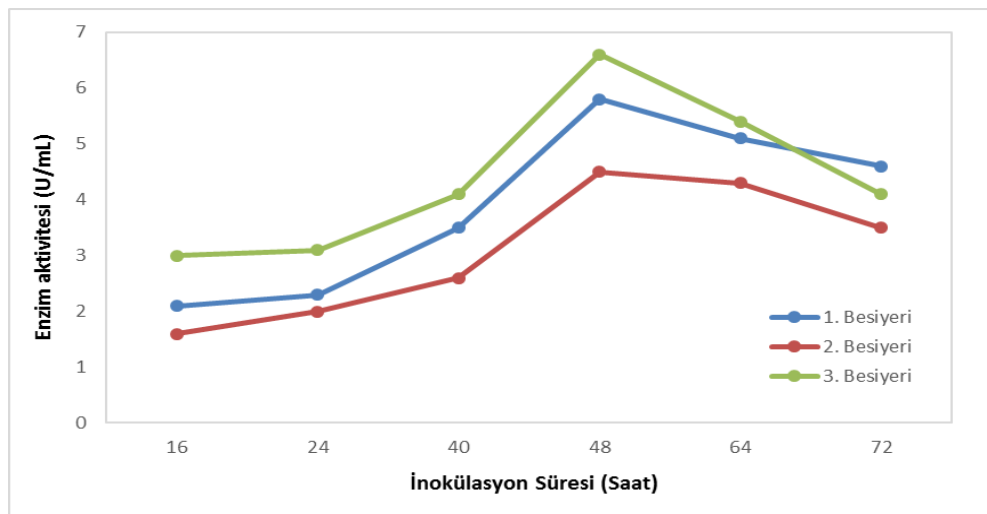
İnkübasyon süresi (saat)	1 (Dahiya ve Purkayastha 2011)		2 (Hasan ve ark.2006)		3 (Kumar ve ark. 2005)	
	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/Ml
16	1,5	2,1	0,9	1,6	1,3	3,1
24	1,5	2,3	0,6	2,0	1,4	3,0

Çizelge 4.6. *Bacillus cereus* ATA179'in 3 farklı ortamdaki üreme ve lipaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (Devam)

40	1,7	3,5	0,9	2,6	1,6	4,1
48	1,7	5,8	1,0	4,5	1,5	6,6
64	1,1	5,1	1,0	4,3	1,5	5,4
72	0,8	4,6	0,9	3,5	1,2	4,1

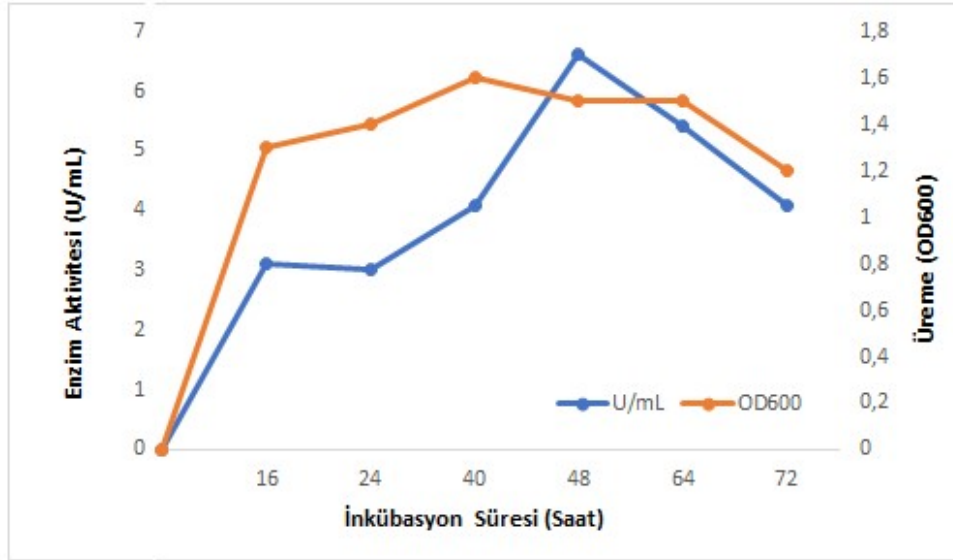


Şekil 4.3. *Bacillus cereus* ATA179'in 3 farklı içerikli besiyerinde bakteri üremelerinin karşılaştırılması



Şekil 4.4. *Bacillus cereus* ATA179'in 3 farklı içerikli besiyerinde lipaz enzim üretimlerinin karşılaştırılması

Bacillus cereus ATA179'nın bakteri üreme eğrisi ve enzim üretimi şekil 4.5'de verilmiştir. Enzim üretiminin durağan durağan fazda maksimum olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *Bacillus cereus* ATA179'nın Besiyeri 3 (Çizelge 3.1)'de lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri

4.4. Enzim Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi

Enzim üretimi ortamda bulunan besinsel faktörlere bağlı olduğundan dolayı, temel besiyerindeki karbon (C), azot (N) ve metal iyonu kaynakları yerine farklı karbon, azot ve metal iyon kaynakları denenmiştir.

Yapılan çalışmalarda deneyler 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

4.4.1. Karbon (C) kaynaklarının etkisi

Üreme ortamında bulunan karbon kaynaklarının bakteri üreme ve lipaz enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla 10 farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. Kontrol ortamındaki %1 oranında zeytinyağı yerine karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz, maltoz, nişasta gibi mono, di ve polisakkaritler, hindistan cevizi yağı, mısır yağı, soya yağı, ayçiçek yağı, hint yağı ve zeytin fabrikası atığı olan zeytin karasuyu kullanılmıştır.

Farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerinde ATA179 suşu maksimum enzim üretimin elde edildiği saat olan 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu saat sonunda alınan örneklerde lipaz aktivitesi ve üreme değeri tayin edilmiştir (çizelge 4.5 ve şekil 4.6).

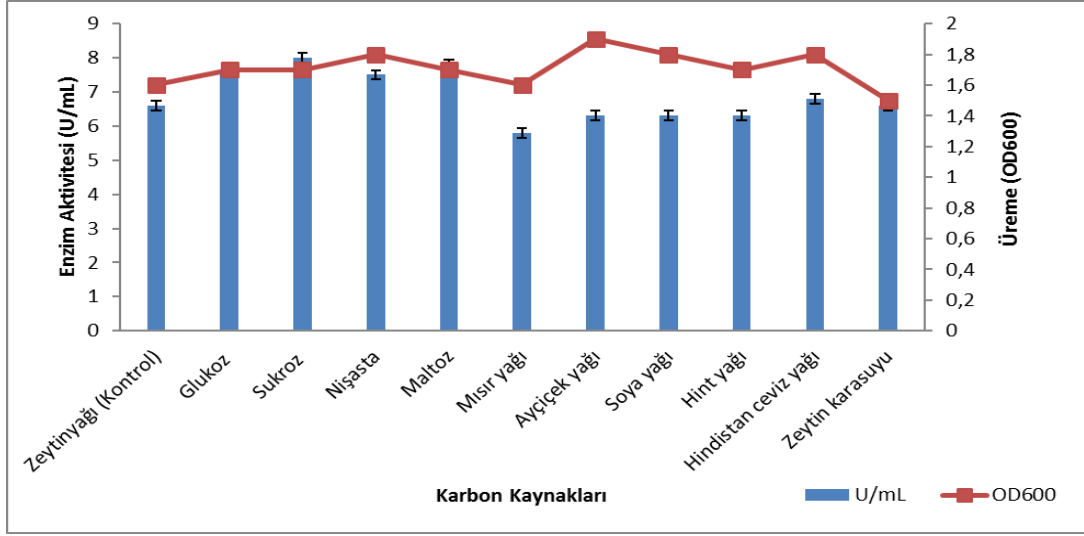
ATA179'in enzim üretimi açısından karbon kaynağı tercih sıralaması sırayla sukroz > maltoz > glukoz > nişasta > hindistan cevizi yağı > zeytin karasu = kontrol > ayçiçek yağı = soya yağı = hint yağı > mısır yağı şeklinde belirlenmiştir.

Maksimum bakteri üremesinin ise sırayla ayçiçek yağı > nişasta = soya yağı = hindistan cevizi yağı > glukoz = sukroz = maltoz = hint yağı > mısır yağı = kontrol > zeytin karasuyu ortamlarında gerçekleştiği saptanmıştır.

Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği sukroz içeren ortamdaki enzim üretimi (8 U/mL), kontrol ortamına göre (6,6 U/mL) %21 oranında artmıştır (çizelge 4.5).

Çizelge 4.7.Farklı karbon kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etki

Karbon Kaynakları	Üreme (OD₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağıl Aktivite (%)
Kontrol (Zeytinyağı)	1,6	6,6	100
Glukoz	1,7	7,6	115
Sukroz	1,7	8	121
Nişasta	1,8	7,5	113
Maltoz	1,7	7,8	118
Mısır yağı	1,6	5,8	87
Ayçiçek yağı	1,9	6,3	95
Soya yağı	1,8	6,3	95
Hint yağı	1,7	6,3	95
Hindistan cevizi yağı	1,8	6,8	103
Zeytin karasu	1,5	6,6	100



Şekil 4.6. Karbon kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

4.4.2. Azot (N) kaynaklarının etkisi

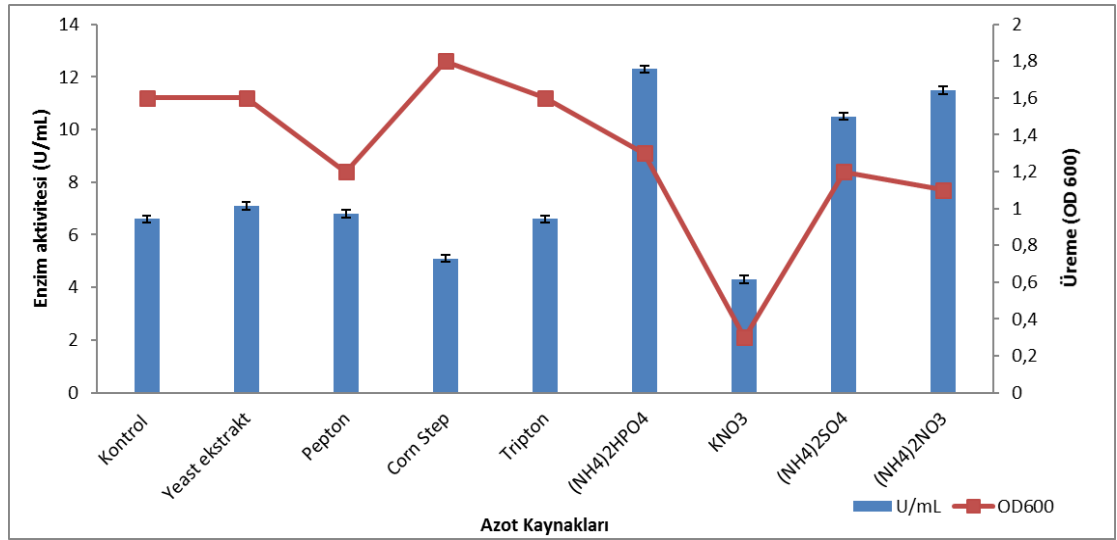
Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla kontrol ortamındaki pepton ve yeast ekstrakt yerine sırasıyla; %1 oranında organik azot kaynakları olarak yeast ekstrakt, pepton, corn step, tripton ve inorganik azot kaynakları olarak $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ kullanılmıştır. Farklı azot kaynakları içeren besi yerlerinden 48. saatte alınan örneklerin üreme değerleri ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge şeklinde verilerek, en yüksek enzim aktivitesinin inorganik azot kaynağı olan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ varlığında 12,3 U/mL olarak tespit edilmiştir (çizelge 4.6, şekil 4.7). Bu ortam kontrol ile kıyaslandığında %86 oranında bir verim elde edilmiştir. Ayrıca $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ varlığında %74, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ varlığında %59 ve organik azot kaynağı olan yeast ekstrakt varlığında ise %7,5 oranında enzim verimi sağlanmıştır.

Bacillus cereus ATA179'in enzim aktivitesi açısından organik ve inorganik azot kaynağı tercihi sırasıyla; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{NO}_3 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{yeast ekstrakt} > \text{pepton} > \text{tripton} = \text{kontrol} > \text{corn step} > \text{KNO}_3$ şeklindedir (çizelge 4.6).

Maksimum bakteri üremesinin ise sırayla; corn step > yeast ekstrakt = tripton = kontrol > $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 > \text{pepton} = (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{NO}_3 > \text{KNO}_3$ ortamlarında gerçekleştiği saptanmıştır (çizelge 4.6).

Çizelge 4.8. Farklı azot kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

Azot Kaynakları	Üreme (OD ₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağıl Aktivite (%)
Kontrol (Pepton + Yeast ekstrakt)	1,6	6,6	100
Yeast ekstrakt	1,6	7,1	107
Pepton	1,2	6,8	103
Corn Step	1,8	5,1	77
Trypton	1,6	6,6	100
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,3	12,3	186
KNO ₃	0,08	4,3	65
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2	10,5	159
(NH ₄) ₂ NO ₃	1,1	11,5	174



Şekil 4.7. Azot kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

4.4.3. Metal iyonu kaynaklarının etkisi

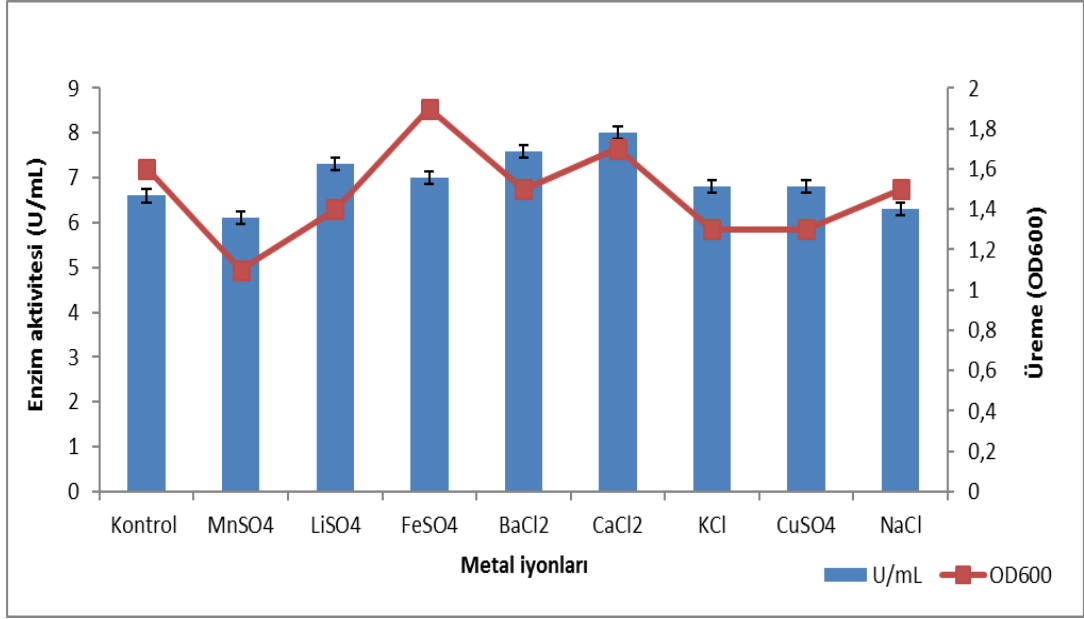
Metal iyonlarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda kontrol ortamında bulunan CaCl₂ + NaCl yerine toplam miktarda (%0,055) farklı metal iyonları kullanılmıştır. Bunlar MnSO₄, LiSO₄, FeSO₄, BaCl₂,

CaCl₂, KCl, CuSO₄, NaCl'dür. Farklı metal kaynakları içeren besi yerlerinden 48. saatte alınan örneklerde üreme değerleri ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.8'de görülebileceği gibi kontrole (6,6 U/mL) göre daha yüksek aktivite değeri metal kaynağı CaCl₂ 8 U/mL olarak saptanmış ve %21'lik bir enzim verimi elde edilmiştir. Enzim üretiminde metal kaynağını sırası ile CaCl₂ > BaCl₂ > LiSO₄ > FeSO₄ > KCl = CuSO₄ > kontrol > NaCl > MnSO₄ şeklinde tercih ettiği görülmüştür (çizelge 4.7). Ayın zamanda kontrol ortamında birlikte bulunan CaCl₂ ve NaCl ayrı ayrı denemeye alınmış olup, ancak enzim üretiminde CaCl₂ ayrı olduğundan önemli etkiye sahip olduğunu saptanmıştır. Buna karşı NaCl yalnız olduğunda inhibitör etkisi elde edilmiştir (çizelge 4.7).

Maksimum bakteri üremesinin ise sırayla; FeSO₄ > CaCl₂ > kontrol > BaCl₂ = NaCl > LiSO₄ > KCl = CuSO₄ > MnSO₄ ortamlarında gerçekleştiği saptanmıştır (çizelge 4.7).

Çizelge 4.9. Metal kaynaklarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

Metal İyonlar	Üreme (OD₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağlı Aktivite (%)
Kontrol (CaCl ₂ + NaCl)	1,6	6,6	100
MnSO ₄	1,1	6,1	92
LiSO ₄	1,4	7,3	110
FeSO ₄	1,9	7	106
BaCl ₂	1,5	7,6	115
CaCl₂	1,7	8	121
KCl	1,3	6,8	103
CuSO ₄	1,3	6,8	103
NaCl	1,5	6,3	95



Şekil 4.8. Metal iyonlarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

4.5. Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Fiziksel Faktörler

4.5.1. Sıcaklığın etkisi

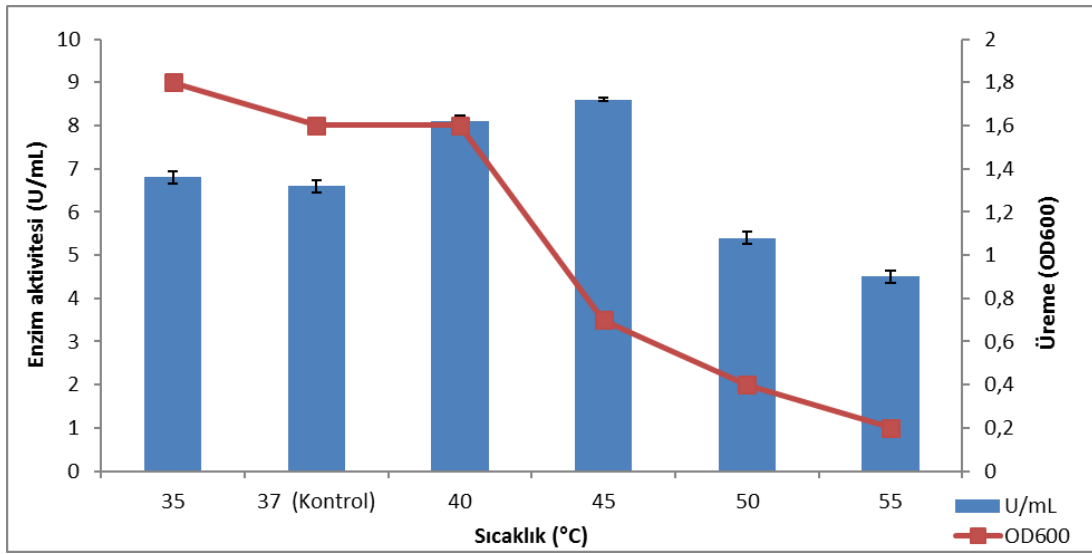
Sıcaklığın bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C sıcaklıkları kullanılarak optimum sıcaklık değeri saptanmıştır. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin 45°C olduğu ve bu sıcaklıkta enzim aktivitesinin 8.6 U/mL olduğu saptanmıştır (çizelge 4.8). Kontrol (6.6 U/mL) ile kıyaslandığında %30 oranında enzim verimi elde edilmiştir. Üremenin ise düşük olduğu belirlenmiştir. Sıcaklığın artması ile gerek üremede gerekse enzim üretiminde dramatik bir azalma görülmüştür (şekil 4.9).

