ERZURUM ILICA KAPLICALARINDAN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 İZOLATINDAN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU

Selma TARAKÇIOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2016
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZURUM ILICA KAPLICALARINDAN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 İZOLATINDAN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU

Selma TARAKÇIOĞLU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

ERZURUM ILICA KAPLICALARINDAN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 İZOLATINDAN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Selma TARAKÇIOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 29.../..06../2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı -Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/~~oy çokluğu~~ (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU *İmza* :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Arife Pınar EKİNCİ *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 14.../07.../2016 tarih ve .28../...20..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ERZURUM ILICA KAPLICALARINDAN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 İZOLATINDAN LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU

Selma TARAKÇIOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu çalışmada, Erzurum-Ilıca kaplıcalarından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. 16S rRNA sekans analizi sonucunda bu suşların; *Bacillus licheniformis, B. thermoamylovorans, Brevibacillus brevis, B. agri, B. borstelensis, Aeribacillus pallidus* türlerine ait olduğu belirlendi. Daha sonra tanılanan bu test suşları, tributyrin ve rhodamine agar besiyerine inoküle edildi. En büyük lipolitik zonu veren *B. thermoamylovorans* ST10 izolatı seçilerek, lipaz enziminin saflaştırması ve karakterizasyonu aşamasına geçildi. Q-Sepharose iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri kullanarak, lipaz enzimi %1,3 verimle 7,41 kat saflaştırıldı ve molekül ağırlığı yaklaşık 45,87 kDa olarak tespit edildi. Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla; *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*- nitrofenil oktaonat ve *p*- nitrofenil laurat substratları varlığında Km değerlerinin sırasıyla; 0,147 mM, 0,129 mM, 0,064 mM ve 0,055 mM, Vmax'ın ise; 0,256 U/mL, 0,140 U/mL, 0,093 U/mL ve 0,0356 U/mL olduğu gözlemlendi. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri ise sırasıyla, 80°C ve 9 olarak belirlendi. ST10'dan saflaştırılan lipaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi incelendiğinde; Zn^{2+} varlığında enzim aktivitesinin arttığı; Mn^{2+} ve Mg^{2+}'un varlığında azaldığı, K^{+}'un varlığında ise değişmediği gözlemlendi.

2016, 106 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik bakteri, 16S rRNA-PCR, Klonlama, Lipaz, Saflaştırma, Karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION, IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC BACTERIA TAKEN FROM ILICA THERMAL SPRINGS OF ERZURUM AND PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF LIPASE ENZYME FROM *Bacillus thermoamylovorans* ST-10

Selma TARAKÇIOĞLU

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

In this study, isolation of thermophilic bacteria from Erzurum-Ilica hot springs, Erzurum, Turkey was carried out. The obtained isolates were cahracterized by conventional and molecular methods. According to the results of 16S rRNA seguencing, these isolates were belonging to the species of *Bacillus licheniformis, B. thermoamylovorans, Brevibacillus brevis, B. agri, B. borstelensis, Aeribacillus palidus*. Then, it was passed to the purification and characterization step by selecting ST10 isolate as lipase producer with the largest zone in tributyrin and rhodamine agar medium. For this purpose,lipase enzyme was purified at 7,41-fold with a yield of 1,3%by Q-Sepharose ion-exchange and gel filtration chromatography and molecular weight of enzyme was found to be about 45.87 kDa. The Km and Vmax values for the enzyme was found by Lineweaver-Burk curve and in the presence of p-nitrophenyl acetate, p-nitrophenyl butyrate and p-nitrophenyl octanoate subtrates and Km values were 0,147 mM, 0,129 mM, 0,064 mM and 0,055 mM while Vmax were 0,256 U / ml, 0,140 U/ml, 0,093 U/ml and 0,0356 U/ml, in order. The optimum temperature and pH for the enzyme was determined as 80°C and 9. When the effect of certain metal ions on lipase belong to *B. thermoamylovorans* is analyzed; increased enzyme activity in the presence of Zn^{2+}; decreased activity in the presence of Mn^{2+} and Mg^{2+} and unaffected activity in the presence of K^{+} was observed.

2016, 106 pages

Keywords: Thermophilic bacteria, 16S rRNA-PCR, Cloning, Lipase, Purification, Characterization

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamda katkı ve fikirleriyle bana yol gösteren danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, deneyimlerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU, Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU, Sayın Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Arife Pınar EKİNCİ'ye, laboratuvardaki çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan ve asla unutmayacağım yardımları için Sayın Yeliz DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çok yardımını gördüğüm grup arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Berna GENÇ, Sayın Arş. Gör. M. Özkan BALTACI'ya, Bilge SARI, Sümeyye ASLAN ve Damla RÜZGAR'a çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında maddi manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim sevgili babam Ekrem TARAKÇIOĞLU ve annem Emine TARAKÇIOĞLU'na kardeşlerim olmasından mutluluk duyduğum Sadık ve Sümeyye TARAKÇIOĞLU'na hep yanımda oldukları için sonsuz sevgilerimi sunarım.

Desteklerini her zaman hissettiğim, beni bugüne kadar yalnız bırakmayan arkadaşlarıma dostluklarından ötürü teşekkür ederim.