Çizelge 4.10. Sıcaklığın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

Sıcaklık (°C)	Üreme (OD ₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/ mL)	Bağlı Aktivite (%)
35	1,8	6,8	103
37 (Kontrol)	1,6	6,6	100

Çizelge 4.11. Sıcaklığın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri (Devam)

40	1,6	8,1	122
45	0,7	8,6	130
50	0,4	5,4	81
55	0,2	4,5	68



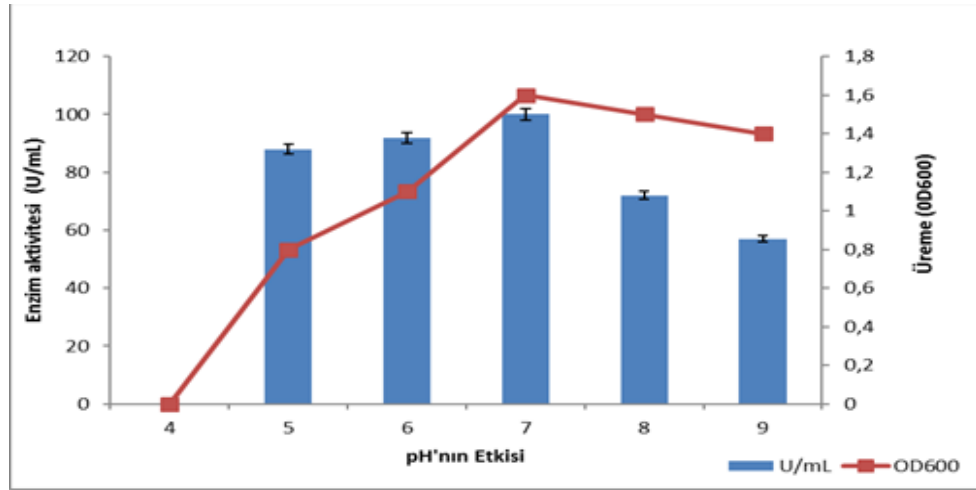
Şekil 4.9. Sıcaklığın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

4.5.2. pH'nın etkisi

pH etkisinin bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 ve 9.0 pH değerleri kullanılarak optimum pH değeri saptanmıştır. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin pH 7.0 elde edildiği saptanmıştır (çizelge 4.9 ve şekil 4.10). pH 4.0'de üreme gözlenmediğinden aktivite de tayin edilmemiştir. Yüksek pH'larda üreme saptanırken enzim üretiminde düşüşler belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. pH'nın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

pH	Üreme (OD ₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağıl Aktivite (%)
4	-	-	-
5	0,8	5,8	88
6	1,1	6,1	92
7 (Kontrol)	1,6	6,6	100
8	1,5	4,8	72
9	1,4	3,8	57



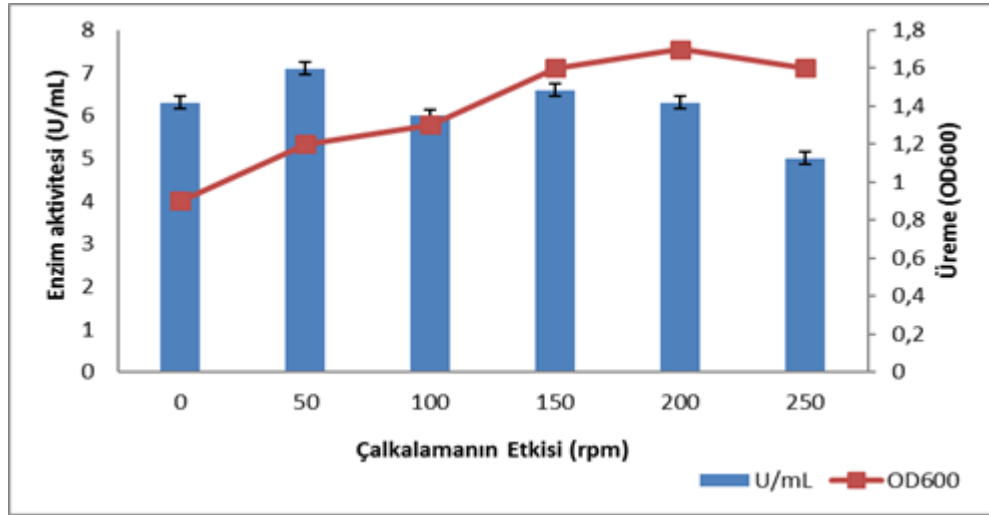
Şekil 4.10. pH'nın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

4.5.3. Havalandırmanın etkisi (Çalkalanma etkisi)

Havalandırmanın etkisi inkübatörün çalkalanma hızının 0, 50, 100, 150, 200 ve 250 rpm şeklinde değiştirilerek optimum rpm değeri saptanmıştır. Yapılan çalışmada en yüksek enzim üretimi için gerekli çalkalama hızı 50 rpm olarak belirlenmiştir (çizelge 4.10, şekil 4.11). Bu rpm'de enzim aktivitesi 7,1 U/mL olarak saptanmıştır. Kontrol (6,6 U/mL) ile kıyaslandığında %7,5 oranında verim artışı saptanmıştır.

Çizelge 4.13. Çalkalanmanın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

Çalkalanma Etkisi (rpm)	Üreme (OD ₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/ mL)	Bağlı Aktivite (%)
0	0,9	6,3	95
50	1,2	7,1	107,5
100	1,3	6,0	90
150 (Kontrol)	1,6	6,6	100
200	1,7	6,3	95
250	1,6	5,0	75



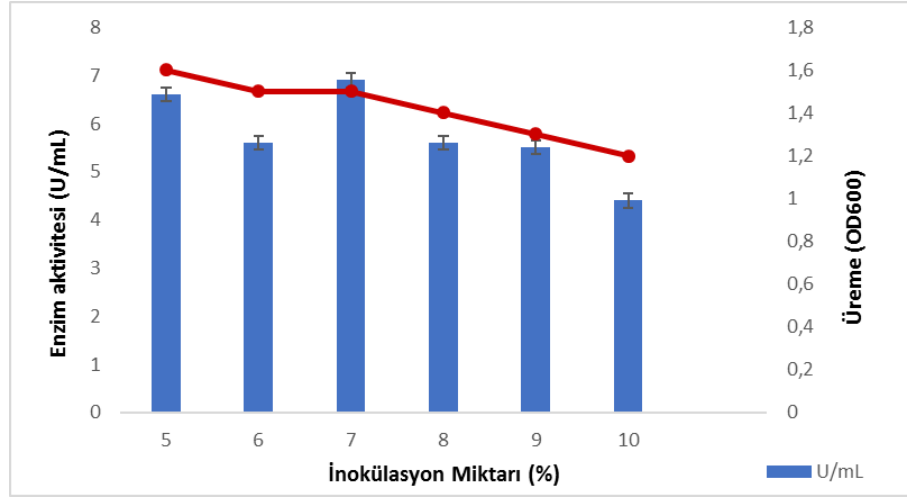
Şekil 4.11. Çalkalamanın üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

4.5.4. İnokülasyon miktarının Etkisi

Çalışmada bakteriler OD₆₀₀'si 0,3 olan ön inkübasyon kültüründen %5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olacak şekilde enzim üretim ortamına ekilmiş ve optimum inokülasyon miktarı saptanmıştır. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği inokülasyon miktarı %7 olarak belirlenmiştir (çizelge 4.11, şekil 4.12). Enzim üretimi bu rpm değerinde kontrole göre %4,5 oranında az bir artış göstermiştir.

Çizelge 4.14. İnokülasyon miktarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

İnokülasyon Miktarı (%)	Üreme (OD ₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/ mL)	Bağlı Aktivite (%)
5 (Kontrol)	1,6	6,6	100
6	1,5	5,6	85
7	1,5	6,9	104,5
8	1,4	5,6	85
9	1,3	5,5	83
10	1,2	4,4	66



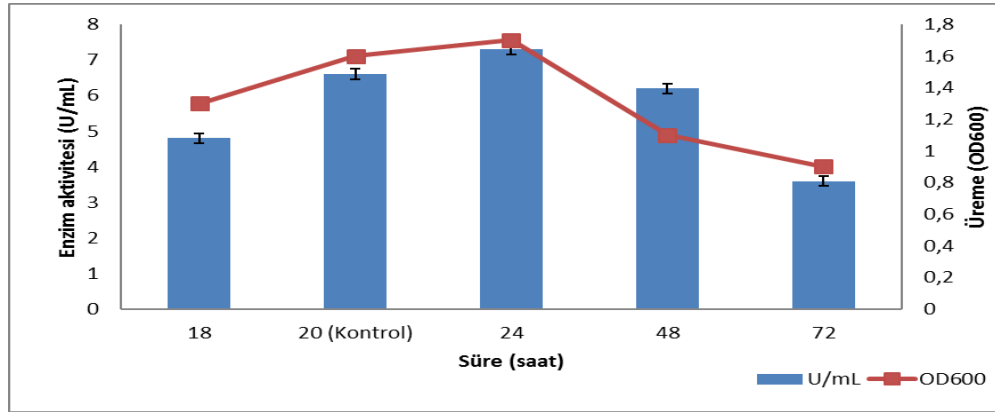
Şekil 4.12. İnokülasyon miktarının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

4.5.5. İnokülasyon yaşının etkisi

İnokülasyon yaşının enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla bakterilerin 18, 20 (kontrol), 24, 48 ve 72 saat şeklindeki inokülüm yaşları kullanılarak optimum inokülasyon yaşı saptanmıştır. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği inokülasyon süresi 24. saat olarak belirlenmiştir (çizelge 4.12, şekil 4.13). Bu inokülasyon süresinde enzim üretimi kontrole kıyasla %10 oranında az bir artış göstermiştir.

Çizelge 4.15. İnokülasyon yaşının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

İnokülasyon Yaşı (saat)	Üreme (OD ₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağıl Aktivite (%)
18	1,3	4,8	72
20 (Kontrol)	1,6	6,6	100
24	1,7	7,3	110
48	1,1	6,2	93
72	0.9	3,6	55



Şekil 4.13. İnokülasyon yaşının üreme ve lipaz üretimi üzerine etkileri

4.6. Maksimum Lipaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Belirlenmesi

En yüksek lipaz üretiminin saptandığı karbon, azot ve metal iyonları şeklinde besinsel faktörler ve aynı zamanda sıcaklık, pH, havalandırma, inokülasyon yaşı, inokülasyon miktarı gibi fiziksel faktörler bir araya getirilerek yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Bu ortamda enzim veriminin artırılması yoluna gidilmiştir.

Karbon kaynağı olarak %1sukroz, azot kaynağı olarak %1 (NH₄)₂HPO₄ ve metal iyonu olarak %0,055 CaCl₂ kullanılarak, inokülasyon yaşı 24 saat olan kültürden %7 oranında aşılama yapılmış ve üretim 45°C, pH 7.0, 50 rpm’de 48 saat boyunca yapılmıştır (Çizelge 4.13). Yapılan çalışma sonucunda modifiye ortamda enzim aktivitesi 10 U/mL olarak saptanmıştır. Bu ortamdan elde edilen değer kontrol (6,6 U/mL) ile

kıyaslandığında %51,5 oranında bir enzim verimi elde edilmiştir (Çizelge 4.13). Üremede de az bir artış saptanmıştır.

Çizelge 4.16. Kontrol ortamı ile modifiye ortamda üreme ve lipaz enzim üretim kapasitesinin karşılaştırılması

Kontrol Ortam (Kumar ve ark. 2005)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Modifiye Ortam	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)
%1 Zeytinyağı	6,6	1,6	%1 Sukroz	10	1,9
%0,5 Pepton + %0,5 Yeast Ekstrakt			%1 (NH ₄) ₂ HPO ₄		
%0,05 NaCl+ %0,005 CaCl ₂			%0,055 CaCl ₂		
37°C			45°C		
pH 7.0			pH 7.0		
150 rpm			50 rpm		
%5 Aşılama			%7 Aşılama		
Ön İnkübasyon 18 Saat			Ön İnkübasyon 24 Saat		

4.7. Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Enzimin kısmi olarak saflaştırılması için ATA179 suşu (3.2.5)'te belirttiği gibi üretilmiştir. Üretim sonrası kültür ortamı +4'de soğutmalı santrifüjde 5000 rpm'de santrifüjlenmiş ve süpernatant ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır. Ham enzim çözeltisi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemlerinden geçirilerek enzim kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma adımlarında elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein tayinleri standart koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Saflık SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

Kısmi saflaştırma basamağında ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Bunun için ham enzim çözeltisi %20, %40, %70 ve %80 konsantrasyonlarındaki amonyum sülfat varlığında çöktürmeleri yapılmıştır. Enzimin en iyi çöktüğü amonyum sülfat konsantrasyonu %70 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.17.Farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat çöktürmesi

Fraksiyonlar (%)	Enzim Aktivitesi (U/mL)
20	8,6
40	9,7
70	12,5
80	9.7

Kısmi saflaştırmada ikinci olarak %70’lik amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen pellet 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözölmüş ve diyaliz tüpüne konarak bir gece boyunca aynı tamponya karşı, +4°C de diyaliz edilmiştir. Amonyum sülfat tuzlarının ortamdaki tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığını belirlemesi 3.6.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Diyalizat ultra filtrasyon (MW cut-off 30,000 ve 10,000) tüp ile santrifüj edilerek konsantre edilmiş ve enzim 7,2 kez saflaştırılmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enzim daha sonra karakterize edilmiştir.

Saflaştırma basamakları ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.18.Lipaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim ¹ (%)	Saflık ² (Kez)
Ham enzim	100	130	660	5,07	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (%70)	16	15,6	200	12,8	30	2,5
Diyaliz	14	6,72	147	21,8	22	4,29
Ultrafiltrasyon	4	1,04	38	36,5	5,7	7,2

¹Verim, toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

²Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

4.8. Kısmi olarak saflaştırılan Lipaz Enziminin Karakterizasyonu

Kısmi saf enzim çözeltisi üzerine sıcaklık, sıcaklık stabilitesi, pH ve pH stabilitesi ile farklı metal iyonlarının etkilerine bakılmıştır. Ayrıca kısmi olarak saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı jel elektroforez yöntemi (Laemmli 1974) ile tayin edilmiştir. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri de saptanmıştır.

4.8.1. Sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin etkisi

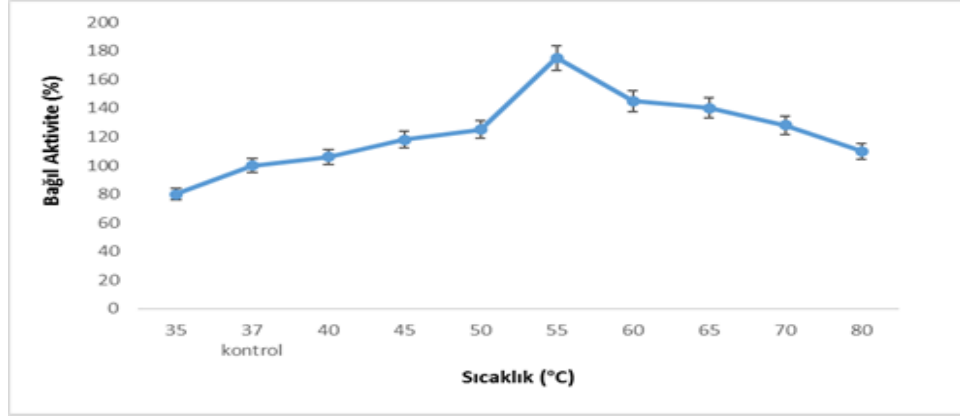
Enzim üzerine sıcaklık derecelerinin etkilerini belirlemek üzere 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80 °C’lerde aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol olarak kullanılan 37 °C sıcaklık derecesindeki sonuç %100 kabul edilerek, aktivite değerleri % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzimin 55°C’ de maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır (çizelge 4.16 ve şekil 4.14). Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi ham enzime göre %75 artmıştır. Sıcaklığın her 5 derece arttırılması ile aktivite değerleri de artmıştır. 65 °C’ de enzim aktivitesi %40 oranında da elde edilmiştir.

Çizelge 4.19. Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklık (°C)	Bağıl Aktivite (%)
35	80
37 (Kontrol)	100
40	106
45	118
50	125
55	175
60	145

Çizelge 4.20. Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi (Devam)

65	140
70	128
80	110

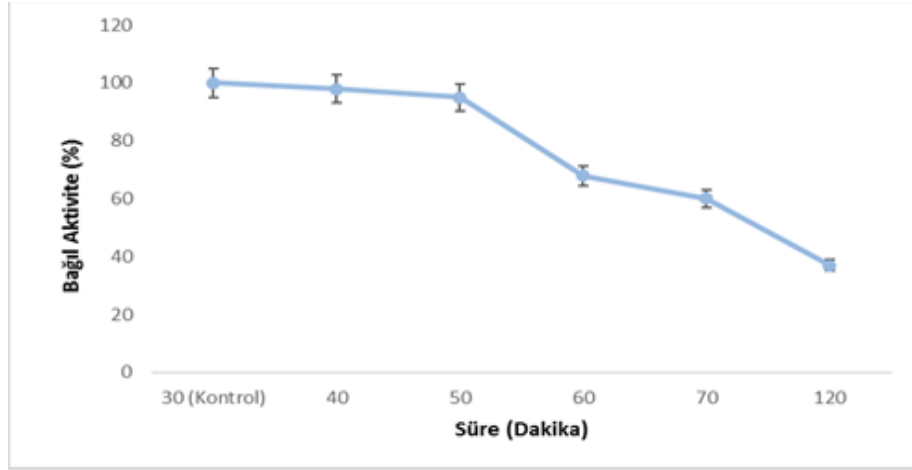


Şekil 4.14. Sıcaklığın lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği 55°C’de enzimin stabilitesine bakılmış ve enzim çözeltisi su banyosunda 40, 50, 60, 70 ve 120 dakika süre ile tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kısmi saf enzimin 50. dakikaya kadar aktivitesini koruduğu saptanmıştır (çizelge 4.17). Sürenin artması ile enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (şekil 4.15).

Çizelge 4.21. Sıcaklık stabilitesinin lipaz aktivitesi üzerine etkisi

55 °C (Dakika)	Bağıl Aktivite (%)
30 (Kontrol)	100
40	98
50	95
60	68
70	60
120	37



Şekil 4.15. Sıcaklık stabilitesinin lipaz aktivitesi üzerine etkisi

4.8.2. pH ve pH stabilitesinin etkisi

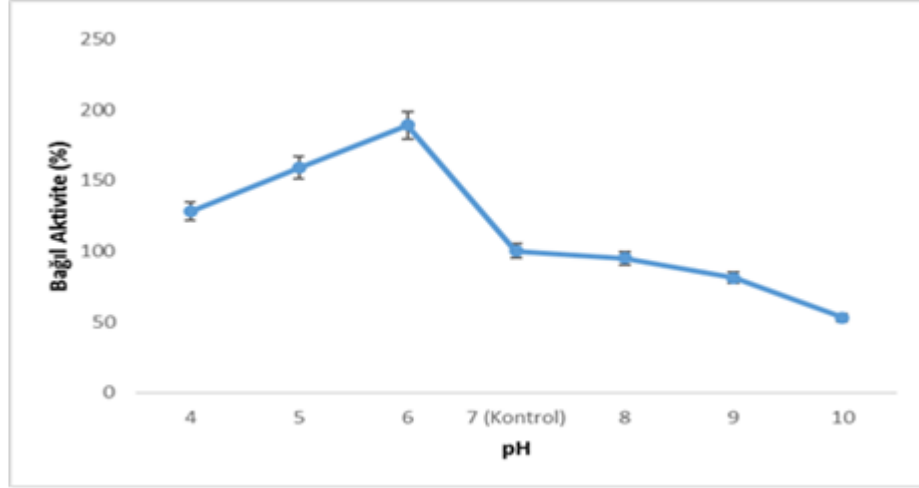
Lipaz enziminin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla enzim 4.0- 10.0 arası pH'larda hazırlanan substrat çözeltilerinde aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sırasında pH 7.0'de elde edilen sonuçlar kontrol olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçlar buna göre % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.18 ve Şekil 4.16'da da görüldüğü gibi enzimin optimum pH değerinin 6.0 olduğu saptanmıştır. Enzim bu pH değerinde %89'luk bir aktivite artışı göstermiştir. En düşük pH olan 4.0'de de enzim aktivitesinde %28'lik bir artış elde edilmiştir. Enzimin asidik ortamdan yüksek aktiviteye sahip olduğu saptanırken, alkali ortamda aktivitede düşüşler gözlenmiştir.