Selma TARAKÇIOĞLU
Temmuz, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
1. GİRİŞ 1
1.1. Lipazların Kullanım Alanları 18
2. KAYNAK ÖZETİ 25
3.MATERYAL ve YÖNTEM 35
3.1. Materyal 35
3.1.1. Kimyasallar 35
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar 35
3.1.3. Çözeltiler 36
3.1.3.a. Bakteri izolasyonu ve tanimlanmasi sirasinda kullanilan çözeltiler 36
3.1.3.b. Lipaz aktivite tayini için kullanılan çözeltiler 37
3.1.3.c. Doğal PAGE için kullanılan çözeltiler 38
3.1.3.d. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler 38
3.1.3.e. Q-Sepharose iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözelti 39
3.1.3.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözelti 39
3.1.3.g. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler 40
3.1.3.h. Kinetiğinin çalişilmasi için kullanılan çözeltiler 40
3.1.4. Besiyerleri 41
3.1.5. Kitler 42
3.2. Yöntem 42
3.2.1. Örneklerin toplanması 42
3.2.2. Termofilik bakterilerin izolasyonu 42
3.2.3. Termofilik bakterilerin kantitatif taraması 42

3.2.4. Test suşlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi 43
3.2.4.a. Hücre morfolojisi 43
3.2.4.b. Koloni morfolojisi 43
3.2.4.c. Gram boyama 43
3.2.4.d. Endospor varlığının belirlenmesi 44
3.2.4.e. Bakterilerin yaşayabildikleri tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi 45
3.2.4.f. Bakterilerin yaşayabildikleri sıcaklık değerlerinin belirlenmesi 45
3.2.4.g. Bakterilerin yaşayabildikleri pH değerlerinin belirlenmesi 45
3.2.4.h. Oksidaz testi 45
3.2.4.ı. Katalaz testi 46
3.2.4.i. Nitrat üretimi testi 46
3.2.4.j. Amilaz testi 46
3.2.4.k. Proteaz testi 47
3.2.4.l. Ksilanaz testi 47
3.2.4.m. Selülaz testi 47
3.2.5. Moleküler testler 47
3.2.5.a. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması 47
3.2.6. Enzim saflaştirilmasi ve karakterizasyonu çalişmalari 54
3.2.6.a. Lipaz enzim üreten bakterilerin tribütirin agar besiyerinde belirlenmesi 54
3.2.6.b. Lipaz enzim üreten bakterilerin rhodamine B agar besiyerinde belirlenmesi 55
3.2.7. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 suşunun büyütülmesi 55
3.2.8. Hücre içi lipazin eldesi 56
3.2.9. Enzim aktivite yöntemi 56
3.2.10. Kantitatif protein tayini 56
3.2.11. Kalitatif protein tayini 57
3.2.12. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 lipaz enziminin saflaştırma aşamaları 57
3.2.12.a. Q-Sepharose iyon değişim kromatografisi 57
3.2.12.b. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi 58

3.2.13. Doğal poliakrilamid jel elektroforezi (doğal PAGE) 59
3.2.14. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile lipaz enzim safliğinin kontrolü..... 60
3.2.15. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) İle lipaz enziminin molekül kütlesi tayini..... 62
3.2.16. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 lipaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu 62
3.2.16.a. Lipaz enzimi için optimum pH ve stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar 62
3.2.16.b. Lipaz enzimi için optimum sicakliğin ve stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar..... 63
3.2.16.c. Lipaz enzimi substratlari için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasina yönelik çalişmalar 64
3.2.16.d. Bazı kimyasallar, deterjanlar ve metal iyonlarinin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemeye yönelik çalışmalar..... 64
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 66
4.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu..... 66
4.2. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 66
4.3. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu..... 68
4.4. Amplifiye Edilen 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması..... 68
4.5. İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizilerine Göre Benzerlik Oranları 69
4.6. Enzim Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Çalışmaları..... 72
4.6.1. Lipaz enzim üreten bakterilerin tribütirin agar besiyerinde belirlenmesi..... 72
4.6.2. Lipaz enzim üreten bakterilerin rhodamine B agar besiyerinde belirlenmesi..... 72
4.6.3. İntraselüler lipazin eldesi..... 73
4.6.4. Saflaştırma aşamaları 74
4.6.4.a. Q-Sepharose iyon değişim kromatografisi 74
4.6.4.b. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi 75
4.6.4.c. Doğal poliakrilamid jel elektroforezi (Doğal PAGE)..... 76

4.6.4.d. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) 77
4.6.4.e. Enzimin biyokimyasal karakterizasyonu 79
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 90
KAYNAKLAR 98
ÖZGEÇMİŞ 107