Çizelge 4.22. pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi

pH	Bağıl Aktivite (%)
4.0	128
5.0	159
6.0	189
7.0 (Kontrol)	100
8.0	95

Çizelge 4.23. pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi (Devam)

9.0	81
10	53

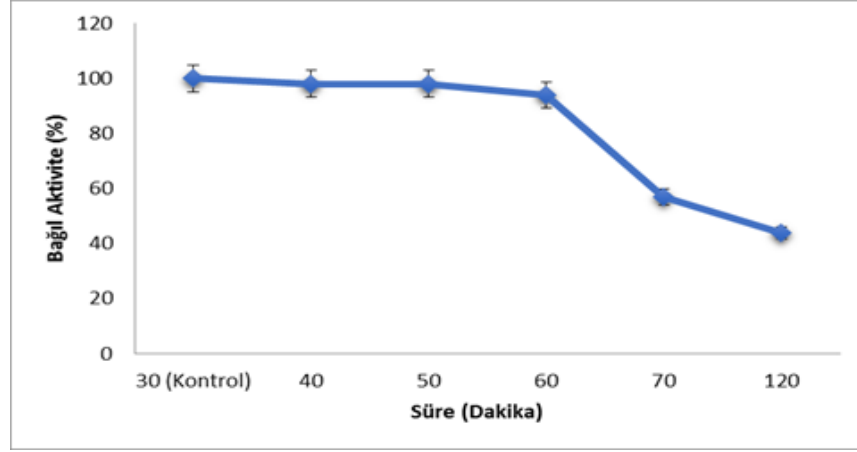


Şekil 4.16. pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi

Lipaz enziminin pH stabilitesini belirlemek amacıyla enzim pH 6.0'da 120 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Enzim 60 dakika boyunca aktivitesini korurken, sürenin artması ile 120 dakika sonunda %44 oranında kayıp olduğunu saptanmıştır (çizelge 4.19, Şekil 4.17).

Çizelge 4.24. pH stabilitesinin lipaz enzimi üzerine etkisi

pH 6.0 (Dakika)	Bağıl Aktivite (%)
30 (Kontrol)	100
40	98
50	98
60	94
70	57
120	44



Şekil 4.17. pH stabilitesinin lipaz aktivitesi üzerine etkisi

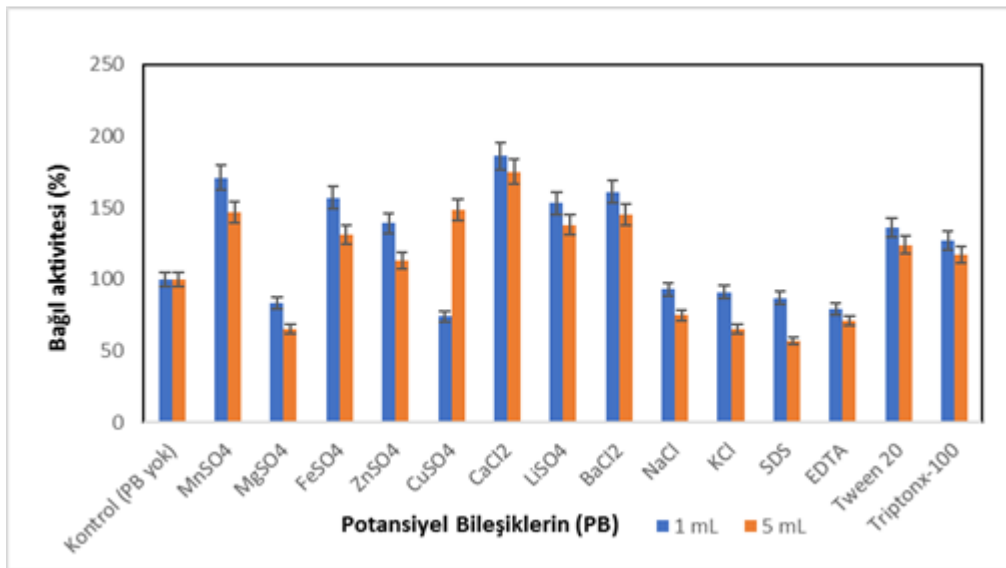
4.8.3. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisini tespit etmek üzere enzim 1 ve 5 mM MnSO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , CaCl_2 , LiSO_4 , BaCl_2 , NaCl , KCl , SDS, EDTA, Triton X-100 ve Tween 20 gibi farklı bileşenlerle inkübe edilmiştir. Hiçbir potansiyel bileşik bulunmayan substrat çözeltisi ile elde edilen aktivite kontrol olarak kullanılmış ve elde edilen değerler buna göre % olarak hesaplanmıştır (çizelge 4.20).

1 mM konsantrasyonundaki potansiyel bileşikleri varlığında enzim aktivitesinin 5 mM'a göre daha fazla artırttığı tespit edilmiştir. Bununla beraber CaCl_2 , MnSO_4 ve BaCl_2 iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkili bir şekilde aktivatör etki yaptığı, bu metalleri FeSO_4 , LiSO_4 ve ZnSO_4 izlerken, diğer metal iyonlarının inhibitör etki yaptığı saptanmıştır. Noniyonik bir deterjan olan Tween 20 ve noniyonik bir sürfektan olan Triton X-100 varlığında da enzim aktivitesinde artış olmuştur. Ancak anyonik bir deterjan olan SDS ve şelatlayıcı ajan olan EDTA ise enzim aktivitesini inhibe etmiştir (çizelge 4.20).

Çizelge 4.25. Potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesine etkileri

Potansiyel bileşiklerin	Bağlı aktivite (%)	
	1mM	5mM
Kontrol (potansiyel bileşik yok)	100	100
MnSO ₄	171	147
MgSO ₄	83	65
FeSO ₄	157	131
ZnSO ₄	139	113
CuSO ₄	74	148
CaCl ₂	186	175
LiSO ₄	153	138
BaCl ₂	161	145
NaCl	93	75
KCl	91	65
SDS	87	57
EDTA	79	71
Tween 20	136	124
Trypton X-100	127	117



Şekil 4.18. Potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesine etkileri

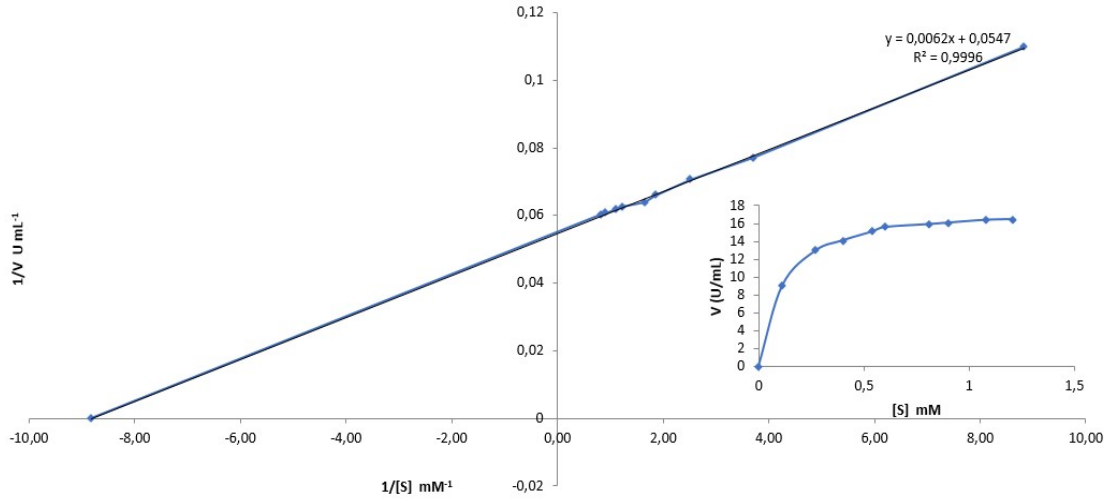
4.8.4. Enzim Aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Lipaz aktivitesi üzerine substratın konsantrasyonunun etkisi saptamak amacıyla 0,1-1,2 mM arasındaki konsantrasyonlarda tribütirin optimum sıcaklık ve pH'da (37 °C ve pH 7.0) belirlenen inkübasyon süresinde ortama ilave edilerek enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçülmüştür (çizelge 4.21).

Çizelge 4.26. Lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Enzim Aktivitesi (U/mL)
0,1	9,1
0,2	13
0,4	14,1
0,5	15,1
0,6	15,6
0,8	16
0,9	16,1
1,0	16,4
1,2	16,5

Substrat konsantrasyonunun %0,1'den itibaren bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin kademeli olarak arttığı görüldü. Lipazın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak Lineweaver-Burk $y = ax + b$ doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak çizildi (şekil 4.19). Bu grafikten elde edilen doğrunun denklemi ise, $y = 0,0062x + 0,0547$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise $R^2 = 0.9996$ bulundu. Denklemden doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0,055$ değerini verdiğinden, V_{max} değeri 18,28 U/mL olarak hesaplandı, K_m değeri 0,11 mM olarak bulundu.



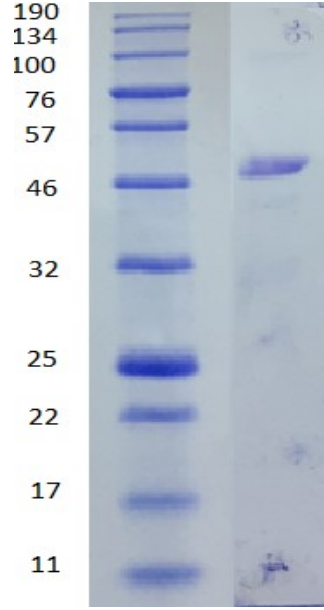
Şekil 4.19. Lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği ve Michaelis-Menten Grafiği).

4.8.5. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti

Kısmi olarak saflaştırılan enzim örneğinin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla, elektroforez jeline enzim örneği yanında moleküler ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisi de uygulanmış ve elektroforez işlemi sonucunda oluşan bantların (şekil 4.20) Rf değerlerinden yararlanılarak aşağıda verilen formüle göre enzim ve standart protein çözeltisinin göreceli hareketlilik değerleri hesaplanmıştır.

$$R_f = \frac{\text{Proteinin aldığı yol (cm)}}{\text{İzleme boyasının aldığı yol (cm)}}$$

Moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinlerin göreceli hareketlilik değerleri ve moleküler ağırlıkları ile bir standart eğri elde edilmiştir (şekil 4.20). Elde edilen grafiğin analizi yapılarak, örneğin moleküler ağırlığı saptanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi, diyalizat ve ultrafiltrasyonu sonucunda adım adım kısmi olarak saflaştırılan enzim örneğinin moleküler ağırlığının aynı olduğu, şekil 4.20’de görüldüğü gibi tek bir bant halinde bir sırada yerleştiği saptanmıştır. Koyu bant halinde görülen enzimin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 47 kDa olduğu tespit edilmiştir.



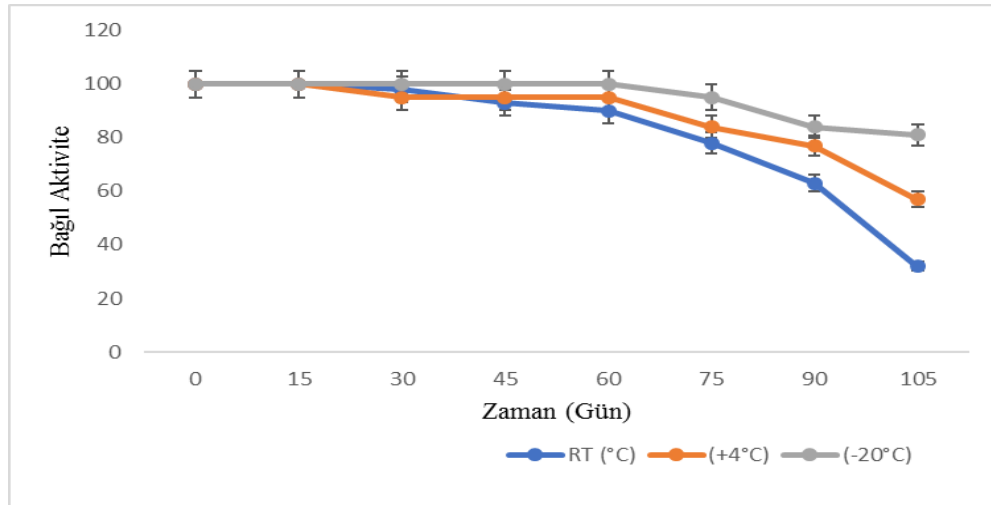
Şekil 4.20. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bant görünümü

4.9. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi

Ham enzimin depolanma sıcaklığını saptamak üzere bakteriden üretilen ham enzimin aktivitesi tayin edildikten sonra enzim örnekleri 50 mL olacak şekilde oda sıcaklığında (RT), +4 °C' de ve -20 °C' de olmak üzere 3 ayrı gruba ayrılmış ve her 15 günde bir aktivitelerine bakılarak depolama stabilitesi belirlenmiştir. Yapılan çalışmada oda sıcaklığında (RT) ve +4°C'de 60 gün sonra enzimin aktivitesi hemen hemen korunurken, bu süre -20 °C'de 75 güne kadar bulunmuştur. Sürenin artması ile enzim aktivitesinde düşüşler gözlenmiştir. En iyi korunmanın -20 °C'de olduğu saptanmış ve 105 günde sadece %81 oranında aktivite korunmuştur. En fazla kayıp ise oda sıcaklığındaki depolamada olmuştur (çizelge 4.22 ve şekil 4.21).

Çizelge 4.27. Ham enzimin depolanma stabilitesi

Zaman (Gün)	Oda Sıcaklığı (RT)	+4°C	-20°C
	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Aktivite (%)
0	100	100	100
15	100	100	100
30	98	95	100
45	93	95	100
60	90	95	100
75	78	84	95
90	63	77	84
105	32	57	81



Şekil 4.21. Farklı sıcaklıkta ham enzimin depolanma stabilitesi

4.9. Lipaz nzyminin Deterjan Endüstrisinde Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi

4.9.1. Lipazın sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi

Liyofilize edilmiş lipazın aktivitesine deterjan katkı maddelerinin etkisinin incelenmesi amacıyla %1 ve %5 konsantrasyonlarda olacak şekilde Triton X-100, EDTA, SDS ve H₂O₂ ilave edilerek, 100 rpm, 55 ve 65°C koşullarında 1 saat süresince lipaz enzimi bu deterjan katkı maddeleri ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında lipaz enziminin aktiviteleri ölçülmüştür. Lipaz aktivitelerindeki değişim, başlangıç aktivitelerine göre hesaplanarak bağıl aktivite (%) olarak verilmiştir çizelge 4.23)

Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin başlangıç aktivitesine göre; 65°C’de %5 SDS içeren ortamda enzim aktivitesinin %22 oranında arttığı görülmüştür. 55 ve 65 °C’lerde denenen tüm katkı maddeleri varlığında enzim aktivitesini korumuştur. Enzimin katkı maddeleri varlığından etkilenmediği sonucuna ulaşılmıştır. Hatta enzimin bu katkı maddeleri varlığında aktivitesinin az da olsa arttığı saptanmıştır.

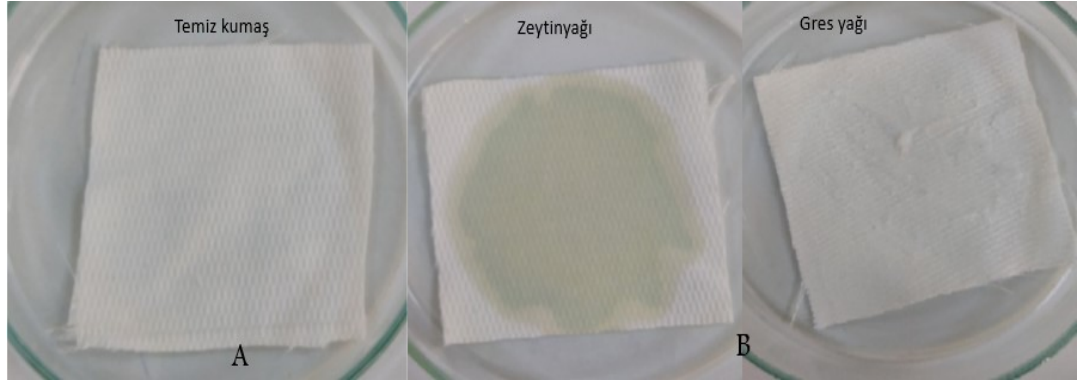
Çizelge 4.28. Liyofilize edilmiş lipaz enzimi aktivitesine farklı sıcaklık ve farklı ve farklı konsantrasyonlardaki deterjan katkılarının etkisi

Deterjan Katkı Maddesi	55°C’de Bağıl Aktivite (%)		65°C’de Bağıl Aktivite (%)	
	%1	%5	%1	%5
SDS	100	108	113	122
Triton X-100	111	103	113	116
H ₂ O ₂	113	103	108	106
EDTA	103	113	113	113

Başlangıç aktivitesi %100 ‘dür.

4.10. Kirletilmiş Kumaşlara Lipaz Uygulanması

Liyofilize lipaz enziminin zeytinyağı ve gress yağı ile kirletilmiş kumaşlardaki (şekil 4.22) etkisini saptamak üzere oluşturulan deney seti sonucunda, işlem uygulanmamış kumaş örnekleri standart kabul edilerek enzim ve deterjan uygulamaları sonrası meydana gelen beyazlık derecesindeki değişimler renk ölçüm spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Standart ve numuneye ait “Beyazlık” indeksileri karşılaştırılmıştır.

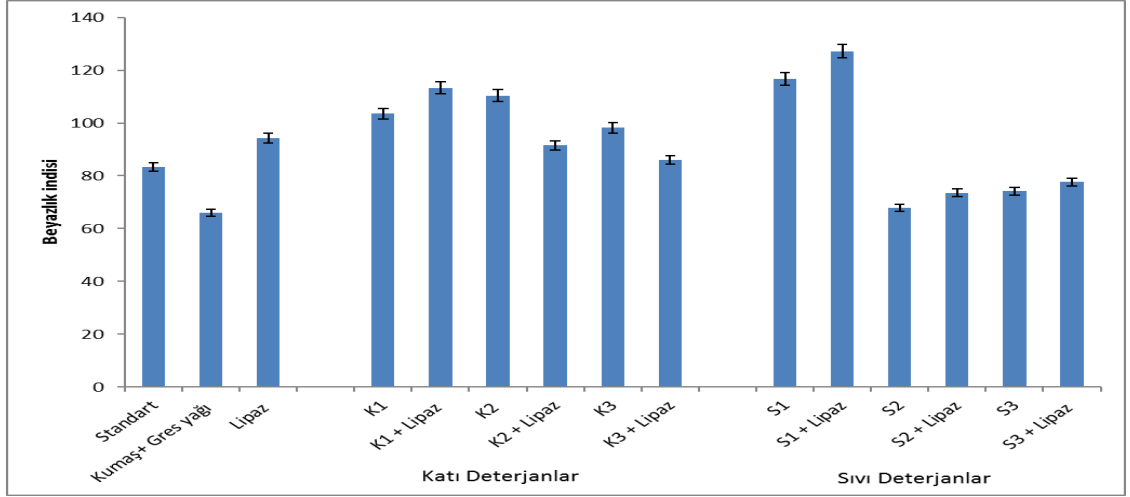


Şekil 4.22. A) Kirlenmemiş kumaş, B) Zeytinyağı ve Gres yağı ile kirlenmiş kumaşlar

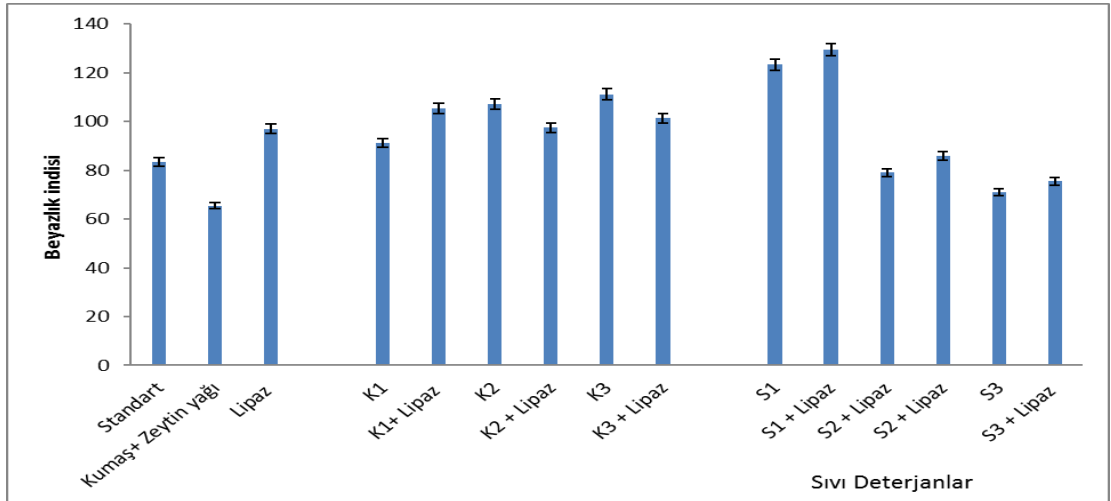
Çalışma sonucu elde edilen veriler çizelge 4.23’de verilmiştir. Hiçbir işlem uygulanmamış kumaştan elde edilen beyazlık indeksi değeri (83,3) standart olarak alınmış ve sonuçlar buna göre değerlendirilmiştir. Kumaş gres yağı (şekil 4.23) ve zeytinyağı (şekil 2.24) ile kirlendikten sonra yapılan ölçüm ile lipaz uygulandıktan sonra yapılan ölçümlerle kıyaslandığından %41-42 oranında beyazlık indisi saptanmıştır. Bu da lipaz enziminin etkili olduğunu göstermiştir. Lipaz enzimi katı deterjanlardan daha çok sıvı deterjanlarla birlikte uygulandığında etkili olduğu saptanmıştır. Gerek katı gerekse sıvı deterjanlar tek başlarına uygulandığında elde edilen beyazlık indisindeki artış enzim ile birlikte kullandığında da artmıştır. Her iki kirleticisi için en iyi etki S1+lipaz uygulanmasında elde edilmiştir (şekil 4.23, şekil 2.24). Diğer yandan enzim, bazı deterjanların ve bazı deterjan+enzim uygulamalarından elde edilen beyazlık indisi standart indise göre de artış göstermiştir.