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Absorbans
APS	Amonyum Persülfat
B -	*Bacillus*
bç	Baz çifti
DEAE	Dietilaminoetil
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten sabiti
LB	Luria-Bertani
LB-A	Luria-Bertani Agar
M	Molarite
Ma	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MOPS	3-(N-morfolino)propan sülfonik asit
nm	Nanometre
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimerase Chain Reaction
PER	Amonyum per sülfat
*p*NP	*p*-nitrofenil
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyumdodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
U	Enzim Ünitesi
U/mg	Spesifik aktivite
V_{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Lipazların hidroliz ve sentez mekanizması 9
Şekil 1.2. Lipazların α-sarmal ve β-yaprak yapılarının şematik gösterimi 14
Şekil 4.1. 16S rRNA PCR görüntüsü 68
Şekil 4.2. Koloni PCR görüntüsü 69
Şekil 4.3. Filogenetik ağaç 71
Şekil 4.4. Tribütirin agar petrisindeki ST-10 izolatının lipaz aktivite görüntüsü 72
Şekil 4.5. Rhodamine B agar petrisindeki ST-10 suşunun lipaz aktivite görüntüsü 73
Şekil 4.6. Q- Sepharose kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve aktivite değerleri 74
Şekil 4.7. Sephadex G-100 kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve aktivite değerleri 75
Şekil 4.8. Doğal PAGE elektroforezi 77
Şekil 4.9. SDS-PAGE elektroforezi 78
Şekil 4.10. Lipaz enziminin molekül kütle grafiği 78
Şekil 4.11. p-nitrofenil asetat substratı varlığında, enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 79
Şekil 4.12. p-nitrofenil oktaonat substratı varlığında, enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 80
Şekil 4.13. p-nitrofenil laurat substratı varlığında, enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 80
Şekil 4.14. p-nitrofenil decanoate substratı varlığında, enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 81
Şekil 4.15. B. thermoamylovorans ST-10 lipazının +4°C'de ki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği 82
Şekil 4.16. p-nitrofenil asetat substratı varlığında lipaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği 83
Şekil 4.17. B. thermoamylovorans ST-10 lipazının 40, 50 ve 60°C'de ki ısıl kararlılığının zamana göre değişimi grafiği 84

Şekil 4.18. Lipaz enzimi için p-nitrofenil asetat substratı varlığında Lineweaver -Burk grafiği 85
Şekil 4.19. Lipaz enzimi için p-nitrofenil bütirat substratı varlığında Lineweaver -Burk grafiği 85
Şekil 4.20. Lipaz enzimi için *p*-nitrofenil oktanat substratı varlığında Lineweaver -Burk grafiği 86
Şekil 4.21. Lipaz enzimi için p-nitrofenil laurat substratı varlığında Lineweaver -Burk grafiği 86
Şekil 4.22. Bazı metal iyonlarının B. thermoamylovorans ST-10 aktivitesi üzerine etkisi 87
Şekil 4.23. Bazı deterjanlar B. thermoamylovorans ST-10 lipazinin aktivitesi üzerine etkisi 88
Şekil 4.24. Bazı kimyasallarin B. thermoamylovorans ST-10 lipazinin aktivitesi üzerine etkisi 89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Lipazların katalizlediği reaksiyonların gösterimi 8
Çizelge 1.2. Lipaz üreten mikroorganizmalar..... 16
Çizelge 1.3. Mikrobiyal lipazların endüstriyel kullanım alanları 24
Çizelge 3.1. 16S rRNA PCR bileşenleri 49
Çizelge 3.2. PCR programı 49
Çizelge 3.3. Ligasyon bileşenleri..... 51
Çizelge 3.4. Koloni PCR bileşenleri 52
Çizelge 3.5. Koloni PCR reaksiyon koşulları 53
Çizelge 3.6. Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları 59
Çizelge 3.7. SDS-PAGE'de kullanılan bileşenler ve oranları 61
Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri..... 67
Çizelge 4.2. Test suşlarının 16S rRNA benzerlik oranları..... 70
Çizelge 4.3. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10'dan saflaştırılan lipaz enzimine ait saflaştırma tablosu..... 76
Çizelge 4.4. Lipaz enzimi için K_M ve V_{max} değerleri..... 87

1. GİRİŞ

Dünya üzerindeki mikrobiyal yaşam, yüksek yapılı organizmaların oluşumundan yaklaşık 3–3,7 milyon yıl önce varolmuş ve farklı ekosistemlere uyum sağlayarak evrim sürecine girmiştir (Madigan *et al.* 2000). Özellikle mikroorganizmalar, ekstrem koşullara kolayca adapte olabildiğinden yalnızca hava, toprak, göl ve denizlerden değil, buzullardan, yanardağlara; solfatarik alanlardan hidrotermal kuyulara, alkali ortamlardan, yüksek asidik ortamlara kadar çok geniş alanlardan izole edilmiştir (Gillian *et al.* 2001).

Biyosferin önemli bir kısmını mikroorganizmalar oluşturmasına rağmen büyük bir çoğunluğu henüz tanımlanamamıştır. Modern moleküler yöntemlerin keşfiyle birlikte mikroorganizmalar üzerine gerçekleştirilen araştırmalarda büyük ilerlemeler kaydedilmiş ve sonuçta canlılar 16S ve 18S rRNA bölgelerine göre Bakteria, Archaea ve Eucarya olarak üç domaine ayrılmıştır (Wosse *et al.* 1990; Gupta 1998; Madigan *et al.* 2000).

Yapılan filogenetik incelemeler sonucunda Archaea ve Bacteria'nın prokaryot grubu içerisinde yer almasına rağmen birbirinden farklı olduğu ve Archaea'lar ile Eukaryotlar'ın atalarının yakın akraba oldukları tespit edilmiştir (Gupta 1998). Ancak, Ökaryotların aksine Bakteriler ve Arkeaların çok yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiği saptanmış, bu da bilim insanlarının ilgisini sıcak çevreler ve burada yaşayan organizmaları merak etmesine sebep olmuştur (Madigan *et al.* 2000). Yapılan çalışmalarda ekstrem çevrelerde yaşayan bu canlıların sadece %1'lik kısmı kültüre edilebilmiştir (Kıvanç 2008). Mikroorganizmalar yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için çeşitli stres faktörlerine uyum sağlamak zorundadırlar. Organizmaların gelişimini etkileyen her bir faktör, aynı zamanda onların biyolojik ve ekolojik gruplarını da belirler. Sıcaklık canlıların evrimi ve hayatsal faaliyetlerini kontrol eden en önemli çevresel faktörlerden biridir (Kristjansson and Hreggvidsson 1995; Son 1999; Skirnisdottir 2000). Mikroorganizmalar optimum büyüme sıcaklıklarına göre psikrofiller (20°C altında), mezofiller (20-45°C) ve termofiller (45°C üzeri) olarak üç

ana gruba ayrılırlar (Gomes and Steiner 2004). Bunların yanı sıra Kristjansson ve Stetter (1992) termofil grubu daha da genişleterek 60-80°C arasında üreyenler için ekstremofil, 80°C'nin üzerinde üreyenler için ise hipertermofil terimlerini kullanmıştır (Gomes and Steiner 2004) .