Çizelge 4.29. Farklı kirleticiler elde edilen liyofilize lipaz enziminin uygulandığı kumaşlarda beyazlık indeksi ölçümleri

	Beyazlık indeksi			Beyazlık indeksi	
	Gres yağı	Zeytin yağı		Gres yağı	Zeytin yağı
Standart (işlem uygulanmamış kumaş)	83,3	83,3	Standart (işlem uygulanmamış kumaş)	83,3	83,3
Kontrol (Kirlenilmiş kumaş)	65,4	66,6	Kontrol (Kirlenilmiş kumaş)	65,4	66,6
Lipaz	92,9	94,0	Lipaz	92,9	94,0
Katı Deterjanlar	Beyazlık indeksi		Sıvı Deterjanlar	Beyazlık indeksi	
K1	102,8	87,8	S1	114,5	128,5
K1 + Lipaz	107,9	100,0	S1 + Lipaz	126,0	131
K2	111,3	110,	S2	67,7	78
K2 + Lipaz	91,9	100	S2 + Lipaz	73,0	88
K3	96,0	112	S3	74,1	70
K3 + Lipaz	85,2	103,6	S3 + lipaz	77,3	73



Şekil 4.23. Gres yağı ile kirlenmiş kumaşlara farklı deterjan, deterjan+enzim uygulaması sonrası elde edilen beyazlık indeksi değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.24. Zeytinyağı ile kirlenmiş kumaşlara farklı deterjan, deterjan+enzim uygulaması sonrası elde edilen beyazlık indeksi değerlerinin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücrel yapılar için önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler çok çeşitli biyolojik kaynaklardan üretilmektedirler (Anonim 2014). Günümüzde biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ile üretilen ticari öneme sahip ürünlerin başında enzimler gelmektedir. Endüstriyel enzimlerle ilgili yapılan araştırmalar ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle önem kazanmıştır. Lipazlar endüstride geniş uygulama alanı bulan biyokatalizörlerdir. Bu enzimler mantar, maya, bakteri, hayvan ve bitki kaynaklı olabilir. Lipaz üretimine yönelik çalışmalar geçmişten günümüze devam etmekle birlikte yeni geliştirilecek tekniklerle üretimin arttırılmasına yönelik yeni araştırmalara ihtiyaç vardır. Her bir endüstriyel uygulama spesifik özellikte enzimlere ihtiyaç duyduğu için spesifik özellikte lipaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesi gerekmektedir. Özellikle mikroorganizmaların lipaz üretim kapasitelerinin geliştirilmesi için optimal ortam koşullarının ve üretimi arttırıcı etki eden çeşitli faktörlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (Gül 2013).

Lipazların kullanım alanları çok geniştir. Gıda, deterjan ve farmasötik endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Houde ve ark. 2004). Ayrıca, yüksek seçicilik avantajına sahip olan lipazlar polifenol ve poliestere gibi polimerlerin sentezini katalizlemek için kullanılırlar. Çoklu reaktif gruplara sahip yapısal olarak karmaşık monomerler, farklı kaynaklardan elde edilen ticari lipazlar kullanılarak yüksek verimle polimerleştirilirler. Lipazlar, özellikle deterjan sanayiinde büyük önem taşımaktadırlar ve ticari mutfaklardaki yağ filtrelerindeki yağların uzaklaştırılması, boruların yüzeyindeki yağların temizlenmesinde kullanılmaktadır. Lipitlerin ve sıvı yağların serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizinde 250°C'lik bir ısı ve 60 barlık bir basınç kullanılmakta bu ise maliyeti arttırmaktadır. Bunu yerine son yıllarda maliyeti düşük olduğu için mikrobiyal lipazlar kullanılmaktadır (Svendsen 2000).

Bu çalışmada doğal kaynaklarımız olan toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* sp. suşlarından lipaz enzimi üretim kapasiteleri kalitatif olarak taranmış ve 341 *Bacillus* sp. suşlarından 141 *Bacillus* sp. suşunun lipaz potansiyeli belirlenmiştir. Bunlar içinde en yüksek lipaz üretimine EI 2 ve 16 mm zon çapı ile Konya ilinden izole edilen *Bacillus* sp. suşu 16S rRNA dizi analizi ile tür düzeyinde tespit edilmiş ve *Bacillus cereus* ATA179 olarak adlandırılmıştır. Bu bakterinin en iyi geliştiği besiyeri saptanmış ve bu besiyerinin besinsel ve fiziksel optimizasyonu sonucu yeni bir modifiye ortam geliştirilmiştir. Enzim kısmi saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca enzimin deterjan sanayiinde potansiyel gücü araştırılmıştır.

Lipaz enzim üretiminin teşvik edilmesi, bakterinin bulunduğu ortamdaki besi maddelerine bağlı olduğundan farklı içerikli 3 besiyeri kullanılmış ve en iyi enzim üretimi Kumar ve ark. (2005) tarafından önerilen besiyerinde elde edilmiştir. Bu besiyerinde enzim üretimi 48. saatte 6,6 U/mL olarak saptanmıştır. Üreme ise 40. saatte elde edilmiştir.

Çalışmamızda, iyi enzim üretim ortamı olarak belirlediğimiz besiyeri 3'te, bakterinin üreme zaman aralığı geniş tutulmuştur. En iyi zon gösteren *Bacillus cereus* ATA179'in maksimum enzim üretim zamanı ve bakterinin üremesini belirlemek amacı ile 16., 24., 48., ve 72. saatlerde enzim aktivite ve O.D. tayinleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda *Bacillus cereus*'ATA179'in üreme grafiği incelendiğinde maksimum enzim üretiminin logaritma fazın olduğu ve bu fazın sonuna kadar aktiviteyi koruduğu saptanmıştır. Bakterinin maksimum enzim üretiminin 48. saatte 6,6 U/mL olarak gerçekleştiği ve bu aktivitenin 48. saatten sonra düşmeye gözlenmiştir. En yüksek üreme O.D'si ise 40. saatte 1,6 olarak belirlenmiştir. Maksimum enzim üretiminin durağan fazda olduğu saptanmıştır. Enzim üretiminin ve bakteri üremesinin paralel olmadığı belirlenmiştir.

Doğadan lipaz enzimin izolasyonu birçok araştırmacı tarafından başka doğal kaynakları kullanılarak araştırılmıştır.

Veerapagu ve ark. (2014) izole ettiği 200 bakteriyel lipazdan 32'sinin yüksek lipolitik aktivite (> 50 mm), 10'unun orta lipolitik aktivite (25 ila 50 mm'nin altında), 53'nün düşük lipolitik aktivite (<25 mm) ve 5 tanesinin lipolitik göstermediğini kalitatif olarak göstermiştir. Diğer yanda Bhosale ve ark. (2016) yaptığı bir çalışma, Hindistan'ın çöl

bölgelerinde farklı topraklarından izole edilen *Bacillus sonorensis* 4R tribütirin agar kullanılarak hidrolitik zon tespit edilmiş ve en iyi hidrolitik zon 28 mm bulunmuştur. Bu bakteri Broth besiyerinde 80°C’de 4 gün inkübasyon sonra enzim üretmesi 51,33 U/mL olarak elde edilmiştir.

Sharma ve ark. (2017) *Bacillus methylotrophicus* PS3 ile lipaz üretimini 24 saatlik 37°C’de inkübasyon sonrası saptamışlardır. Enzim tribütirin ortamda 13,61 mm hidrolitik zon göstermişlerdi. Maksimum enzimi üretimde %10 inokülasyon miktarı 60 saatten sonra (127,31 U/mL) bulunmuştur. Gupta ve arka. (2004) yapılan çalışmalarda lipaz enzim üretimlerinin farklı saatlerde elde edildiği rapor edilmiştir. *Bacillus sp.* RSJ1’den 12. saatte (Sharma ve ark. 2002), *B. thermocatenulatus*’den 16. Saatte (Schmidt-Dannert ve ark. 1997) maksimum lipaz üretimi elde edilirken, *Bacillus sp.*’den, *B. cereus* ve *B. coagulans*’ta 72 saatte maksimum lipaz üretimi (Hanna ve Sarkar ve ark. 1998, Layla 1997), *Pseudomonas spp*, *P. fragi* ve *P. fluorescens* BW 96CC’den 96. aatte elde edilmiştir (Dong ve ark. 1999, Pabai ve ark. 1996).

Maya ve Diana (2011), yaptığı çalışmada fermantasyon koşulu optimizasyonunun bir sonucu olarak *G. stearothermophilus* 5 ‘den 24 saat sonra 176,6 U/mL hücre dışı maksimum lipaz aktivitesi saptamıştır (Berekaa ve ark. 2009). *B. coagulans* hücreleri ile maksimum lipaz verimi, 0,2 U/mL olarak bulunmuştur (Kumar ve Valsa 2007). 48 saat inkübasyondan sonra, *B. licheniformis* MTCC 6824 13,6 U/mL lipaz (pNP palmitat) elde edilmiştir (Chakraborty ve Raj 2008). *G. thermoleovorans* CCR11, 6000 U/mL lipaz aktivitesi (pNP laurate) saptanmıştır (Castro-Ochoa 2005).

Hanna ve Layla (1997) *B. cereus* ve *B. coagulans* bakterilerinden lipaz üretimini 3 günde maksimum olarak üremenin logaritmik fazın sonunda elde etmişlerdir. Üretim ortamı içeriği enzim üretimi üzerinde artırıcı bir etkiye sahiptir (Gulati ve ark. 2007). Kültür ortamının içeriği ve fermantasyon koşulları enzim üretimini etkileyen önemli faktörlerdir. Kültür ortamı özellikle karbon ve azot kaynakları bakterilerde enzim indüksiyonunda önemli bir rol oynar ve enzim üretimi üzerinde çarpıcı bir etkiye sahiptir (Elibol ve Ozer 2001). Lipaz aktivitesinin ekspresyonu için ana faktör her zaman lipazlar uyarılabilir enzimler olduğundan ve bu nedenle genel olarak yağ gibi bir lipid kaynağının varlığında veya triasilgliseroller, yağ asitleri, hidrolize edilebilir esterler, aralar, safra tuzları ve gliserol gibi başka herhangi bir uyarıcı varlığında

üretildiği için karbondur. Bununla birlikte, bunların üretimi, şekerler, polisakaritler, peynir altı suyu ve diğer karmaşık kaynaklar gibi diğer karbon kaynaklarından önemli ölçüde etkilenmektedir. Karbon kaynağının yanı sıra, ortamdaki azot kaynağının tipi de üretim ortamındaki lipaz üretimi üzerine etki etmektedir.

Bu çalışmada da besinsel faktörler ele alınmış ve en iyi karbon kaynağı olarak sukroz bulunmuştur. Sukroz bulunan besiyerinde lipaz aktivitesinde ana suşa göre %21 verim artışı elde edilmiştir. En yüksek enzim aktivitesinin inorganik azot kaynağı $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (diamonyum fosfat) olarak tespit edilmiştir. Bu azot kaynağı varlığında ATA179 şuşu ana suş ile kıyaslandığında %86 oranında bir verim göstermiştir. Organik azot kaynağı olarak yeast ekstrakt varlığında ise %7 oranında enzim verimi sağlanmıştır. Metal iyonun etkisini saptamak üzere yapılan çalışmalarda kontrol ortamında birlikte bulunan CaCl_2 ve NaCl ayrı ayrı denemeye alınmış, ancak enzim üretiminde CaCl_2 tek başına kullanıldığında verimli bir etkiye sahip olduğunu saptanmış ve bu suşta ana suşa göre %21 oranında enzim üretimi saptamıştır. Denemeye alınan azot kaynaklarından inorganik azot kaynakları, KNO_3 hariç, organik azot kaynaklarına göre daha etkili olduğu ifade edilebilir. Yaptığımız çalışmada inorganik azot kaynağı varlığında lipaz üretiminin fazla olmasının nedeni, besi ortamında bulunan diğer bileşenlerle amonyum tuzlarının pozitif etkileşime girdiği düşünülebilir.

Fermantasyon koşullarının etkisine bakıldığında en iyi enzim verimi için sıcaklık 45°C olarak saptanmıştır ve ana suşa göre enzim üretimi %30 artış göstermiştir. Optimum pH değeri 7.0 olarak bulunmuş ve alkali pH'da enzim üretiminin oldukça düştüğü belirlenmiştir. Enzim nötral karakterde olduğu tespit edilmiş ve ana suşa göre hiç verim artışı saptamıştır. Havalandırma etkisi ise 50 rpm çalkalama hızında en iyi enzim verimini göstermiş ve ana suşa göre %7,5 verim artışı saptanmıştır. İnokülasyon miktarının artmasının enzim verimi üzerinde etkili olmadığı saptanmış ve %7 kullanıldığında en iyi enzim üretimini sağlamıştır. %7 inokülasyon bakıldığında ana suşa göre %4,5 verim artışı göstermiştir. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği inokülasyon süresi 24. saat olarak belirlenmiştir. Bu inokülasyon süresinde enzim aktivitesi kontrole kıyasla %10,6 oranında az bir artış göstermiştir. İnokülasyon yaşının artması ile üremede ve enzim üretiminde azalmalar saptanmıştır.

Çeşitli araştırmacılar lipaz üretimi üzerine besinsel ve fiziksel faktörlerin etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmalar neticesinde birbirinden farklı sonuçlar rapor etmişlerdir.

Lipaz üretimi, %2 zeytinyağı ve nişasta ile indüklenmiş, 24 saat sonra 37°C'de ve nötr pH'ta maksimum enzim elde edilmiştir (Alkan ve ark. 2007).

Kumar ve ark. (2012) *Bacillus* MPTK 912 sp. tarafından lipaz üretiminde en iyi koşullar; karbon kaynağı glikoz, azot kaynağı pepton, metal iyonları Fe^{2+} ve Mg^{2+} , potansiyel bileşikler Triton X-100, Tween esterleri, pH 8.0 ve sıcaklık 35°C olarak saptanmıştır.

Sirisha ve ark. (2010) lipaz üretimi için en iyi azot kaynağı olarak peptonu bildirmişlerdir.

Dong ve ark. (1999) bazı bakteri türlerinde amonyum klorür ve amonyum dihidrojen fosfat gibi inorganik azot kaynaklarının da etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Behera ve ark. (2019) *Staphylococcus hominis* MTCC 8980 optimize edilmiş pH, sıcaklık ve çalkalama hızı sırasıyla 79, 33,1°C ve 178,4 rpm olarak bulmuşlardır.

Bharathi (2018) *Bacillus* sp. 'den maksimum lipaz üretimini pH 6.0 ve 37°C'de elde ederken, Larbidaouadi ve ark. (2015) pH 8.0 ve 40 C'de elde etmişlerdir (1,5 U / ml).

Suci ve ark. (2018) *Bacillus subtilis* ile yaptıkları çalışmada lipaz üretimi 84 saat fermentasyon ile 30°C'de maksimuma ulaşmıştır (4,72 U/mL). Yeni bir modifiye ortam oluşturmuşlar ve lipaz aktivitesi %5 aşılama, %0,5 maya özütü, %0,25 zeytinyağı ve 10 mM Ca^{2+} varlığında 4,96 U/mL olarak saptanmıştır.

Bacha ve ark. (2016) *S. aereus*'un lipaz üretiminde en iyi karbon kaynağı olarak ksilozu, azot kaynağı olarak maya özütü kullandığını rapor etmişlerdir. Diğer yandan *B. coagulans* BTS3 suşunun karbon kaynağı olarak hardal yağı varlığında ve azot kaynağı olarak pepton ve maya ekstartı varlığında 55°C'de pH 8.5'da 48.saatte maksimum enzim üretimini 1,16 U/mL ile bildirmişlerdir (Kumar ve ark. 2005).

Kumar ve ark. (2005) *Bacillus coagulans* BTS-3'den lipaz üretimi için en uygun koşul olarak pH 8.5, 55°C, 48 saat, karbon kaynağı olarak hardal yağ ve azot kaynakları olarak bir pepton ve maya ekstraktı kombinasyonu saptanmış ve bu koşullarda enzim aktivitesi 1,16 U/mL olarak tayine dılmıştır.

Maya ve ark. (2011) karbon kaynağı olarak glukoz'un değişik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. Glukoz, *B. licheniformis* H1, *Bacillus sp.* GK 8 ve SB-3 hücreleri (Dosanjh ve Kaur 2002, Bradoo ve ark. 1999, Horani 1996), *G. stearothermophilus* SB-1 ve L1 (Ahn ve ark. 2003) ve diğer bazı suşların lipaz üretimini uyarken; *B. alcalophilus* B-M20 (Ghanem 2000), *Bacillus megaterium* AKG-1 (Sekhon ve ark. 2006), *Bacillus sp.* suşu L2 ve 42 (Shariff ve ark. 2007, Eltaweel ve ark. 2005), *B. subtilis* (Mormeneo ve ark. 2008, Takac ve Marul 2008) ve *G. thermoleovorans* ID1 (Lee ve ark.1999) suşlarından lipaz üretimini inhibe ettiği saptanmıştır. Gliserol de *B. subtilis* ve *G. stearothermophilus* strain-5 hücrelerinde (Sifour ve ark. 2010, Berekaa ve ark. 2009, Lesuisse ve ark. 1993), lipaz üretimini arttırmıştır. Bazı durumlarda trigliseritlerin hidroliz ürünlerinin lipaz üretimini üzerine negatif etkileri de ortaya çıkmaktadır (Abada 2008, Horani 1996). *Bacillus sp.* 'den elde edilen lipaz yağlar tarafından zayıf bir şekilde indüklenmiştir, ancak ekspresyonu şekerler ve şeker alkolleri, özellikle galaktoz, laktoz, gliserol ve mannitol ile uyarılmıştır (Gupta 2004).

El-Batal ve ark. (2016) *Aspergillus niger* tarafından maksimum lipaz üretimi 24°C'de, pH 7.0'de ve 72 saat inkübasyondan sonra gözlemlenmiştir. Zeytinyağı ve maya özütü etkili olarak bulunmuştur. En iyi çalkalama değeri olarak ise 200 rpm saptanmıştır.

Abbas ve ark. (2017) *Bacillus subtilis* PCSIR NL-38 suşu ile yaptıkları çalışmada ve kolza tohumu yağı varlığında statik koşullar altında 96 saat te, 40°C'de, pH 7.0'de, en iyi kaynaklar olarak glukoz ve inorganik azot NH₄N₃ varlığında %7 inokulum miktarı ile üretim sonucunda maksimum lipaz üretimi elde edilmiştir (8,8 U/mL).

Begam ve ark. (2012), Iftikhar ve ark. (2003) inokülüm miktarını %2,5 ve %3,0 olarak rapor etmişlerdir. Sekhon ve ark. (2006) enzim üretim pH'sı olarak 6.5-8.0 aralığını belirtirken, Begam ve ark. (2012) pH 6.0-9.0 aralığını göstermişlerdir.

Duza ve Mastan (2014) *Bacillus thuringiensis* (TS11BP)'den en iyi lipaz üretiminin pH 8.0'de, 45°C'de, %14 inoküm miktarı ile 96 saatte olduğunu, karbon kaynağı olarak dekstrozu varlığında 1,89 U/mL aktivite elde ederlerken ve azot kaynağı olarak Beef extract varlığında 2,59 U/mL aktivite tayin etmişlerdir. Pallavi ve ark. (2014) ise *Bacillus subtilis* Y-IVI suşu için nişastanın ve peptonun en iyi kaynaklar olduğunu ifade etmişlerdir.

Mazhar ve ark. (2017) *B. subtilis* PCSIRNL-39'un lipaz üretiminde elde ettiğimiz sonuca benzer olarak sukroz varlığında maksimum verim elde ederlerken, azot kaynağı olarak peptonu en iyi olarak bulmuşlardır. Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'nin enzim üretimi iyi uyarıcı etkisi olduğunu, en iyi sıcaklık olarak 45°C ve pH olarak 7.0, %5 inokülüm miktarının optimal olarak rapor etmişlerdir. Pepton ve maya özütü gibi bazik organik azotlar, tercihen lipaz için azot kaynağı çeşitli *Bacillus sp.* suşlarında örneğin; *Bacillus* suşu A30-1, *B. alcalophilus*, *B. licheniformis* suşu H1, farklı *pseudomonas* (viz. *pseudomonas sp.*, *P. fragi*, *P. fluorescens* BW 96CC) ve *Staphylococcus haemolyticus* (Lanser ve ark., 2002, Sharma ve ark., 2002, Oh ve ark. 1999, Ghanem ve ark. 2000) tripton ve *S. haemolyticus* için maya ekstresi kullanılmıştır.

Songs ve ark. (2001) *Candida rugosa*'dan optimum lipaz üretimi için azot kaynağı olarak amonyum nitrat olduğunu bildirmiştir. Markossian ve ark. (2000), *B. thermoleovorans* için ise maya özütünü rapor etmişlerdir. Niyonzima ve ark. (2013) *Bacillus flexus* XJU-1 tarafından lipaz üretim ortamını optimize etmek için çalışmalar yapmış ve maksimum enzim üretimini 36 saatte, 37°C'de, pH 11.0 'de, %2 inokülüm miktarında, en iyi karbon kaynağı olarak rafine pamuk tohumu yağı ve en iyi azot kaynağı olarak maya özütü kullandıklarında elde etmişlerdir.

Farklı *Bacillus* türlerinde yapılan çalışmalarda optimum üretim pH'sı 7.5-10.6 (Bora ve Bora 2012, Tambekar ve Dhundale 2012), sıcaklık olarak ise 50 derecenin üzerinde enzim üretimin olmadığı, düşük sıcaklıklarda lipaz üretimin optimal olduğu rapor edilmiştir. Achamma ve ark. (2003) *Bacillus licheniformis* MTCC'de, Chakraborty ve Raj (2008) ve *Bacillus tequilensis* NRRL B41771 (Bonala ve Mangamoori 2012) optimal lipaz üretimi için %1 aşılama miktarı bildirilmiştir. Buna karşın *Bacillus*

pumilus'un maksimum lipaz üretimi %10 daha yüksek bir aşılama miktarı saptanmıştır (Heravi ve ark. 2008).

Niyonzima ve ark. (2013) belirgin bir moleküler ağırlığa sahip SDS-PAGE 16.1 kDa. Bazı durumlarda, optimum lipaz üretimi için metal iyonları da gerekmektedir (Maya ve ark. 2011). *Bacillus sp.* besi ortamında Demir iyonlarının da ilave edilmesi gerekli olduğu gösterilmiştir (Eltaweel ve ark. 2005). Buna karşılık, *Bacillus sp.* L2 lipaz Mg^{2+} iyonları tarafından tamamen inhibe edilirken, Ca^{2+} ve Fe^{3+} ilavesi yüksek lipaz aktivitesi ile sonuçlanmıştır (Shariff ve ark. 2007). 0.5 konsantrasyondaki sodyum iyonları *Bacillus koagulan*larında lipaz üretimini uyarmıştır (Kumar ve Valsa 2007).

Bacillus sp. THL027 (Dharmsthiti ve Luchai 1999), *Geobacillus sp.* Tp10A.1 (Sunna ve ark. 2002), *G. thermoleovorans* suşları (DeFlaun ve ark. 2007, Markossian ve ark. 2000), *B. pumilus* B106 (Zhang ve ark. 2009) ve *B. licheniformis* MTCC-6824 (Chakraborty ve Raj 2008) kültür ortamında daha yüksek NaCl konsantrasyonuna ihtiyaç duymuştur. *B. alcalophilus* B-M20 %7,5'e kadar tuzluluk oranını tolere edebilmekte, ancak yüksek NaCl ve KCl konsantrasyonları lipaz üretimini inhibe etmektedir (Ghanem ve ark. 2000). Bazı *G. thermoleovorans* suşları ve *G. zalihae* (Rahmanve ark. 2007) lipaz üretimi için hafif asidik ortamda (pH 6.0-6.5) (DeFlaun ve ark. 2007), en uygun şekilde üretilmişlerdir. *B. alcalophilus* B-M20'deki lipaz üretimi için optimum pH 10.6'dır ve nötr ortamda hiçbir hücre üremesi tespit edilmemiştir (Ghanem ve ark. 2000). *Bacillus sp.* RSJ-1 hücreleri pH 9.0'da lipaz üretmiştir (Sharma ve ark. 2002).

Bacillus hücreleri aerobik bir ortamda büyür ve iyi havalandırma lipaz üretimini artırır, bu nedenle çalkalama da önemli bir faktördür (Ebrahimpour ve ark. 2008) Havalandırma oranının *Bacillus sp.* L2 ve *B. megaterium* AKG-1' in lipaz ekspresyon verimini etkilediği gösterilmiştir (Shariff ve ark. 2007, Sekhon ve ark. 2006) 150 rpm, hücre üremesini ve lipaz üretimini sürdürmek için optimaldir. Statik koşullar altında hiçbir lipaz üretimi saptanmazken, daha yüksek çalkalama hızı, oksidatif bir ortamda muhtemelen enzim denatürasyonuna bağlı olarak lipaz aktivitesini azaltmaktadır.

Mazhar ve ark. (2017) *B. subtilis* PCSIRNL-39'dan lipaz üretimi için optimum sıcaklık olarak 45°C bulunmuştur.

Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere farklı mikroorganizmalarla yapılan lipaz üretim verimlerindeki farklılıklar, kültür ortamı bileşiminin yanı sıra bakteri suşu özelliklerine bağlanabilmektedir. Bununla birlikte, lipolitik aktivitenin ölçülmesinin, aynı zamanda, substrata ve test reaksiyonunun deneysel koşullarına da bağlı olduğundan farklı sonuçlar elde edilmektedir. Besinsel ve fiziksel faktörlerin lipaz üretimine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçların alınması mikroorganizmaların kullandığı metabolik yolların farklı olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada en yüksek enzim üretiminin gözlemlendiği besinsel ve fiziksel faktörler kullanılarak modifiye edilen ortamda ATA179 suşu enzim üretimi açısından değerlendirilmiş olup, lipaz enziminin aktivitesi 10 U/mL olarak bulunmuştur. Bu ortamdan elde edilen değer kontrol (6,6 U/mL) ile kıyaslandığında %51,5 oranında bir enzim üretimi elde edilmiştir.

Enzimlerin karakterizasyonu yani özelliklerinin ortaya çıkarılması enzim hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bu bilgiler ise endüstride kullanılacak enzimler için oldukça değerli bilgilerdir. Enzimin karakterizasyonunda bazı parametreler dikkate alınmaktadır. Sıcaklık ve pH enzimlerin aktiviteleri üzerinde oldukça önemli olan parametrelerdir. Her enzimin optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık ve pH değeri vardır. Bu değerlerin bilinmesi enzimin endüstriyel alanlarda aktif olarak kullanılıp kullanılamayacağını göstermektedir. pH değişimleri enzimlerin konformasyonunda değişikliğe yol açmaktadır, çünkü enzimler farklı pH'larda değişik iyonik gruplar oluşturduğundan farklı pH'larda enzim aktivitesinde büyük farklılıklar ortaya çıkmaktadır (Sarkar ve ark. 1998, Cheetham 1995). Diğer yandan bazı enzimler aktivite gösterebilmek için ortamda mutlaka metal iyonlarına gereksinim duymaktadırlar. Metalik iyonlar, metalik tuz çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak enzimlerin aktivitesi ve ayrıca enzim katalitik veya bağlama bölgelerinde bulunan amino asit kalıntılarının yan gruplarına iyon bağlanma afinitesi üzerinde inhibe edici veya uyarıcı etkiye sahiptir. Endüstride kullanılan önemli enzimlerin çoğu metallo enzimlerdir. Enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri enzimin en önemli kinetiksel özellikleridir. Bu özellikler enzimin belli bir substart ile ne kadar çabuk doyuma ulaştığı (K_m) ve ulaşabildiği en hızlı (V_{max}) reaksiyonunu göstermektedir. Kinetiksel özelliklerin bilinmesi bir enzimin hücre içinde ne yaptığını ve o şartlardaki değişikliklere nasıl tepki

verdiği hakkında fikir verebilmektedir. K_m değeri düştükçe enzimin substartına olan ilgisi artmaktadır. Diğer yandan K_m değeri arttıkça enzimin substrata olan ilgisi ise düşmektedir. Düşük K_m 'e sahip enzimler substratlarına karşı yüksek affiniteye sahip olduğundan endüstride önem taşırlar.

Bu çalışma da *Bacillus cereus* ATA179'den lipaz enziminin özelliklerini belirlemek üzere enzimi kısmi olarak birkaç basamakta saflaştırılmıştır. Bunun için sırasıyla; amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemleri yapılmıştır. Enzim %5,7 verimle, 7,2 kez saflaştırılmıştır. Çalışmada kısmi saf enzim üzerine sıcaklık ve stabilitesi, pH ve stabilitesi araştırılmıştır. Aynı zamanda çalışmada çeşitli potansiyel bileşiklerin etkileri araştırılmış, enzimin K_m ve V_{max} değerleri saptanmış, molekül ağırlığı belirlenerek enzim karakterize edilmiştir.

Çalışmada ATA179 bakterisinin ürettiği lipaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 55°C olarak saptanmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi ham enzime göre %75 artmıştır. Sıcaklığın her 5 derece arttırılması ile aktivite değerleri de artmıştır. 65°C' de enzim aktivitesi %40 oranında da elde edilmiştir. 55C'de 50. dakikaya kadar aktivitesini koruduğu saptanmıştır. Enzimin ısıya dayanıklı (termostabil) karakterde olduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum pH değeri ise 6.0 olarak belirlenmiştir. Enzimin asidik ortamda alkali ortama nazaran yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, enzimin asidik pH değerlerinde aktifliğini koruması sebebiyle, enzim asidofilik bir enzim olarak belirlenmiştir. pH stabilite denemelerinde pH 6.0'da 60 dakika boyunca aktivitesini korurken, sürenin artması ile 120 dakika sonunda %44 oranında kayıp olduğunu saptanmıştır. Metal iyonları enzim aktivitesi üzerinde kafaktör olarak görev yaptığından enzim üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu çalışma da da $CaCl_2$, $MnSO_4$ ve $BaCl_2$ iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkili bir şekilde aktivatör etki yaptığı saptanmıştır. Noniyonik bir deterjan olan Tween 20 ve noniyonik bir sürfektan olan Triton X-100 varlığında da enzim aktivitesinde artış olmuştur. Ancak anyonik bir deterjan olan SDS ve şelatlayıcı ajan olan EDTA ise enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Enzimin kinetik özellikleri araştırıldığında V_{max} değeri 18,28 U/mL olarak hesaplanmıştır. K_m değeri ise 0,11 mM olarak bulunmuştur. *Bacillus cereus* ATA179'den 'den saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesi SDSPAGE ile yaklaşık 47 kDa olarak tespit edilmiştir. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi

amacıyla yapılan çalışmada oda sıcaklığında (RT) ve +4°C'de 60 gün sonra enzimin aktivitesi hemen hemen korunurken, bu süre -20 °C'de 75 güne kadar bulunmuştur.

Farklı araştırmacılar farklı mikroorganizmalarla yaptıkları çalışmalarda da lipazların özelliklerini ortaya çıkarmışlardır.

Bakteriyel lipaz enziminin 35°C ila 55°C arasında optimum olduğu bildirilmiştir. Lipazın yüksek sıcaklıktaki ısıya dayanıklılığı proteinin kendine özgü doğası nedeniyledir. Enzimin termostabil yapısı endüstriyel uygulamalarda büyük bir önem taşımaktadır (Sharma ve ark. 2017). Bakteriyel lipazlar geniş bir pH aralığında optimal aktiviteye sahiptirler (pH 4.0 ile pH 11.0) (Dong ve ark. 1999). Bazı *Bacillus* türlerinden lipazlar için 8.0-9.0 arasında optimum bir pH bildirilmiştir (Lianghua ve Liming 2005, Nawani ve ark. 2006). Bununla birlikte *Bacillus sp.*'nin (Sugihara ve ark. 1991) pH 5.6'da maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Sharma ve ark. (2017), 48. Saat topraktan izole ettikleri *B. metilotrophicus* PS3 suşundan lipaz enzimini 2,9 kez saflaştırmışlar, enzimin Sephadex G-100 kolon kromatografisi gerçekleştirerek toplam %24,10 verim rapor etmişlerdi. Benzer çalışmalar Tripathi ve ark. (2013) tarafından da yapılmış, izole edilen *Microbacterium sp.*'den lipaz enzimini 2,9 kez saflaştırmışlar ve %20,8 verim elde etmişlerdi.

Ghori ve ark (2011) *Bacillus sp.* lipazının pH 9.0'da ve 60 ° C sıcaklıkta maksimum aktivite gösterdiğini, Michaelis sabiti (K_m)'nin 0.31 mM ve V_{max} değerinin ise 7.6 uM /mL/dk olduğunu bildirmişlerdir. Mn^{2+} , Fe^{2+} ve Mg^{2+} iyonları lipaz aktivitesini arttırırken, Cu^{2+} , Na^+ ve Co^{2+} enzim aktivitesini inhibe ettiğini, K^+ iyonlarından önemli ölçüde etkilenmediği, EDTA ve SDS varlığında lipaz aktivitesinin önemli ölçüde inhibe olduğu bildirilmiştir.

Bacillus coagulans BTS-3 lipazının 55°C'de maksimum aktivite gösterdiği ve 70 ° C'ye kadar stabil kaldığı (Kumar ve ark. 2005); *Bacillus sp.* tarafından 70°C'de 65 dakika inkübasyondan sonra %50 aktivite kaybettiği (Nawani ve ark. 2006), *Bacillus subtilis*-168 lipazının ise optimum sıcaklığının 35°C olduğu bu enzimin 55°C'de tüm aktivitesini kaybettiği (Lesuisse ve ark. 1993); *Bacillus subtilis* IFFI 10210 'dan bir lipaz için optimum sıcaklık, 45 °C olarak bulunmuştur (Ma ve ark. 2006).

Solomon ve ark. (2019) izole ettikleri *Bacillus niacini* EMB-5'den lipaz enziminin pH 9.0 ve 40°C'de optimum aktivite gösterdiğini, enzimin pH 8.0-12 arası aktif olduğundan alkali bir enzim olduğunu ifade etmişlerdir. Enzim aktivitesinin 60°C'de 1 saat sonunda %71 oranında stabil kalmıştır. Lipazın aktivitesi, 60 dakikalık inkübasyon süresinden sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık %48'ini pH 8.0'da, pH 9.0'da% 70, pH 10.0'da% 60 ve pH 11.0'da% 56'ya düşürmüştür. PH 9.0'da 120 dakikalık ön inkübasyondan sonra, enzim hala stabildi Lipazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 6.12mg / mL ve 59.64µmol / dak / mg'dır. Moleküler ağırlığının 59 kDa, metal iyonu olarak Al^{3+} ve Ca^{2+} ,un enzimin aktivitesini olumlu etkilediğini, ancak Cu^{2+} , Hg^{2+} , EDTA, β -merkaptoetanol, SDS ve Üre tarafından inhibe edildiğini saptamışlardır.

Hanna ve Layla (1997) saflaştırılmış *Bacillus cereus*'un lipazının biyokimyasal özelliklerin incelenmesi sonucunda enzim pH'ı 7.5'te ve 40°C'de optimum bulunmuştur. *Microbacterium sp.*'den saflaştıkları enzim optimum sıcaklığını 50°C ve optimum pH'sını ise 7.0 olarak rapor etmişlerdir (Tripathi ve ark. 2013)

Kumar ve ark. (2005) *Bacillus coagulans* BTS-3 bakterisinin lipazının 55°C ve pH 8.5'te maksimum aktivite gösterdiğini, pH 8.0 ile 10.5 arasında ve 70°C'ye kadar sıcaklıklarda kararlı olduğunu, enzimin moleküler ağırlığının ise 31 kD olarak tespit ettiklerini enzimin Al^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} iyonları varlığında inhibe olurken, K^+ , Fe^{3+} , Hg^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının enzim aktivitesini arttırdığını saptamışlardır.

Sharma ve ark (2017) *B. methylophilus* PS3 lipazını 2.9 saflaştırdıktan sonra karakterize etmişler ve enzimin optimum sıcaklığının ve pH'sının 55°C ve 7.0 olduğunu, Lipaz aktivitesinin Ca^{2+} ve Mg^{2+} ile stimüle edildiğini, enzimin moleküler ağırlığının 31,40 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Sharma ve ark (2017) *B. licheniformis* MTCC 6824'ten lipazın pH'da 6.0 ila 10 arasında (Chakraborty ve ark. 2008), *Bacillus subtilis* PCSIR NL-39 lipazın pH 3.5 ila 9.0 pH arasında optimum olarak aktif olduğunu saptanmıştır. Ancak *Bacillus* türlerinin lipazlarının çoğunlukla optimum pH'larının 7.0 olduğu ifade edilmiştir (Sirisha ve ark. 2010). Kumar ve ark. (2012) *Bacillus sp.* MPTK 912 suşundan elde ettikleri lipazı Sephadex G-100 kolon kromatografisiyle saflaştırmışlar, enzimin pH 8.0 ve 35°C'de optimum aktiviteye sahip olduğunu, Fe^{2+} , Mg^{2+} ; Triton X-100 ve Tween esterleri

varlığında aktivitesinin arttığını, enzimin moleküler ağırlığının ise 66 kDa olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer yandan, *P. fluorescens*, KE38 lipazının Ca^{2+} tarafından aktive edilmişlerdir, ancak Ni^{2+} tarafından etkilenmemiştir (Joseph ve ark. 2008).

Metal iyonları içerisinde genellikle Ca^{2+} 'in daha fazla bağlanma bölgesi olması nedeniyle enzimin termal stabilitesini de arttırdığı ileri sürülmektedir (Maiangwa ve ark. 2015). Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'nin her iki uyarıcının da enzim stabilitesi için gerekli olduğunu göstermiştir (Sharma ve ark 2017). Termofilik lipazlar, deterjan ve gıda endüstrilerinde büyük bir potansiyele sahiptir (Jaeger ve ark. 1998).

Kumar ve ark. (2005) enzimin Al^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} iyonları tarafından inhibe edildiği, K^+ , Fe^{3+} , Hg^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının enzimi arttırdığı bulunmuştur. Na^+ iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisi olmadığı saptanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Paeruginosa* ATCC 27853 lipazlarının moleküler ağırlıklarının sırasıyla 59.4 kDa ve 30 kDa olduğu belirtilmiştir (Izrael-Zivkovic ve ark. 2009). *P. aeruginosa* mutantın lipazının moleküler ağırlığı yaklaşık 67 kDa olarak bulunmuştur (Bisht ve ark 2013).

Sekhon ve ark. (2006), topraktan izole ettikleri *Bacillus megaterium* AKG-1'den saflaştırdıkları ısıya-dayanıklı lipazın molekül kütlesini yaklaşık 35 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Görüldüğü gibi literatürlerde *Bacillus* türlerinden elde edilen lipaz ile ilgili çok çeşitli sonuçlar bildirilmektedir ve bu da bize *Bacillus* türlerinin çok çeşitli özelliklerde lipazlara sahip olduklarını göstermektedir.

Maya ve ark. (2011), DTT ve mer-merkaptotanol gibi azaltıcı maddeler esas olarak I.5 alt familyasına ait lipazların aktivitesini etkiler, çünkü disülfür köprüler aktif alanın konformasyonunu destekler ve enzimlerin termostabilitesine katkıda bulunur.

Sümfaktanlar lipaz katalizli reaksiyonlarda uygulanır, çünkü su-lipit arayüzey alanını arttırırlar (emülsiyonun kararlılığını arttırırlar); substrat çözünürlüğünü arttırırlar, enzimin açık konformasyonunu stabilize ederler ve hepsini büyük ölçüde geliştirilmiş katalitik performansa yol açan agregasyondan korurlar (Helisto ve Korpela 1998). Sümfaktanların etkisi, izole edilmiş *Bacillus* lipazlarının çok azında test edilmiştir.