Ekstremofil mikroorganizmalar ise daha da genişletilerek; Termofiller (Thermophiles), Metalofiller (Metalophiles), Psikrofiller (Psychrophiles), Alkalifiller (Alkaliphiles), Halofiller (Halophiles), Asidofiller (Acidophiles), Barofiller (Barophiles) gibi terimlerle ifade edilmiştir (Demirjian *et al.* 2001). Arkea (Archeae) grubu mikroorganizmalar ise genellikle ekstrem termofiller grubuna dahil edilmiştir (Rothschild and Mancinelli 2001).

Son yıllarda ekstremofilik mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalarda en büyük payı termofilik mikroorganizmalar dikkat çekmektedir. Bu mikroorganizmaların ise daha çok ekolojik fonksiyonları, enzimleri ve biyoteknolojik potansiyelleri üzerine bu araştırmalar yoğunlaşmaktadır (Gomes and Steiner 2004). Termofilik mikroorganizmaların identifikasyonunda morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin uzun zaman alması, fazla iş gücü gerektirmesi, tecrübeli araştırmacılara ihtiyaç duyması ve alınan sonuçlarında farklı yorumlara açık olmasından dolayı, tanılamada kullanılmak üzere güvenilirliği daha fazla olan moleküler teknikler geliştirilmiştir (Miller *et al.* 1993; Manceau and Horvais 1997; Beldüz vd 2003; Adiguzel vd 2006; Baltaci vd 2016). Son zamanlarda 16S rRNA dizi analizi temel alan çalışmalarda; *Bacillus* cinslerinin *Amphibacillus, Alicyclobacillus, Paenibacillus, Aneurinibacillus and Brevibacillus, Halobacillus, Virgibacillus, Gracilibacillus, Sulfobacillus and Salibacillus, Anoxybacillus, Coprobacillus, Thermobacillus, Filobacillus, Geobacillus, Ureibacillus, Jeotgalibacillus, Sulfobacillus and Marinibacillus* (Rahman *et al.* 2004; Marchant *et al.* 2004; Bae *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005) gibi üyelerinin olduğu gözlemlenmiştir. Bilim insanları yeni izolatları taksonomiye kazandırmaya ve bu termofilik bakterilerin, endüstriyel ve termostabil enzim kaynağı olarak biyoteknolojik önemlerini ortaya koymaya devam etmektedir (Harwood 1989; Maugeri *et al.* 2001).

Dünya'nın farklı bölgelerindeki jeotermal alanlardan alınan örnekler kullanılarak yapılan çok sayıda identifikasyon çalışması bulunmaktadır. Türkiye'de (Beldüz vd 2003; Dulger vd 2004; Gul-Guven vd 2008, Adiguzel vd 2011; Adiguzel vd 2015), Italya'da (Tenreiro *et al.* 1995; Maugeri *et al.* 2001), Bulgaristan'da (Derekova *et al.* 2007; Atanassova *et al.* 2008;Derekova *et al.* 2008), Yunanistan'da (Sievert *et al.* 2000), China (Li and Zhang 2005; Lau *et al.* 2009), Hindistan'da (Ghosh *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2008), Yellowstone Ulusal Park (Miller *et al.* 2006; Boomer 2009) and İzlanda'da (Skirnisdottir 2000; Marteinsson *et al.* 2001; Takacs *et al.* 2001) bunun birçok örneği vardır.

Termofilik mikroorganizmaların mezofilik mikroorganizmalara göre yüksek üreme hızları ve kapasiteleri, son ürünün kolay kazanılması, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında yüksek işlem stabilitesi ve verimi, nişasta selüloz gibi doğal polimerleri doğrudan fermente edebilmeleri, yüksek biyosentetik aktiviteleri gibi birçok avantajları bulunmaktadır (Panikov *et al.* 2003; Brock 2010). Bu organizmalar, yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için denatüranlara ve proteolizlere karşı direçli olan saperon olarak adlandırılan özelleşmiş proteinler içerirler. Bunlar, proteinlerin düzgün katlanarak eski doğal yapılarını geri kazanmalarını sağlar. Ayrıca termofillerin hücre duvarında, hidrofobik bir ortam oluşturarak hücrelerin sert bir yapı kazanmasını ve böylece yüksek sıcaklıklara dayanmasını sağlayan doymuş yağ asitleri bulunur. Bunların yanı sıra termofillerde DNA giraz enzimi, pozitif süper sarmal oluşturarak DNA'nın ergime noktasını yükseltir, ayrıca elektrostatik disülfit köprüsü ve hidrofobik etkileşimleri de artırarak yüksek sıcaklılara toleransı sağlar (Haki 2003).