Genel olarak, *Bacillus* lipazları az miktarda Triton X-100 varlığını tolere edebilir veya zayıf olarak inaktive edilebilirler. Düşük konsantrasyonlarda (%1'in altında) Triton X-100, *Bacillus* lipazının aktivitesini %40-60 arttırmıştır (Chen ve ark. 2007). *B. sp.* DH4, bu yüzey aktif maddenin %10 varlığında %164 aktivitesini korumuştur (Bora ve Kalita 2008).

Bacillus lipazlarının serbest yağ asitleri ve Tween varlığında aktive edildiği rapor edilmiştir, ancak yine de artış %10-60 aralığındadır. *Geobacillus sp.*'den lipazın etkinliği, 1 mM Tween 80 varlığında %88 arttırılmıştır (Leow ve ark. 2007). *B. megaterium* ve *Bacillus sp.* BP6, diğer bakteriyel lipazlardan farklı olarak, düşük konsantrasyonlarda (2,5-5 mM) kaprik, miristik ve lorik asit ile kuvvetle aktive edilmiştir (Ruiz ve ark. 2004). Yüksek konsantrasyonlarda, yüzey aktif cisimlerinin lipaz aktivitesi üzerindeki etkisi, muhtemelen substratın aktif bölgeye erişimini bloke ettikleri için negatiftir.

Mobarak-Qamsari ve ark. (2011), SDS varlığında aktivite kaybı gözlenirken, Triton X-100 ve Tween esterlerin varlığında enzimin aktifliği artmıştır. Sharma ve ark (2017) Sürfaktanlar ve inhibitörler enzim katalizli reaksiyonun aktivitesini azaltan maddeler olarak bilinirler. Aktif bölgenin katalitik özelliklerini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek etki ederler. SDS, EDTA, CTAB ve Tween 80 gibi yüzey aktif maddeler varlığında enzim aktivitesi sırasıyla %10,71 %16,95 %24,63 ve %30,73'e düşmüştür.

Diğer yandan, Kiran ve Chandra (2008) Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100'ün varlığında enzim aktivitesinin %90 olarak kaldığını bildirmişlerdir. Tween 20 varlığında da benzer şekilde *P. aeruginosa* SRT 9'un lipaz aktivitesi üzerinde pozitif bir etki göstermiştir (Borkar ve ark. 2009).

Bazı durumlarda, yüzey aktif cisimleri, enzimlerin termostabilitesini, etkinliklerini değiştirmeden iyileştirebilirler. *G. stearothermophilus* MC7 lipazı sürfaktanlar varlığında 75°C'de 30 dakikalık inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin %60'ını korumuştur (Guncheva ve ark. 2007). *B. licheniformis* MTCC6824'ün termostabilitesi, sorbitol ve Ca^{2+} iyonlarının kombinasyonu ile geliştirilmiştir (Chakraborty ve Raj 2008). *Bacillus sp.* J33 lipazı 1 saat boyunca 70°C'de aktivitesini %33 kaybetmiştir.

Ancak gliserol ve etilen glikol varlığında 70°C'de 2 saat sonra hiçbir aktivite kaybı gözlenmemiştir. Sorbitol varlığında, inkübasyon sırasında enzimin aktivitesi artmıştır (Nawani ve Kaur 2000). Deterjanların bazıları liyoprotektandır (liyofilize edilen bir madde liyofilizasyon sırasında zarar görmemesi için eklenen bir madde). Örneğin, liyofilize *G. stearothermophilus* MC7 lipazı, 400 ila 70.000 arasında moleküler ağırlıklı polietilen glikollerin varlığında başlangıç aktivitesinin %80'ini korurken, doğal enzim sadece %30 artık aktiviteyi korumuştur (Guncheva ve ark. 2007).

Enzim içeren deterjanlar kumaşı kalite ve rengi parlak tutarak iyileştirme özelliğine sahiptir (Hasan 2014). Özellikle termofilik lipazlar, deterjan ve gıda endüstrilerinde büyük bir potansiyele sahiptir. Çamaşır yıkama formülasyonlarına eklenen enzimlerin en önemli özellikleri, alkali ortamda ve yüksek sıcaklıklarda optimal aktivite göstermeleri, yüksek konsantrasyonlarda Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç duymaları, yüzey aktif cisimleri, oksitleyici ajanlar (peroksit, perkloratlar) ve proteazlar içeren kompleks bir karışımda aktivitesini kaybetmemesidir (Maya ve ark. 2011).

Bu çalışmada da lipaz enziminin deterjan endüstrisinde kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla liyofilize edilmiş lipaz enzimi çeşitli sürfektan ve oksitleyici Ajan varlığında stabilitesi kontrol edilmiştir. %1 ve %5 konsantrasyonlarda olacak şekilde Triton X-100, EDTA, SDS ve H_2O_2 ilave edilerek, 100 rpm, 55 ve 65°C koşullarında 1 saat süresince lipaz enzimi bu deterjan katkı maddeleri ile inkübe edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin başlangıç aktivitesine göre; 65°C'de %5 SDS içeren ortamda enzim aktivitesinin %22 oranında arttığı görülmüştür. 55 ve 65 °C'lerde denenen tüm katkı maddeleri varlığında enzim aktivitesini korumuştur. Enzimin katkı maddeleri varlığından etkilenmediği sonucuna ulaşılmıştır. Hatta enzimin bu katkı maddeleri varlığında aktivitesinin az da olsa arttığı saptanmıştır. Diğer yandan liyofilize lipaz enziminin zeytinyağı ve gress yağı ile kirletilmiş kumaşlardaki etkisini saptamak üzere yapılan çalışma sonucunda yapılan beyazlık indeks ölçümlerinde enzim kirlilik giderimi üzerinde olumlu sonuçlar vermiştir. Bu da enzimin deterjan endüstrisinde potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Niyozima ve More (2014) *Bacillus flexus* XJU-1 lipazını çeşitli ticari deterjanlarla muamele ettiklerinde (60°C de 2 saat) enzimin başlangıç aktivitesine göre %84,90 kaldığını ve enzimin deterjan sanayii için uygunluğunu ifade etmişlerdir.

Cherif ve ark (2011) topraktan yeni izole ettikleri *Staphylococcus* sp.ESW suşundan elde edittikleri lipazın alkali (pH 9.0- 13:00) ve termastabil (60°C) olduğunu, enzimin çeşitli sürfektanlar varlığında 40°C'de 1 saat stabil kaldığını ve deterjan uygulamalarında olumlu sonuçlar aldıklarını ifade etmişlerdir.

Sharma ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada *Bacillus metilotrophicus* PS3'ten saflaştırılmış lipazın termostabilitenin yanı sıra daha geniş bir pH aralığı direncine sahip olduğunu göstermiştir; bu nedenle enzimin çamaşır deterjanı endüstrisi, yağ, zeytinyağı ve zeytinyağının temizliğini iyileştirmek için potansiyel olacağını rapor etmişlerdir.

Çamaşır yıkama formülasyonlarına eklenen enzimlerin en önemli özellikleri, alkali ortamda ve yüksek sıcaklıklarda optimal aktivite göstermeleri, yüksek konsantrasyonlarda Ca^{2+} iyonlarına ihtiyaç duymaları, yüzey aktif cisimleri, oksitleyici ajanlar (peroksit, perkloratlar) ve proteazlar içeren kompleks bir karışımda aktivitesini kaybetmemesidir (Maya ve ark. 2011). Bazı *Bacillus* lipazları test edilmiş ve yüksek potansiyel sergilemişlerdir. *Bacillus cereus* C7 lipazı, çok sayıda ticari deterjan varlığında %60 veya daha yüksek aktivitesini korumuştur. Lipaz, 1 saatlik inkübasyondan sonra %1 hidrojen peroksit ve %1 sodyum hipoklorit varlığında oldukça stabil kalmıştır. *Bacillus cereus* lipazının ayrıca tripsin varlığında stabil olduğu ve deterjan formülasyonlarında proteazlarla kombinasyon halinde kullanılabileceği de bulunmuştur (Dutta ve Ray 2009). *Bacillus* sp. DH4 lipazın hem iyonik hem de iyonik olmayan yüzey aktif cisimlerinde stabil olduğu bulunmuştur. Enzim, çamaşır deterjanı varlığında %20-40 oranında etkisiz hale getirilmiş ve 1 saat boyunca klor maruz kaldıktan sonra neredeyse %80 aktivitesi korunmuştur (Bora ve Kalita 2008).

Bacillus sp. RSJ-1, 60°C'de ve pH 9.0'da %90'dan fazla aktivitesini korumuştur. Bazı iyonik olmayan yüzey aktif cisimlerinin (Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20) varlığında stabildir ve sırasıyla %0,1 ve %0,2 H_2O_2 konsantrasyonunda %93 ve %74 aktivitesini korumuştur. Advanced Ariel Compact, Henko, Gain Super Soaker, vb ve 1

mM CaCl₂.2H₂O varlığında lipazın oldukça stabil (%90'dan fazla) olduğu bulunmuştur (Sharma ve ark. 2002). *Bacillus sp.* L2 lipaz 70°C'de, pH 8.0'de ve kalsiyum iyonlarının varlığında kontrole kıyasla aktivitesi %500'e yükselmiş, ancak pepstatin A tarafından tamamen inaktive edilmiştir (Sabri ve ark. 2009). *Bacillus sp.* BTS-1 lipazı, 20 dakika boyunca 37°C'de tripsin ve kimotripsin ile ön muamele edilmiş ve hidrolitik aktivitesi muamele edilmemiş bakteriyel lipaza kıyasla yaklaşık %13-43 oranında artmıştır (Kanwar ve ark. 2004). *B. sphaericus* 205 lipazı, pepsin A tarafından proteolitik sindirim ile etkisizleştirilmiştir (Sulong ve ark. 2006). *B. subtilis* lipazı, bir proteaz ile muameleden sonra aktivitesini %75 korumuştur (Takac ve Marul 2008).

Bu çalışma sonucunda *Bacillus cereus* ATA179 suşundan üretilen lipaz enzimi için yeni ve verimli bir modifiye üretim ortamı elde edilmiş, enzimin kısmi saflaştırılması sonucu karakterize edildiğinde enzimin termostabil olduğu, asidofilik özellik taşıdığı ve düşük K_m'e sahip olması nedeni ile endüstrinin farklı alanlarında kullanım potansiyeli olabileceği, enzimin katkı maddeleri varlığından etkilenmediği ve katkı maddeleri varlığında aktivitesinin az da olsa arttığı, kirletilmiş kumaşlardaki yağları giderdiğinden dolayı enzimi deterjan endüstrisinde büyük bir potansiyele sahip olabileceğini düşünüldüğünden dolayı dış ülkelere satın alınan lipaz enziminin ülkemizde geniş çapta üretilmesi ve ülke ekonomisine katkıda bulunması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abada, E.A.E. 2008.** Production and Characterization of a mesophilic lipase isolated from a *Bacillus stearothermophilus*. *Pakistan J. Biol. Sci*, 11:1100–1106.
- Abbas, N., Javed, J., Abbas, Z., Choudry, S., Ali, S. 2017.** Lipase Production from *Bacillus subtilis* using various Agricultural waste. *Int. J. of Advanced Engineering, Management and Science (IJAEMS)*, 3: 405-409.
- Abdel-Fattah, SA, El-Sanhoury, M.H., El-Mednay, N.M., et al. 2008.** Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *Int J Poult Sci*, 7:215-222.
- Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., Machida, M. 2006.** Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia*, 162:143–153.
- Achamma, T., Manoj, M., Valsa, A.K., Mohan, S., Manjula, R. 2003.** Optimization of growth conditions for the production of extracellular lipase by *Bacillus mycoides*. *Indian Journal of Microbiology*, 43: 67–69.
- Aehle, W. 2004.** Enzymes in Industry Production and Applications, *Wiley-VCH, Weinheim*. 28: 335- 340.
- Adulkar, T.V., Rathod, V.K. 2015.** Pre-treatment of high fat content dairy wastewater using different commercial lipases. *Desalin Water Treat*, 53:2450–2455.
- Aguiéiras, E.C.G., Cavalcanti-Oliveira, E.D., Freire, D.M.G. 2015.** Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. *Fuel*, 159:52–67.
- Ahmed, E.H., Raghavendra, T., Madamwar, D. 2010.** An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: application for ethyl caprylate synthesis. *Bioresource Technol*, 101:3628–3634.
- Ahmia, A., Danane, F., Bessah, R., Boumesbah, I. 2014.** Raw material for biodiesel production. Valorization of used edible oil. *Rev Energ Renouvel*, 17:335–343.
- Ahn, J.O, Jang, H.W, Lee, H.W, Choi, E.S, Haam, S.J, Oh T.K, Jung, J.K. 2003.** Overexpression of thermoalkalophilic lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol Biotechnol*, 13:451–45.
- Akdere, C., 2003.** Fındık yağı-füzel yağı fraksiyonu enzimatik alkoliz reaksiyonunun incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F., Dogru, M.** Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes *Appl. Biochem. Biotechnol*, 136 (2):183–192
- Amoah, J, Ho, S.H., Hama, S., Yoshida, A., Nakanishi, A., Hasunuma, T., Ogino, C., Kondo, A. 2016.** Converting oils high in phospholipids to biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing *Fusarium heterosporum* lipase. *Biochem Eng J*, 105:10–15.
- An, J.D., Patterson, D.A., McNeil, S., Hossain, M.M. 2014.** Immobilization of lipase on woolen fabrics: enhanced effectiveness in stain removal. *Biotechnol Prog*, 30:806–817.
- Anonim, 2019.** Global Industrial Enzymes Market – Global Industry Analysis and Forecast (2018-2026) by Type, Application, Source, and Geography. <https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/global-industrial-enzymes-market/14690/> (Erişim tarih: 12/04/2019)
- Anonim, 2019.** (<https://www.klimik.org.tr/2001/05/11/sarbon-prof-dr-mehmet-doganay/> Erişim tarih (12/04/2019)

- Anonim,** 2019. Enzymes Market Outlook To 2024. <https://www.ameriresearch.com/product/global-enzymes-market-size/> (Erişim tarihi: 20/02/2019)
- Anonim,** 2018. Industrial enzymes a global market overview. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4555807/industrial-> (Erişim tarihi: 06/05/2018)
- Anonim,** 2014. Enzymes industrial-applications. <http://www.bccrssearch.com/marketresearch/biotechnology/bio030h.html>. (Erişim tarihi: 22/04/2019)
- Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T.** 2007. Lipase applications in food industry. *Indian J Biotechnol*, 6:141.
- Bacha, A.B., Moubayed, M.S, Al-Assaf, A.** 2016. An organic solvent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* ALA1 strain with potential for use as an industrial biocatalyst. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 63(3): 378–390.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P.N., Mehrotra, R.** 2010. Biodiesel Production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *J Mol Catal B Enzymatic*, 62:9–14.
- Baldessari, A., Iglesias, L.E.** 2012. Lipases in green chemistry: acylation and alcoholysis on steroids and nucleosides. *Lipases Phospholipases*. 457–469.
- Barbosa, A.M., Venkatesagowda, B., Messias, J.M., Andrade, M.M., Dekker, R.F** 2011. Soybean oil and meal as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis*, and soybean oil to enhance the production of botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*. *Janeza Trdine*, 9:51000.
- Baron, A.M., Barouh, N., Barea, B., Villeneuve, P., Mitchell, D.A., Krieger, N.** 2014. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. *Fuel*, 117:458–462.
- Barros, M., Fleuri, L., Macedo, G.** 2010. Seed lipases: sources, applications and properties-a review. *Braz J Chem Eng*, 27:15–29.
- Basheer, S.M., Chellappan, S., Beena, P., Sukumaran, R.K., Elyas, K.,** 2011. Chandrasekaran M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnol*, 28:627–638.
- Begam, M.S., Pradeep, F.S., Pradeep, B.V.** 2012. Production, purification, characterization and applications of lipase from *Serratia marcescens* MBB05. *Asian J. Pharm. Clin Res.* ISSN- 0974-2441
- Behera, A.R., Veluppal, A., Dutta, K.** 2019. Optimization of physical parameters for enhanced production of lipase from *Staphylococcus hominis* using response surface methodology. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Berekaa, M., Zaghloul, T.I., Abdel-Fattah, Y.R., Saeed, H.M., Sifour, M.** 2009. Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 25: 287-294.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., Komathi, S.** 2018. Optimization and Production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *J. King Saud Univ-Sci*, 10:10-16.
- Bhosale, H., Shaheen, U., Kadam, T.** 2016. Characterization of a hyperthermostable alkaline lipase from *Bacillus sonorensis* 4R. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme*, 11p.

- Bhushan, I., Kumar, A., Modi, G., Jamwal, S. 2011.** Chiral resolution of differently substituted racemic acetyl-1-phenyl ethanol using lipase from *Bacillus subtilis*. *J Chem Technol Biotechnol*. 86:315–318
- Bisht, D., Yadav, S.K., Darmwal, N.S. 2013.** An oxidant and organic solvent tolerant alkaline lipase by *Pseudomonas aeruginosa* mutant: downstream processing and biochemical characterization. *Braz. J. Microbiol*, 44:1305–1314.
- Bonala, K.C., Mangamoori, L.N. 2012.** Production and optimization of lipase from *Bacillus tequilensis* NRRL B-41771. *International Journal of Biotechnology Applications*, 4(1): 134-136.
- Bora, L., Bora, M. 2012.** Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from hot spring of Arunachal Pradesh India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1): 30-42.
- Bora, L., Kalita, M. C. 2008.** Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from a thermophilic *Bacillus* sp DH4, characterization and its potential applications as detergent. *Additive Journal of chemical Technology and Biotechnology*, 83: 688-693
- Borkar, P.S., Bodade, R.G., Rao, S.R., Khobragade, C.N. 2009.** Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain-*Pseudomonas aeruginosa* SRT 9, *Braz. J. Microbiol*, 40: 358–366.
- Borrelli, G.M., Trono, D. 2015.** Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int J Mol Sci*, 16:20774-20840.
- Borza, P., Peter, F., Paul, C. 2015.** Improved enantioselectivity of *Candida antarctica* a lipase through sol-gel entrapment. *Chem Bull, "polytechnica"*, 60:49–54
- Bradoo, S., Saxena, R.K., Gupta, R. 1999.** Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 15: 87-91.
- Brigida, A.I., Amaral, P.F., Coelho, M.A, Goncalves, L.R. 2014.** Lipase from *Yarrowia lipolytica*: production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym*, 101:148-158.
- Brzozowski, A.M., Savage H., Verma, C.S., Turkenburg, J.P., Lawson D.M., Svendsen A., Patkar S. 2000.** Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces* (Humicola) lanuginosa lipase, *Biochemistry*, 39:15071-15082.
- Casajus, H. 2017.** Etude de la polymérisation enzymatique de la malolactonates en présence de lipases. *Doktora Tezi*. Rennes universitesi, Institut des Sciences Chimiques de Rennes (UFR Sciences et Propriété de la Matière). Rennes Fransa.
- Casas-Godoy L., Duquesne S., Bordes F., Sandoval G., Marty A., Godoy L.C. 2012.** Lipases: An Overview, Lipases and Phospholipases, *Humana Press*, 3-30.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodriguez-Gomez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros R.O. 2005.** Screening, purification and Characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microb. Technol*, 37: 648–654.
- Cazaban, D., Wilson, L., Betancor, L. 2017.** Lipase immobilization on siliceous supports: application to synthetic reactions. *Curr Organ Chem*, 21:96–103.
- Chakraborty, K., Raj, R.P. 2008.** An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical Characterization. *Food Chem*, 109: 727–736.
- Chakraborty, K., Raj, R.P. 2008.** An extracellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 109: 727–736.
- Chaplin, J. A., Gardiner, N., Mitra, R. K., Parkinson, C. J., Portwig, M., Mboniswa, B. A., Evans-Dickson, M. D., Brady, D., Marais, S. F., Reddy, S. 2006.**

Process for preparing (-) menthol and similar compounds, *United States Patent* 7026144, <http://www.freepatentsonline.com>.

Chauhan, M., Chauhan, R.S., Garlapati, V.K. 2013. Evaluation of a new Lipase from *Staphylococcus* sp. for detergent additive capability. *BioMed Res Int*, 2013:1.

Cheetham, P.S.J. 1995. Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. *In: Handbook of Comprehensive Biotechnol.*, 3: 789-818.

Chen, S., Qian, L., Shi, B. 2007. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochemistry*, 42: 988– 994.

Chen, Z., Huang, S., Zhao, M. 2016. Molecularly imprinted polymers for biomimetic catalysts. *Molecularly Imprinted Catalysts*, 11:229-238

Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., Sayadi, S. 2011. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids in Health and Disease*, 10:221.

Chinaglia, S., Chiarelli, L.R., Maggi, M., Rodolfi, M., Valentini, G., Picco, A.M. 2014. Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 78:245–254.

Choudhary, R., Jana, A., Jha, M. 2004. Enzyme technology applications in leather processing. *Indian J Chem Technol*, 11:659–671.

Choudhury P, Bhunia B. 2015. Industrial application of lipase: a review. *Biopharm J*, 1:41-47.

Christopher, L.P, Zambare, V.P., Zambare, A., Kumar, H., Malek, L.2015. A thermo-alkaline lipase from a new thermophile *Geobacillus thermodenitrificans* AV-5 with potential application in biodiesel production. *J Chem Technol Biotechnol*, 90:2007–2016.

Clementz, A.L., Del Peso, G., Canet, A., Yori, J.C., Valero, F. 2016. Utilization of discard bovine bone as a support for immobilization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog*, 32:1246–1253.

Couturier, L., Taupin, D., Yvergnaux, F. 2009. Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids. *J Mol Catal B Enzymatic*, 56:29–33.

Daniels, M.J. 1992. Paper technology, 33(6): 14.

da Silva, Serres, J.D., Balmant, W., Soares, D., Corazza, M.L., Krieger, N., Mitchell, D.A. 2017. A combined sorption and kinetic model for multiphasic ethyl esterification of fatty acids from soybean soapstock acid oil catalyzed by a fermented solid with lipase activity in a solvent-free system. *Biochem Eng J*, 120:84–92.

de Miranda A.S., Miranda, L.S.M., de Souza, R. 2015. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. *Biotechnol Adv*, 33:372–393.

de Flaun, M.F., Fredrickson, J.K., Dong, H., Pfiffner, S.M., Onstott, T.C., Balkwill, D.L., Streger, S.H., Stackerbrandt, E., Knoessen, S., van Heerden, E. 2007. Isolation and characterization of a *Geobacillus thermoleovorans* strain from an ultra-deep South African gold mine. *Syst. Appl. Microbiol*, 30: 152–164.

Dhake, K.P., Thakare, D.D., Bhanage, B.M. 2013. Lipase: a potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Frag J*, 28:71–83.

Dharmsthiti, S., Luchai S. 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. *THL027 FEMS Microbiol. Lett*, 179: 241–246.

- Dias, F.S., Sandoval, G., Plou, F., Valero, F. 2013.** The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron J Biotechnol*, 16:12–12.
- Diaz, M.E., Amara, S., Roussel, A., Longhi, S., Cambillau, C., Carriere, F. 2017.** Probing conformational changes and interfacial recognition site of lipases with surfactants and inhibitors. In: Gelb MH, editor. *Enzymology at the Membrane Interface. Int. Enzy. and Prot-Memb. Bind.* 583:279–307.
- Dong, H., Gao, S., Han, S.P., Cao, S.G. 1999.** Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 30(3): 251–256.
- Dosanjh, N.S., Kaur, J. 2002.** Biochemical analysis of a native and proteolytic fragment of a high-molecular-weight thermostable lipase from a Mesophilic *Bacillus* sp. *Protein Expr. Purif*, 24 (1): 71–75.
- Dutta, S. Ray, L. 2009.** Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C(7). *Appl. Biochem. Biotechnol*, 159:142–154.
- Duza, M.B., Mastan, S. 2014.** Optimization of Lipase Production from *Bacillus thuringiensis* (TS11BP), *Achromobacter xylosoxidans* J2 (TS2MCN) –Isolated from Soil sediments near oilseed farm. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(2): 66-76.
- Ebrahimpour, A., Rahman, R.N.Z.R.A., Ean, Ch'ng, D.H., Basri, M., Salleh, A.B. 2008.** A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. strain ARM. *BMC Biotechnology*, 8: 96-110.
- El-Batal, A., Farrag, A.A., Elsayed, M.A., El-Khawaga, A.M. 2016.** Effect of environmental and nutritional parameters on the extracellular lipase production by *Aspergillus niger*. *International Letters of Natural Sciences*, 60: 18-29
- Elibol, M., Ozer, D. 2001.** Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem*, 36: 325- 329.
- Eltaweel, M.A., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Basri, M. 2005.** An organic solvent-stable lipase from *Bacillus* sp. strain 42. *Ann. Microbiol.*, 55 (3): 187–192.
- Eze, S.O.O., Chilaka, F.C., Akunwata, C.U. 2017.** Properties of lipase (EC 3.1. 1.3) from different varieties of maize. *Anim Res Int*, 4:650–652.
- Fickers, P., Marty, A., Nicaud, J.M. 2011.** The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical Characterization and biotechnological applications. *Biotechnol, Adv.* 29:632–644.
- Fomuso, L.B., Akoh, C.C. 2002.** Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor, *Food Research International*, 35: 15-21
- Ganguly, S., Nandi, S. 2015.** Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. *Biochem Eng J*, 102:2–5.
- Garcia, H.S., Arcos, J.A., Keough, K.J., Hill, C.G. 2001.** Immobilized lipase-mediated acidolysis of butteroil with conjugated linoleic acid: batch reactor and packed bed reactor studies. *J Mol Catal B Enzymatic*, 11:623–632.
- Garlapati, V.K., Kant, R., Kumari, A., Mahapatra, P., Das, P., Banerjee, R. 2013.** Lipase mediated transesterification of Simarouba glauca oil: a new feedstock for biodiesel production. *Sustain Chem Process*, 1:1.

Gerits, L.R., Pareyt, B., Decamps, K., Delcour, J.A. 2014. Lipases and their functionality in the production of wheat-based food systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 13:978–989

Ghaly, A., Dave, D., Brooks, M., Budge S. 2010. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. *Am J Biochem Biotechnol*, 6:54–76.

Ghanem, E.H., Al-Sayed, H.A., Saleh, K.M. 2000. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 16:459–464.

Ghori, M.I, Iqbal, M. J., Hameed, A. 2011. characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 22-29.

Gofferje, G., Ståbler, A., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., Flöter, E. 2014. Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids in crude *Jatropha* oil by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J Mol Catal B Enzymatic*, 107:1–7.

Gog, A., Roman, M., Tosa, M., Paizs, C., Irimie, F.D. 2012. Biodiesel Production using enzymatic transesterification—current state and perspectives. *Renew Energy*, 39:10–16.

Grabner, G.F., Zimmermann, R., Schicho, R., Taschler, U. 2017. Monoglyceride lipase as a drug target: At the crossroads of 26 *Biotechnol. Prog.*, 2018, Vol. 34, No. 1 arachidonic acid metabolism and endocannabinoid signaling. *Pharmacol Ther*, 175:35–46.

Grbavcic, S., Bezbradica, D., Izrael-Zivkovic, L., Avramovic, N., Milosavic, N., Karadzic, I., Knezevic-Jugovic, 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 Technol*, 102:11226–11233.

Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini, H.S. 2007. Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of pythase. *Folia Microbiol*, 59:491-497.

Guncheva, M., Zhiryakova, D., Radchenkova, N., Kambourova, M. 2007. Effect of nonionic detergents on the activity of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 49: 88–91.

Gupta, N., Mehra, G., Gupta, R. 2004. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: Medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. *Can. J. Microbiol.*, 50: 361-368.

Gupta, R., Gupta, N., Rath, P. 2004. Bacterial lipases: an overview 4. of production, purification and biotechnological properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 763-781.

Gupta, R., Kumari, A., Syal, P., Singh, Y. 2015. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog Lipid Res*, 57:40–54.

Gül, Ü.D. 2013. Fungal lipazlar ve endüstride kullanım alanları. *AKU J. Sci. Eng*, 13:1-8

Hanaa, A.E., Layla, A.R. 1997. Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase *Microbiological research*, 152(2): 199-208.

Hanamura, S, Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T. 2016. Synthesis of acacetin and resveratrol 3,5-di-O-b-glucopyranoside using lipasecatalyzed regioselective

deacetylation of polyphenol glycoside peracetates as the key step. *J Mol Catal B Enzymatic*, 128:19–26.

Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol*, 39:235–251.

Hassan, S. 2014. Lipase Catalyzed Aminolysis as An Entry to Consecutive Multicomponent Reactions. *Doktora tezi*. Universitäts-und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Dusseldorf.

Hassan, S., Ullrich, A., Müller, T.J. 2015. Consecutive three-component synthesis of (hetero) arylated propargyl amides by chemoenzymatic aminolysis–Sonogashira coupling sequence. *Organ Biomol Chem*, 13:1571–1576.

Helisto, P., Korpela, T. 1998. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme and Microbial Technology* Enzyme, 23: 113–117.

Heravi, K.M., Eftekhari, F., Yakhchali, B., Tabandeh, F. 2008. Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus* sp. from soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(5): 740–745.

Hofmeyr, S., Meyer, C., Warren, B.L. 2014. Serum lipase should be the laboratory test of choice for suspected acute pancreatitis. *South Afr J Surg*, 52:72–75.

Horani, K.H. 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 12: 399–401.

Horner, N.R., Grenville-Briggs, L.J., Van-West, P. 2012. The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal Biol*, 116:24–41.

Houde, A., Kademi, A. ve Leblanc D., 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem. and Biotech*, 118: 155–170.

Huang, W.C., Chen, C.Y., Wu, S.J. 2017. Almond skin polyphenol extract inhibits inflammation and promotes lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food*, 20:103–109.

Iftikhar, T., Haq, I., Javed, M.M. 2003. Optimization of cultural conditions for the production of lipase by submerged culture of *Rhizopus oligosporus* TUV-31. *Pak. J. Bot*, 35(4): 519–525.

Izrael-Zivkovic, L.T., Gojgic-Cvijovic, G.D., Gopcevic, K.R., Vrvic, M.M., Karadzic, I.M. 2009. Enzymatic characterization of 30 kDa lipase from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *J. Basic Microbiol*, 49: 452–462.

Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology. *Trend Biotechnol*, 16: 396–403.

Ji, X., Chen, G., Zhang, Q., Lin, L., Wei, Y. 2015. Purification and Characterization of an extracellular cold-adapted alkaline lipase produced by psychrotrophic bacterium *Yersinia enterocolitica* strain KM1. *J Basic Microbiol*, 55:718–728.

Jooyandeh, H., Kaur, A., Minhas, K. 2009. Lipases in dairy industry: a review. *J Food Sci Technol (Mysore)*, 46:181–189.

Joseph, B., Ramteke, P.W., Thomas, G. 2008. Cold active Microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Advan*, 26:457–470.

Kanjanavas, P., Khuchareontaworn, S., Khawsak, P., Pakpitcharoen, A., Pothivejkul, K., Santiwatanakul, S., Matsui, K., Kajiware, T., Chansiri, K. 2010. Purification and characterization of organic solvent and detergent tolerant lipase from thermotolerant *Bacillus* sp. RN2. *Int J Mol Sci*, 11:3783–3792.

- Kanmani, P., Aravind, J., Kumaresan, K. 2015.** An insight into Microbial lipases and their environmental facet. *Int J Environ Sci Technol*, 12:1147–1162.
- Kanmani, P., Kumaresan, K., Aravind, J. 2015.** Pretreatment of coconut mill effluent using celite-immobilized hydrolytic enzyme preparation from *Staphylococcus pasteurii* and its impact on anaerobic digestion. *Biotechnol Prog*, 31:1249–1258.
- Kanwar, S.S., Kaushal, R.K., Jawed, A., Chimni, S.S., Punj, V. 2004.** Pretreatment of lipase from *Bacillus coagulans* BTS-1 with proteases enhances its activity. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci*, 6:215-219.
- Kapoor, M., Gupta, M.N., 2012.** Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem*, 47:555–569.
- Kartal, F. 2016.** Enhanced esterification activity through interfacial activation and cross-linked immobilization mechanism of *Rhizopus oryzae* lipase in a nonaqueous medium. *Biotechnol Prog*, 32:899–904.
- Kaur, G., Singh, A., Sharma, R., Sharma, V., Verma, S., Sharma, P.K. 2016.** Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India. *3 Biotech*, 6:10.
- Kawashima, Y., Ezawa, T., Harada, T., Noguchi, T., Kawasaki, M., Kirihaara, M., Imai, N. 2016.** Preparation of the monoacylates of 2- substituted (Z)-but-2-ene-1,4-diols using porcine pancreas lipase. *Bull Chem Soc Japan*, 89:257–267.
- Kim, B.H., Akoh, C.C. 2015.** Recent research trends on the enzymatic synthesis of structured lipids. *J Food Sci*, 80:C1713–C1724.
- Kiran, K.K., Chandra, T.S. 2008.** Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus sp.* strain TSCVKK, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 77:1023–1031.
- Kobayashi, T., Nagao, T., Watanabe, Y., Shimada, Y. 2012.** Promotion of the lipase-catalyzed hydrolysis of conjugated linoleic acid lmenthyl ester by addition of an organic solvent. *SpringerPlus*, 1:1.
- Kuepethkaew, S., Sangkharak, K., Benjakul, S., Klomklao, S., 2017.** Laundry, detergent-stable lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas: Effect of extraction media and biochemical characterization. *Int J Food Properties*, 20:769–781.
- Kumar, M. P. P., Valsa, A. K. 2007.** Optimization of culture media and cultural conditions for the production of extracellular lipase by *Bacillus coagulans*. *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 114-117
- Kumar, M.D.J., Rejitha, R., Devika, S., Balakumaran, M.D., Nancy Rebecca, A.I.M., Kalaichelvan P.T. 2012.** Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus sp.* MPTK 912 isolated from oil mill effluent. *Advances in Applied Science Research*, 3 (2):930-938.
- Kumar, M.P.P., Valsa, A. K. 2007.** Optimization of culture media and cultural conditions for the production of extracellular lipase by *Bacillus coagulans*. *Indian J. Biotechnol*, 6 (1): 114-117.
- 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 Expr. Purif*, 41:38-44.
- Kumar, S., Negi, S. 2015.** Transformation of waste cooking oil into C-18 fatty acids using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* through solid state fermentation. *Biotech*, 5:847–851.

- Kumar, V., Jahan, F., Mahajan, R.V., Saxena, R.K. 2016.** Efficient regioselective acylation of quercetin using *Rhizopus oryzae* lipase and its potential as antioxidant. *Bioresource Technol*, 218: 1246–1248.
- Laachari, F., El Bergadi, F., Sayari, A., Elabed, S., Mohammed, I., Harchali, E.H., Ibensouda, S.K. 2015.** Biochemical characterization of a new thermostable lipase from *Bacillus pumilus* strain. *Turkish J Biochem*, 40:8–14.
- Lanser, A.C., Manthey, L.K., Hou, C.T. 2002.** Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein. *Curr. Microbiol*, 44:336–340.
- Larbidaouadi, K., Benattouche, Z., Abbouni, B. 2015.** Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase isolated from industrial rejection of gas station. *Int J Biotechnol Allied Fields*, 39:146–153
- Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J., Kim, D.S., Suhartono, M.T., Pyun, Y.R. 1999.** Isolation and characterisation of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett*, 179: 393–400.
- Leow, T.C., Rahman, R.N., Basri, M., Salleh, A.B. 2007.** A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. *Extremophiles*, 1: 527–535.
- Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. 1993.** Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem*, 216 :155–160.
- Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. 1993.** Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem*, 216: 155–160.
- Lianghua, T., Liming, X. 2005.** Purification and partial Characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* ZJU318, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 125, 139–46.
- Loli, H., Narwal, S.K., Saun, N.K., Gupta, R. 2015.** Lipases in medicine: an overview. *Mini-Rev Med Chem*. 15:1209–1216.
- Lukovic, N., Knezevic'-Jugovic' Z, Bezbradica D. 2011.** Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: recent trends, challenges and future perspectives. *Altern Fuel*, 1:47–72.
- Magalhaes, S.S., Alves, L., Sebastiao, M., Medronho, B., Almeida, Z.L., Faria, T.Q., Brito, R.M., Moreno, M.J., Antunes, F.E. 2016.** Effect of ethyleneoxide groups of anionic surfactants on lipase activity. *Biotechnol Prog*, 32:1276–1282.
- Maiangwa, J., Ali, M.S.M., Salleh, B., Abd Rahman, R., Shariff, F.M., Leow, T.C. 2015.** Adaptational properties and applications of coldactive lipases from *psychrophilic bacteria*. *Extremophiles*, 19:235–247.
- Maldonado, R.R., Macedo, G.A., Rodrigues, M.I. 2011.** Lipase Production using microorganisms from different agro-industrial by products. *Int J App Scien Tech*, 4(1): 108–115.
- Markossian, S., Becker, P., Mark, H., Antranikian, G. 2000.** Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an ocelandic hot spring. *Extremophiles*, 4(6):365–371.
- Maya, G., Diana, Z. 2011.** Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68:1–21
- Mazhar, H., Abbas, N., Ali, S., Sohail, A., Hussain, Z., Ali S.S. 2017.** Optimized production of lipase from *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39. *African Journal of Biotechnology*, 16(19):1106–1115.

- Meng, Y., Li, S., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., Li, X. 2015.** Effect of lipase addition on hydrolysis and biomethane production of Chinese food waste. *Bioresource Techno*, 179:452–459.
- Miettinen, H., Nyssola, A., Rokka, S., Kontkanen, H., Kruus, K. 2013.** Screening of microbes for lipases specific for saturated medium and long-chain fatty acids of milk fat. *Int Dairy J*, 32:61–67.
- Mioso, R., Toledo Marante, F., Herrera, Bravo de Laguna, I. 2015.** *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. *J Appl Microbiol*, 118:781–791.
- Moayedallaie, S., Mirzaei, M., Paterson, J. 2010.** Bread improvers: Comparison of a range of lipases with a traditional emulsifier. *Food Chem*, 122:495–499.
- Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., Moosavi-nejad, Z. 2011.** Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iran. J. Microbiol*, 3: 92-98.
- Moreau, R.A., Harron, A.F., Powell, M.J., Hoyt, J.L., 2014.** A comparison of the levels of oil, carotenoids, and lipolytic enzyme activities in modern lines and hybrids of grain sorghum. *J Am Oil Chem Soc*, 93:569–573.
- Mormeneo, M., Andres, I., Bofill, C., Diaz, P., Zueco, J. 2008.** Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 80 (3): 437–445.
- Nawani, N., Kaur, J. 2000.** Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33 *Mol. Cell. Biochem*, 206: 91–96.
- Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J. 2006.** A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization, *Mol. Cell. Biochem*, 290:17-22.
- Nelson, D., Rawson, R. 210.** Method of growing bacteria for use in wastewater treatment. *United States Patent*, 7658851.
- Niyonzima, F.N., More, S. 2014.** Biochemical properties of the alkaline lipase of *Bacillus flexus* XJU-1 and its detergent compatibility. *Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences*, 69(9): 1108-1117.
- Niyonzima, F.N., Sunil S. More, S.S., Muddapur, U. 2013.** Optimization of fermentation culture conditions for alkaline lipase production by *Bacillus flexus* XJU-1. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 7 (3): 793-803.
- Oh, B.C., Kim, H.K., Lee, J.K., Kang, S.C., Oh, T.K. 1999.** *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiol. Lett*, 179:385-392.
- Oliveira F., Souza, C.E., Peclat, V., Salgado, J.M., Ribeiro, B.D, Coelho, M.A.Z., Venancio, A., Belo, I. 2017.** Optimization of lipase Production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. *Food Bioprod Process*, 102:268–277.
- Oliveira, C.E., da Silva, P.R., Ramos, A.P, Aranda, D.A.G., Freire, D.M.G. 2011.** Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. *Enzyme Res*, (1):615803
- 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
- Padhi, S.K., Haas, M., Bornscheuer, U.T. 2012.** Lipase-catalyzed transesterification to remove saturated MAG from biodiesel. *Eur J Lipid Sci Technol*, 114:875–879.