Termofilik bakterilerin karakterizasyonu ile ilgili yapılan ilk çalışma 1888'de Miquel tarafından aerobik, sporlu ve 70°C'de üreyen bakterilerin keşfi ile olmuştur. Daha sonra ise birçok sporlu bakteri izole edilmiştir ki bunların çoğunluğu da *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine aittir. *Methanobacterium thermoautotrophicum* ise tanımlanan ilk spor oluşturmayan termofil anaerob bakteridir. (Zeikus and Wolfe 1972). Farklı sıcaklık değerlerinde yaşayan çok sayıda ekstrem termofil bulunmaktadır. Örnek olarak;

60-80°C'de gelişebilen *Bacillus, Clostridium, Thermoanaerobacter, Thermus, Fervidobacterium* ve *Thermodesulfobacterium* üyeleri 80-110ºC arasındaki sıcaklıklarda gelişebilen *Aquifex, Thermocrinis* ve *Thermotoga* cinsine ait hipertemofillerde *Desulfurococcus, Acidianus, Sulfolobus, Pyrodictium, Pyrobaculum, Thermoproteus, Methanopyrus, Pyrococcus, Staphylothermus, Ferroglobus, Thermococcus, Methanococcus ve Archaeoglobus'*a ait cinsinin üyelerinin yer aldığı arkea grubu mikroorganizmalar verilebilir (Brock 2010).

Oldukça ekstrem sıcaklık ve çevre şartlarında yaşamaya uyum sağlamış olan termofilik bakterilerin ürettiği enzimler de ekstrem koşullarda fonksiyonel olabildiği için günümüz biyoteknolojik ve endüstriyel alanda geniş bir uygulama alanına sahiptir (Nazina *et al.* 2005). Son yıllarda bu enzimlerden bazıları başarılı bir şekilde bakterilerden saflaştırılmış ve klonlanmıştır (Tarakçıoğlu 1979; Aguilar 1996; Banerjee and Sarkar 2003; Kiran *et al.* 2008). Çoğunluğu *Thermus* ve *Bacillus stearothermophilus* türlerine ait olmak üzere 2400'ün üzerinde endonükleaz enzimi identifiye edilmiş ve bunların da 220'sinin farklı özellikte olduğu bildirilmiştir (Welch and Williams 1995).

Dünya'da ekstrem şartlar ve jeotermal alanların yoğunluğu dikkate alındığında, Türkiye bu kaynaklar bakımından oldukça zengin bir ülkedir. İlbank'ın 2010 yılı verilerine göre ülkemizde 20-242°C sıcaklıklara 1500 ün üzerinde sıcak su kaynağı ve 186 adet jeotermal saha bulunmaktadır. Ancak ülkemizdeki değişik coğrafyalarda bulunan termal kaynakların mikroorganizma florasının belirlenmesi ve bunlardan endüstride kullanım potansiyeli olan türlerin saptanması üzerine yapılmış olan bilimsel çalışma sayısı oldukça sınırlıdır (Dulger vd 2004; Baltaci vd 2016).

Üzerinde en fazla çalışma yapılan termofilik bakteri gruplarından en önemlisi *Bacillus* cinsinin üyeleri oluşturur. Bu organizmalar genellikle Gram-pozitif, aerobik, çubuk şekilli bakteriler olup endospor oluştururlar. Bu cinsin üyeleri endospor oluşturduklarından elverişsiz koşullara dayanıklıdırlar. Bu organizmalar; enzim, antibiyotik, çeşitli biyokimyasal maddeler ve insektisitlerin üretiminde sahip oldukları yüksek metabolik çeşitlilikten dolayı bilimsel araştırmalarda çokça tercih edilmektedir.

Bacillus cinsi, hızlı ve kolay üreme, çok çeşitli karbon, nitrojen kaynaklarını ve farklı substratları kullanabilme, yüksek verimde ürün oluşturma ve ekonomik üretim kapasitesine sahip olma gibi yetenekleri sayesinde endüstriyel enzim üretiminde birçok alanda tercih edilmektedir. Ayrıca bu gruba dahil organizmalar, topraktan, tatlı su ve denizlerden, bitki rizosferlerinden, gıdalardan, bazı canlıların bağırsak sistemlerinden ve hatta bazı böcek larvalarından da izole edilebildiği gibi bazı türleri ekstrem şartlarda büyüyebildiğinden farklı pH ve sıcaklığa sahip ekstrem koşullardan da izole edilebilmektedir (Sneath *et al.* 1986; Harwood 1989).

Enzimler; tüm canlı hücrelerde reaksiyonları yöneten, organizmaların yaşamasını ve çoğalmasını sağlayan, kompleks organik maddelerdir. Enzimlerle katalizlenen tepkimelere katılan kimyasal moleküllere ise substrat denir. Enzimin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısına göre substrat ile enzim veya enzimin izomeri tepkimeye girer ve buna da enzim spesifikliği denir (Mert 1994; Erkaya 2006). Ayrıca enzimler protein yapıda moleküller olup, bir protein ve buna bağlı bir prostetik gruptan oluşur. Enzim kelimesi ilk olarak 1878'de Kühna tarafından kullanılmış olup Yunanca "maya" anlamına gelmektedir (Aehle 2004). Enzimin mikrobiyal olarak üretimi, fungal kaynaklardan 20. yüzyılın başında gerçekleşirken, bakteriyel kaynaklı enzimler ise 1. Dünya savaşı sırasında litertüre kazandırılmıştır (Topal 1985). En yaygın olarak bilinen enzim *T. aquaticus* dan izole edilen Taq DNA Polimerazdır (Madigan *et al.* 2000).