- Pahoja, V.M., Sethar, M.A. 2002.** A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. *Pakistan J Appl Sci*, 2:474–484.
- Pallavi P., Jeevan S., Chandra, Reddy, V.K., Reddy, S.R. 2014.** Optimization of cultural parameters for lipase Production by *Bacillus subtilis* Y-IVI *Int.J. Curr. Microbiol. App.Sci*, 3(12): 194-200
- Patel, V., Gajera, H., Gupta, A., Manocha, L., Madamwar, D. 2015.** Synthesis of ethyl caprylate in organic media using *Candida rugosa* lipase immobilized on exfoliated graphene oxide: Process parameters and reusability studies. *Biochem Eng J*, 95:62–70.
- Patil, K.J., Chopda, M.Z., Mahajan, R.T. 2011.** Lipase biodiversity. *Indian J Sci Technol*, 4:971–982.
- Peng, X.Q. 2013.** Improved thermostability of lipase B from *Candida antarctica* by directed evolution and display on yeast surface. *Appl Biochem Biotechnol*, 169:351–358.
- Phuah, E.T., Tang, T.K., Lee, Y.Y., Choong, T.S., Tan, C.P., Lai, O.M. 2015.** Review on the current state of diacylglycerol Production using enzymatic approach. *Food Bioprocess Technol*. 8: 1169–1186.
- Pirajan, M.J., Giraldo, L. 2011.** Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arab J Chem*, 4:55–62.
- Prasad, P., Manjunath, K. 2011.** Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian J Biotechnol*, 10:121–124.
- Priego, J., Ortíz-Nava, C., Carrillo-Morales, M., López-Munguía, A., Escalante, J., Castillo, E. 2009.** Solvent engineering: an effective tool to direct chemoselectivity in a lipase-catalyzed Michael addition, *Tetrahedron*, 65:536-539.
- Primozic, M., Kavcic, S., Knez, Z., Leitgeb, M., 2016.** Enzyme-catalyzed esterification of D, L-lactic acid in different SCF/IL media. *J Supercrit Fluids*, 107:414–421.
- Qi, J., Li, Y., Yokoyama, W., Majeed, H., Masamba, K.G., Zhong, F., Ma, J. 2015** Cellulosic fraction of rice bran fibre alters the conformation and inhibits the activity of porcine pancreatic lipase. *J Funct Foods*, 19:39–48.
- Rahman, R.N.Z.R.A., Leow, T.C., Salleh, A.B., Basri, M. 2007.** *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BMC Microbiol*. 7: 77-86.
- Ramos-Sanchez, L.B., Cujilema-Quitio, M.C., Julian-Ricardo, M.C., Cordova, J., Fickers, P. 2015.** Fungal lipase production by solid-state fermentation. *J Bioprocess Biotechnol*, 5:203–212.
- Rashid, F.A.A, Rahim, R.A, Ibrahim, D., Balan, A., Bakar, N.M.A. 2013.** Purification and properties of thermostable lipase from a *Thermophilic bacterium*, *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2. *J Pure Appl Microbiol*, 7:1635–1645.
- Ray, A. 2012.** Application of lipase in industry. *Asian J Pharm Technol*. 2:33–37.
- Ray, J., Nagy, Z.K., Smith, K.W., Bhaggan, K., Stapley, A.G. 2013.** Kinetic study of the acidolysis of high oleic sunflower oil with stearic–palmitic acid mixtures catalysed by immobilised *Rhizopus oryzae* lipase. *Biochem Eng J*, 73:17–28.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. 2009.** Lipases at interfaces: a review, *Adv. Colloid Interface Sci*, 147-148,237-250.
- Ribeiro, B.D., Castro, A.M.D., Coelho, M.A.Z., Freire, D.M.G. 2011.** Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res*, 11:1.

Rivera, I., Robles, M., Mateos-Diaz, J.C., Gutierrez-Ortega, A., Sandoval, G. 2017. Functional expression, extracellular production, purification, structure modeling and biochemical Characterization of Carica papaya lipase 1. *Process Biochem*, 56:109–116.

Rodrigues, J.P., Orrico, A.C.A., Junior, O., Previdelli, M.A, Seno, L., de Araujo, L.C., Sunada, NdS. 2014. Adding oil and lipase on the anaerobic digestion of pig manure. *Ciencia Rural*, 44:544–547.

Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. 2010. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *J Mol Catal B Enzymatic*, 66:15–32.

Romdhane, IB.B., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouri, A., Belghith, H. 2010. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochem Eng J*, 53:112–120

Rong, H., ChengQun, L., BaoLing, H., LiJuan, G., JiangMing, Y., RuiLong, L., JinHua, H., Yu, H., Qian, L, 2014. Relationships between virulence and activities of protease, chitinase and lipase produced by entomogenous *Pestalotiopsis disseminata*. *J South Agric*, 45:1172–1177.

Roudsari, D.S., Zibae, A., Mozhdehi, A.M., 2014. Determination of lipase activity in the larval midgut of *Bacterocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae). *Isj*, 11:66–72.

Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Pastor, F.I.J., Diaz, P., Saso, L. 2004. Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*-related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. *Biochim. Biophys. Acta*, 1672: 184–191.

Sabri, S., Rahman, R.N.Z.R.A., Leow, T.C., Basri, M. Salleh, A.B. 2009. Secretory expression and characterization of a highly Ca^{2+} activated thermostable L2 lipase. *Protein Expr. Purif*, 68:161–166.

Sae-leaw, T., Benjakul, S. 2018. Lipase from liver of seabass (*Lates calcarifer*): characteristics and the use for defatting of fish skin. *Food Chem*, 240:9–15.

Sakate, P., Salunkhe, P. 2013. Study of lipase activity during development of *Chilo partellus* (Swinhoe). *Uttar Pradesh J Zool*, 33:61–68.

Salaberria, F., Palla, C., Carrin, M.E. 2017. Hydrolytic activity of castor bean powder: effect of gum arabic, lipase and oil concentrations. *J Am Oil Chem Soc*, 94:741–745.

Salaberria, F., Palla, C., Carrin, M.E. 2017. Hydrolytic activity of castor bean powder: effect of gum arabic, lipase and oil concentrations. *J Am Oil Chem Soc*. 94:741–745.

Salihu, A., Alam, M.Z. 2012. Production and applications of Microbial lipases: a review. *Sci Res Essays*, 7:2667–2677.

Salis, A., Bhattacharyya, M.S., Monduzzi, M., Solinas, V. 2009. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. *J Mol Catal B Enzymatic*, 57:262–269.

Sande, D., Souza, L.TA., Oliveira, J.S., Santoro, M.M., Lacerda, I.C.A., Colen, G., Takahashi, J.A., 2015. *Colletotrichum gloeosporioides* lipase: characterization and use in hydrolysis and esterifications. *Afr J Microbiol Res*, 9:1322–1330.

Sandhu, S.S., Sharma, A.K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., Jaglan, S., Sharma, A., Malhotra, S., 2012. Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism, and regulation. *J Pathogens*, 20:1.

Sanfilippo, C., Nicolosi, G., Patti, A., 2014. Milnacipran as a challenging example of aminomethyl substrate for lipase-catalyzed kinetic resolution. *J Mol Catal B Enzymatic*, 104:82–86.

- Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha, A. 2011.** Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview. *Res J Microbiol*, 6:1.
- Santos, L.D., Coutinho, J.A., Ventura, S.P. 2015.** From water-in-oil to oil-in-water emulsions to optimize the production of fatty acids using ionic liquids in micellar systems. *Biotechnol Prog*, 31:1473–1480.
- Saravanan, D., Anusuya, C., Divya, B.B., Usha, M. 2014.** Environmentally benign scouring of wool fibers using mesophile acidic lipase. *Fibers Polymers*, 15:1902–1907.
- Sarkar, S., B., Sreekanth, S. Kant, R. Banarjee, B.C. Bhattacharyya, 1998.** Production and optimization of microbial lipase. *Bioproc. Engineer*, 19: 29-32.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna, K.R., Sridhar, S., Mehtab, V., Sumana, C. 2018.** Recent advances on sources and industrial applications of lipase *Biotechnol. Prog*, 34 (1):5-27
- Savaghebi, D., Safari, M., Rezaei, K., Ashtari, P., Farmani, J. 2012.** Structured lipids produced through lipase-catalyzed acidolysis of canola oil. *J Agric Sci Technol*, 14:1297–1310.
- Schmidt-Dannert, C., Luisa Rua, M., Schmid, R.D. 1997.** Two novel lipases from the thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: Screening, purification, cloning, overexpression and properties. *Methods Enzymol*, 284:194–219.
- Schneider, L.M., Adamski, N.M., Christensen, C.E., Stuart, D.B., Vautrin, S., Hansson, M., Uauy, C., von Wettstein-Knowles, P. 2016.** The Cer-cqu gene cluster determines three key players in a betadiketone synthase polyketide pathway synthesizing aliphatics in epicuticular waxes. *J Exp Bot*, 67:2715–2730.
- Sekhon, A., Dahiya, N., Tewari, R.P., Hoondal, G.S. 2006.** Production of extracellular lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 in submerged fermentation. *Indian J. Biotechnol*, 5: 179–183.
- Selvam, K., Vishnupriya, B 2013.** Partial purification of lipase from streptomyces variabilis NGP 3 and its application in bioremediation of waste water. *Int J Pharm Sci Res*, 4:4281.
- Senanayake, S.N., Shahidi, F. 2002.** Lipase-catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into borage oil: optimization using response surface methodology. *Food Chem*, 77:115–123.
- Shariff, F.M., Leow, T.C., Mukred, A.D., Salleh, A.B., Basri, M., Rahman, R. 2007.** Production of L2 lipase by *Bacillus* sp. strain L2: Nutritional and physical factors. *J. Basic Microbiol*, 47: 406–412.
- Sharma N., Sharma P., Pathania S., Handa S. 2017.** Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergents industry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15: 369–377.
- Sharma, D., Sharma, B., Shukla, A. 2011.** Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*, 10:23–40.
- Sharma, N., Sharma, P., Pathania, S., Handa, S. 2017.** Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergents industry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 369–377.
- Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Jolly, R.S., Gupta, L.K., Gupta, J.K. 2002.** Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Ind J Microbiol*, 42:49–54.

- Sharma, S., Kanwar, S.S. 2014.** Organic solvent tolerant lipases and applications. *Sci World J*, 14:1.
- Shukla, A.K. 2014.** Biodiversity in *Aspergillus nidulans* group on the basis of lipases profile. *In IJSR*, 3:1391–1394.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta. J.K. 1997.** Strain improvement for the production of a thermostable α amylase. *Enzyme Microb. Technol*, 21: 525-530.
- Sifour, M., Saeed, H.M., Zaghloul, T.I., Berekaa, M.M., Abdel-Fattah, Y.R. 2010.** Isolation of Lipase Gene of the Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Strain-5. *Biotechnology*, 9:55–60.
- Sikora, A., Siodmiak, T., Marszał, M.P. 2014.** Kinetic resolution of profens by enantioselective esterification. *Chirality*, 26:663–669.
- Sinkuniene, D., Adlercreutz, P. 2014.** Effects of regioselectivity and lipid class specificity of lipases on transesterification, exemplified by biodiesel production. *J. Am Oil Chem Soc*, 91:1283–1290.
- Sirisha E., Rajasekar, N., Lakshmi, N.N., 2010.** Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. *Advances in Biological Research*, 4(5):249-252.
- Solomon A. Oyedelea, Adeyemi, O., Ayodejia, Olufemi, S., Bamidele, Joshua, O., Ajele, Temitope, B., Fabunmib. 2019.** Enhanced lipolytic activity potential of mutant *Bacillus niacini* EMB-5 Grown on Palm Oil Mill Effluent (POME) and biochemical characterization of purified lipase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18:101-117.
- Song, X., Qi, X., Hao, B., Qu, Y. 2008.** Studies of substrate specificities of lipases from different sources. *Eur J Lipid Sci Technol*, 110:1095–1101.
- Songs, Q.X., Lin, J.P., Rong, Y.P., Wei, D.Z., 2001.** Studies on lipase production from *Candida rugosa*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 17(1):101-104.
- Sonne, D.P., Vilsbøll, T., Knop, F.K. 2015.** Pancreatic amylase and lipase plasma concentrations are unaffected by increments in endogenous GLP-1 levels following liquid meal tests. *Diabetes Care*, 38: e71–e72.
- Strzelczyk, P., Bujacz, G.D., Kielbasinski, P., Błaszczyk, J. 2016.** Crystal and molecular structure of hexagonal form of lipase B from *Candida antarctica*. *Acta Biochim Polon*, 63:103–109.
- Su, E., Xu, J., You, P. 2014.** Functional expression of *Serratia marcescens* H30 lipase in *Escherichia coli* for efficient kinetic resolution of racemic alcohols in organic solvents. *J Mol Catal B Enzymatic*, 106:11–16.
- Su, J., Zhang, F., Sun, W., Karuppiiah, V., Zhang, G., Li, Z., Jiang, Q. 2015.** A new alkaline lipase obtained from the metagenome of marine sponge *Ircinia* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, 31:1093–1102.
- Suci, M., Arbianti, R., Hermansyah, H. 2018.** Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. *Earth and Environmental Science*, 105 (1):21-26.
- Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y. 1991.** Purification and Characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J. Biochem*, 109: 211–216
- Sulong, M.R., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B., Basri, M. 2006.** A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. *Protein Expr. Purif*, 49:190-195.

- Sunna, A., Hunter, L., Hutton C. A., Bergquist, P. L. 2002. Biochemical characterization of a re-combinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. *En-zyme Microb Technol*, 31: 472–476.
- Suwanno, S., Rakkan, T., Yunu, T., Paichid, N., Kimtun, P., Prasertsan, P., Sangkharak, K. 2017. The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst. *Fuel*, 195:82–87.
- Svendsen, A. 2000. Lipase protein engineering *Biochimica et Biophysica. Acta*, 1543: 223-238.
- Takac, S., Marul, B. 2008. Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Biotechnol. Ind J*, 35:1019–1025.
- Tambe, A., Vyasrayani, R., Datla, A., Ponrathnam, S., Demnerova, K. 2015. Macroporous poly (vinyl acetate-co-divinyl benzene) copolymer beads as adsorptive support for the direct immobilization of candida antarctica lipase B. *Enzyme Eng*, 4:2.
- Tambekar, D.H., Dhundale, V.R. 2012. Phylogenetic analysis of lipase producing bacteria using physiological and Molecular techniques from the lonar crater. *Inter. J. of Appl. Microbiology Science*, 1(2): 24-31.
- Thakur, S. 2012. Lipases, its sources, properties and applications: an Review. *Int J Sci Eng Res*, 3:1–29.
- Thanikaivelan, P., Rao, J.R., Nair, B.U., Ramasami, T. 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends Biotechnol*, 22:181–188.
- Thanikaivelan, P., Rao, J.R., Nair, B.U., Ramasami, T. 2007. Enzyme applications in leather processing. *Enzyme Mixtures Complex Biosynthesis*, 37
- Todd, A.E., Orenge, C.A., Thornton, J.M. 2001. Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective, *J. Mol. Biol*, 307:1113-1143.
- Todorova, T., Guncheva, M., Dimitrova, R., Momchilova, S. 2015. Walnut il–unexplored raw material for lipase-catalyzed synthesis of low-calorie structured lipids for clinical nutrition. *J Food Biochem*, 39:603–611.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M., Oliveira, J.V. 2010. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol*, 3:182–196.
- Tripathi, P., Niyonzima, F.N., More, S. 2013. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Prep. Biochem Biotechnol*, 45: 233–258.
- Van Der Walle, N. U. 1927. Ber synthetische Wirkung bakterieller Lipasen. *Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr*, 70:369-73.
- Vaquero, M.E., Barriuso, J., Martinez, M.J., Prieto, A. 2016. Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100:2047–2061.
- Veerapagu, M., Narayanan, A.S., Jeya, K.R., Alagendran, S. 2014. Isolation and identification of a novel lipase producing bacteria from oil spilled soil. *Int J. of Inn. Res. in Sci, Eng and Tech*, 12 (3): 18122- 18129.
- Xiang, Z.W., Liu, Z.Q., Chen, X., Wu, Q., Lin, X.F. 2013. Biocatalysts for cascade reaction: porcine pancreas lipase (PPL)-catalyzed synthesis of bis (indolyl) alkanes. *Amino Acids*, 45:937–945.

- Xiao, Z, Hou, X, Lyu, X., Zhao, J., Xi, L., Li, J., Lu, J.R. 2015.** Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid esters by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnol Lett*, 37:1671–1677.
- Xie, W., Khosasih, V., Suwanto, A., Kim, H.K. 2012.** Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. *J Microbiol Biotechnol*, 22:84–91.
- Xu, F., Wu, Q., Chen, X., Lin, X., Wu, Q. 2015.** A Single lipase-catalysed one-pot protocol combining aminolysis resolution and azamichael addition: an easy and efficient way to synthesise amino acid esters. *Eur J Organ Chem*, 20:5393–5401.
- Yan, J., Yan, Y., Liu, S., Hu, J., Wang, G. 2011.** Preparation of crosslinked lipase-coated micro-crystals for biodiesel production from waste cooking oil. *Bioresource Technol*, 102:4755–4758.
- Ye, L., Zhang, B., Seviour, E.G., Tao, K-x., Liu, X-h., Ling, Y., Chen, J-y., Wang, G-b. 2011.** Monoacylglycerol lipase (MAGL) knockdown inhibits tumor cells growth in colorectal cancer. *Cancer Lett*, 307:6–17.
- Zarringhalami, S., Ali, Sahari, M., Barzegar, M., Hamidi, E.Z. 2012.** Comparison of chemical and enzymatic interesterification of tea seed oil for the production of cocoa butter replacer. *Curr Nutr Food Sci*, 8:86–90.
- Zdarta, J., Jesionowski, T. Luffa. 2016.** cylindrica sponges as a thermally and chemically stable support for *Aspergillus niger* lipase. *Biotechnol Prog*, 32:657–665.
- Zhang, H. Zhang, F., Li, Z. 2009.** Gene analysis, optimized production and property of marine lipase from *Bacillus pumilus* B106 associated with South China Sea sponge *Halichondria rugosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 25: 1267–1274.
- Zheng, L., Xie, B.H., Chen, Y.L., Cao, J.F., Yang, Y., Guan, Z., He, Y.H. 2014.** Direct asymmetric aldol reactions catalyzed by lipase from porcine pancreas. *Zeitsch Naturforschung. C J Biosci*, 69:170-180.
- Zheng, P., Xu, Y., Wang, W., Qin, X., Ning, Z., Wang, Y., Yang, B. 2014.** Production of diacylglycerol-mixture of regioisomers with high purity by two-step enzymatic reactions combined with Molecular distillation. *J Am Oil Chem Soc*, 91:251–259.
- Zimmerman R.L., Cornoale J., Shaw S. 2014.** World Enzymes, BCC.
- Zin, N.B.M., Yusof, B.M., Oslan, S.N., Wasoh, H., Tan, J.S., Ariff, A.B., Halim, M. 2017.** Utilization of acid pre-treated coconut dregs as a substrate for production of detergent compatible lipase by *Bacillus stratosphericus*. *AMB Express*, 17:7.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Maoulida ABDOU
Doğum Yeri : Tsidje Komorlar
Doğum Tarihi : 27.12.1985

Eğitim Durumu

Lise : Groupe Scolaire Avenir
Lisans : Komor Üniversitesi
Yüksek Lisans : Gazi Üniversitesi
Doktora : Bursa Uludağ Üniversitesi
İletişim (e-posta) : maouabdou06@gmail.com

YAYINLAR:

Tuba Sevgi, Baran Enes Güler, Behice Zeren, Büşra Özalpar, Maoulida Abdou, Elif Demirkan (2017). Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının biyoremediasyonda kullanılma potansiyellerinin araştırılması. Ulusal Çevre, Deniz ve Kıyı Kirliliği Sempozyumu (UCEDKKS-2017), 10-12 Ekim, Bursa.

Elif Demirkan, Tuba Sevgi, Meltem Gokoz, Baran Enes Guler, Behice Zeren, Busra Ozalpar, Maoulida Abdou (2018). Strain Improvement by UV Mutagenesis for Protease Overproduction from *Bacillus subtilis* E6-5 and Nutritional Optimization. Journal of Biological and Environmental Sciences.12 (35):69-77

Alev Usta Ak, Elif Demirkan, Murat Cengiz, Tuba Sevgi, Behice Zeren, Maoulida Abdou (2019). Optimization of Culture Medium for the Production and Partial Purification and Characterization of an Antibacterial Activity from *Brevibacillus laterosporus* Strain EA62. Romanian Biotechnological Letters, Basımda

Elif Demirkan, Tuba Sevgi, Baran Enes Güler, Behice Zeren, Büşra Özalpar, Maoulida Abdou (2019). Türkiye topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının biyoremediasyonda kullanılma potansiyellerinin araştırılması. Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, Basımda.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Maoulida ABDOU
Tez Adı	<i>Bacillus sp.</i> suşlarından lipaz taranması, lipaz üretim koşullarının optimizasyonu, kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve deterjan endüstrisindeki potansiyel uygulamaları.
Enstitü	Fen Bilimleri
Anabilim Dalı	Biyoloji
Tez Türü	Doktora
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	☐ Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum ☐ Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin %10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum ☒ Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	☐ Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin Veriyorum

Hazırlamış olduğum tezin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih:12/07/2019

İmza: 