Endüstriyel önemi olan reaksiyonlar genellikle çok daha kolay bir şekilde oda sıcaklığında, sulu ortamda, atmosferik basınç ve nötral pH gibi ılımlı koşullarda, katalitik etkinliğe sahip biyokatalizörler tarafından gerçekleştirilir. Enzimlerin de endüstriyel önemi göz önüne alındığında, hücrede meydana gelen milyonlarca reaksiyonun özgünlüğünü ve hızını düzenledikleri gibi, hücre dışında da kimyasal katalistler olarak da görev alabilirler (Erdem 2008).

Dünya nüfusu arttıkça çevre kirliliği, hastalıklar, açlık gibi pek çok sorun ortaya çıkmakta ve bunların sonucu olarakta çeşitli ihtiyaçlar doğmaktadır. İnsanlar bu ihtiyaçlarını gidermek ve hayatlarını kolaylaştırmak için çeşitli çözüm yolları ararlar.

İşte tam bu noktada enzimlerin geleneksel işlemlere göre daha az atık madde oluşturarak çevre dostu olması, daha ekonomik ve uygun özellik taşıması pek çok reaksiyona spesifik olacak şekilde, hızlı ve kolayca gerçekleştirmesi gibi özellikleri bilim insanlarını bu konuya yönlendirmiştir. Ayrıca, birçok endüstriyel ürün ve proses için büyük önem taşıyan uygun biyokatalizörlerin geliştirilmesi ve kararlılık, bölge ve enantiyo seçicilik gibi farklı enzim özelliklerinin optimize edilmesi üzerine de çalışmalar yapılmaktadır. Enzim teknolojisinin gelişmesi sonucu, enzimler farmasötik, gıda, deterjan, kağıt, tekstil, deri ve kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmakta ve artan önemlerinden dolayı ticari olarak üretilmektedir. Endüstriyel enzim pazarında en önemli yeri ise, lipaz, proteaz, amilaz ve esteraz gibi çeşitli hidrolitik enzimler tutmaktadır (Pandey *et al.* 1999; Jaeger 2002; Kirk *et al.* 2002; Houde *et al.* 2004; Kiran *et al.* 2008; Sharma *et al.* 2008; Kaur *et al.* 2016). Bunlardan; proteazlar dericilik, katalaz sterilizasyon ve soğuk pastörizasyon, pepsin ve rennin peynir üretimi, laktaz (β-galaktosidaz) peynir atık suyu ve sütteki laktozun hidrolizi; pektinazlar meyve suyu, sirke ve şarap berraklaştırma, penisilin amidaz penisilin üretimi endüstrisinde kullanılan enzimlerdir (Telefoncu 1997).

Biyoteknolojinin önemi, ticari olarak kullanılan ürünlerin tespiti ve üretiminin gerçekleştirilmesi amacıyla yapılan çalışmaların hız kazanmasıyla birlikte her geçen gün daha da artmaktadır. Günümüzde dünyadaki yaklaşık 1200 biyoteknoloji şirketinin 900 ü Amerika Birkeşik Devletlerinde (A.B.D.) çalışmalarını sürdürürken bu sayı 1985 yılında 400, 1983'te ise 300 civarındaydı. Halen Dünyada, A.B.D., Japonya, Kanada gibi gelişmiş birkaç ülke dışında diğer ülkeleri tamamen dışa bağımlıdır (Glıck and Pasternak 1994). Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı 1,4 milyar dolar civarındadır ve yılda %10'un üzerinde pazar payı artışı ve %4-5 oranında ise satış artışı ile giderek gelişme göstermektedir. Dünyada kullanılan tüm enzimler içerisinde mikrobiyal enzimlerin kullanım değerlerine bakıldığında; alkali proteazların %25, diğer proteazların %21, amilazların %18, rennin %10, tripsin'in %3, lipaz'ın %3 ve diğer karbohidrat parçalayan enzimlerin %10 oranında tercih edildiği görülmektedir (Rao *et al.* 1998). Dünya ölçeğinde biyoteknolojik olarak üretilen ürünlerin pazarlardaki payları

ise; tarım (%3), ilaç-kit (%7), antibiyotik (%12), gıda sektörü (%77) sektörlerine aittir (Kolankaya 2000.).

Ekstremofilik mikroorganizmalardan elde edilen, aktivite ve stabilite için farklı sıcaklık, iyonik şiddet gibi ekstrem koşullara adaptasyon sağlayan enzimlere ekstremozimler denir (Hough and Danson 1999). Termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalardan elde edilen bu enzimlerin bir türü de termozimlerdir. Bu enzim sınıfı 60-120°C arasındaki yüksek sıcaklıklarda aktiftirler ve geri dönüşümsüz denatürasyonlara karşı dirençlidir (Zeikus and Wolfe 1972). Laktat dehidrogenaz, CoA sentetaz, Malat dehidrogenaz, tRNA metil transferaz, İzositrat dehidrogenaz, Pullulanaz, 3-izopropanol dehidrogenaz, Ferrodoksin, İnorganik fosfotaz, GALP dehidrogenaz, L-alanin dehidrogenaz, NADH dehidrogenaz, Proteaz, NADH oksidaz, Katalaz, Superoksit dismutaz, Sitokromlar, RNA polimeraz, DNA polimeraz, Amilaz, Glikozidaz, Asparginaz, Alkalin fosfotaz, Ribonükleaz, ATPaz, DNA endonukleaz, Anthranilat sentetaz, DNA ligaz Enolaz, Fumaraz, Tripton sentetaz, D-Ksiloz isomeraz, Aminoaçilsentetaz, termal stabiliteye sahip enzimlerin birkaçıdır (Colacino 1997). Ekstremozimler, ekstremofilik olmayan enzimlerin aktivite gösteremediği koşullarda da fonksiyonel olmalarının yanı sıra eşsiz ve önemli bazı biyokatalistleri de üretebilirler. Ekstremofil ve hipertermofil mikroorganizmalardan selülaz, amilaz, ksilanaz, lipaz, fitaz, esteraz, gibi ekstrem koşullarda aktivite gösteren enzimlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve endüstriyel işlemler için yeni imkanlar sağlanmıştır (Haki 2003). Ayrıca termoaktivite ve termostabilitenin tam olarak anlaşılabilmesi için, bu enzimler protein mühendisliğinde model enzimler olarak kullanılmaktadır (Kumar and Nussinov 2001; Sterner and Liebl 2001).

Biyoteknolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi; organik bileşiklerin çözünürlüğünün artması ve biyolojik olarak kullanılabilme gibi pek çok avantaj sağlamaktadır. Sıcaklığın artması sonucu viskozite düşer ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısı artarak, oldukça küçük alanlarda yüksek hızda reaksiyon gerçekleştirilir. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda enzimatik reaksiyon, reaktörlerindeki patojen kontaminasyonu riski azalır. Bu gibi avantajlarından dolayı ekstremofilik

mikroorganizmalardan ekstremofilik enzimlerin saflaştırılması, karakterizasyonu ve endüstriyel alanda uygulanabilirliğinin tespitine yönelik çalışmalarda önemli artşlar olmuştur (Imamura 2000; Kiran *et al.* 2008).

Bu enzimlerden, termofilik lipazlar, organik çözücülere ve endüstriyel ve kimyasal proseslerdeki yüksek reaksiyon sıcaklıklarına ve kimyasal denatüranlara karşı oldukça yüksek aktivite ve yüksek termostabilite gösterirler. Lipazlar (E.C.3.1.1.3; trigliserol açilhidrolazlar), triaçilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 1.2.) (Sharma *et al.* 2008). Bu enzim, Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komitesi'nin belirlediği enzim sınıflandırmasında hidrolazlar (EC. 3), ester bağlarını parçalayanlar (EC. 3.1), karboksilik ester hidrolazlar (EC. 3.1.1) ve triaçilgliserol hidrolazlar (EC. 3.1.1.3) içinde yer almaktadır (Anonim 1992). Lipazlar;

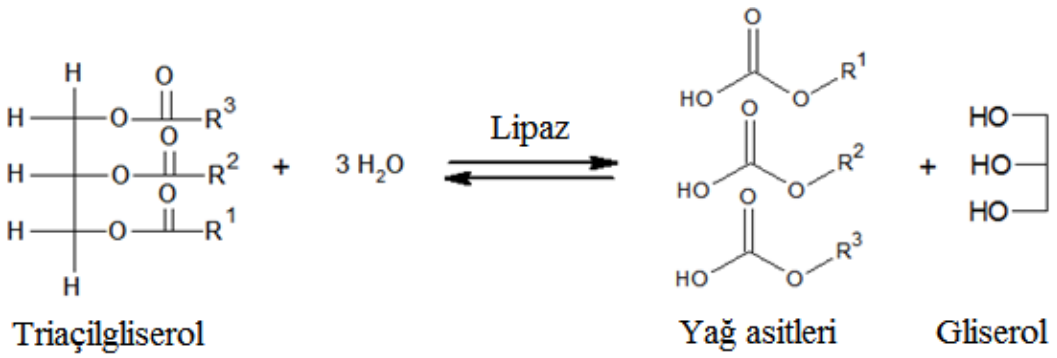
- Su oranının fazla olduğu ortamlarda meydana gelen hidroliz,
- Susuz veya düşük oranda su bulunan ortamlarda gerçekleşen esterifikasyon ve
- Bir esterin asit kısmının, diğeriyle yer değiştirdiği transesterifikasyon olmak üzere

3 tip reaksiyonu katalizlerler. Transesterifikasyon reaksiyonları da kendi içerisinde asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz ve aminoliz şeklinde gruplandırılırlar (Divakar *et al.* 2010).

Çizelge 1.1. Lipazların katalizlediği reaksiyonların gösterimi (Rahman vd 2006)

$R_1COOR_2 + H_2O$	Hidroliz →	$R_1COOH+R_2OH$
$R_1COOH + R_2OH$	Esterifikasyon →	$R_1COOR_2 + H_2O$
$R_1COOR_2 + R_3COOR_4$	İnteresterifikasyon →	$R_3COOR_2 + R_1COOR_4$
$R_1COOR_2 + R_3COOH$	Asidoliz →	$R_3COOR_2 + R_1COOH$
$R_1COOR_2 + R_3OH$	**Alkoliz →**	**$R_1COOR_3 + R_2OH$**
$R_1COOR_2 + R_3NH_2$	**Aminoliz →**	**$R_1CONHR_3 + R_2OH$**

Aktivitesi serin, histidin ve aspartat/glutamattan oluşan üçlü bir katalitik içerik ve α/β hidrolaz katlanmasına dayanmakta olan lipazlar serin hidrolazlar ailesine aittir (De Pascale *et al.* 2008).



Şekil 1.1. Lipazların hidroliz ve sentez mekanizması (Jaeger 2002)

Spesifitelerine göre lipazlar; 1) Yağ asidi spesifitesine sahip lipazlar 2) Pozisyonel ve stereospesifiteye sahip lipazlar, 3) Spesifik olmayan lipazlar (Pandey *et al.* 1999; Marangoni *et al.* 2002) olmak üzere 3'e ayrılır.

Yağ asidi spesifik lipazlar; açilgliseridlerde bulunan spesifik olduğu yağ asitlerinin ester bağlarını hidrolizler. Bu lipazlar genellikle interesterleşme reaksiyonlarında kullanılarak hedeflenen özel organik bileşikler elde edilebilmektedir. Uzun zincirli bir yağ asidine özel *Geotrichum candidum* lipazı bu tür lipazlardandır (Baillargeon and Sonnet 1991). Pozisyonel ve stereospesifiteye sahip lipazlar; 1 ve/veya 3 pozisyonlarından spesifik olarak nötral yağları katalizlerler. Reaksiyon sonunda kararsız mono-diaçilgliseridler ve yağ asitleri oluşarak (1,3)-diaçilgliseridlere ve 1 veya 3-monoaçilgliseridlere izomerleşirler. Sonuçta oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılarak, spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseridleri, gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalayabilir. *Aspergillus niger*, Pankreas, *Rhizopus* sp., *Pseudomonas fluorescens, Humicola lanuginosa,* ve *Mucor* sp. türlerinden elde edilen lipazlar bu tür lipazlardır (Haas 1992).

Spesifik olmayan lipazlar ise trigliseridlerin bütün ester bağlarını hidrolizleyerek reaksiyon sonucunda trigliseridlerden, gliserin ve serbest yağ asitleri ve ara ürün olarakta diaçil ve monoaçil gliseridler oluşturur. *Corynebacterium acnes, Candida cylindracae* ve *Staphylococcus aureus* lipazları bu gruptadır (Faiz 2005; Sağ Açıkel ve Çelebi 2006).

Lipazlar yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinn pozisyonu ve substrat'ın fiziksel durumuna uygun spesifiklik gösterirler. 4-10 C atomlu yağ asitleri daha uzun C zincirli yağ asitlerinden daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Abbas 2004).

Lipazların bilimsel araştırmalarda; hidroliz, esterleşme, transesterleşme, peptit sentezi, bölge seçimli, enantiyo seçicilik dönüşümleri gibi reaksiyonları katalizlemeleri, organik sentez tasarımlarında zor olan özel bileşikleri üretmeleri, ester bağına spesifik olmaları, yan ürün oluşumunu önlemeleri, hidrolitik reaksiyonları katalizlerken kofaktöre ihtiyaç duymamamaları, organik çözücülerde aktifliklerini korumaları gibi avantajlarından dolayı endüstride oldukça geniş kullanım alanı bulmuştur (Sharma *et al.* 2008; Sangeetha *et al.* 2010; Sekhon 2010). Ayrıca lipazların geniş spektrumdaki substratları kullanabilme kabiliyetleri ve ekstrem koşullarda (sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi) kararlı yapılarını koruyabilmeleri, onların deterjan, gıda, deri, kagıt, kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde önemli bir biyokatalizör olarak kullanılmasına yol açmıştır.

Tüm bu özelliklerinden dolayı son yıllarda lipazların önemi giderek artmış, enzimolojinin odak merkezi haline gelmiştir. Özellikle üç boyutlu yapılarının belirlenmesi, sınıflandırılması (Arpigny and Jaeger 1999), deney ve keşfetme yöntemleri (Gilham and Lehner 2005; Hasan *et al.* 2006), saflaştırma stratejileri üzerinde ilgi çekici kapsamlı incelemeler yapılmıştır. Günümüzde önemi giderek artmakta olan lipaz enziminin, ticari anlamda ilk üretimi 1994 yılında Novo Nordisk firması tarafından *Thermomyces lanuginosus* orijinli *Aspergillus oryzae* türüne ait rekombinant lipazdır (Gupta 1998; Saxena *et al.* 2003; *Hasan et al.* 2006; Sharma *et al.* 2008; Sangeetha *et al.* 2010).

Lipazlar, bitkiler, hayvanlar ve bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilir (Dutta and Ray 2009). Fakat, mikroorganizmaların kolay üretilebilmeleri, genetik olarak modifiye edilebilmeleri, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları gibi sebeplerden dolayı enzim üretiminde mikrobiyal kaynaklar bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre daha üstün kabul edilir. (Jaeger 2002; Saxena *et al.* 2003; Houde *et al.* 2004). Ayrıca, toksik ve patojen olmayan mikroorganizmaların da seçilmesiyle endüstriyel anlamda en çok mikrobiyal kökenli lipazlar tercih edilir. (Hasan *et al.* 2006; Kiran *et al.* 2008).

Lipaz üreten mikroorganizmalar, fabrika atıklarından, mandıralar, sebze yağı üreten fabrikalar, yağ içeren tohumlar, yağ ile kontamine olmuş topraklar, çürümüş gıdalar, kompost yığınları gibi farklı çevrelerden izole edilebilmektedir (Wang *et al.* 2009).

Lipaz enzimi ilk olarak 1856 yılında Claude Bernard tarafından pankreas salgısında keşfedilmiştir. Ticari uygulamalarda kullanılan hayvansal pankreas lipazının endüstrideki kullanımının aşırı artışı sonucunda ihtiyaç karşılanamamış ve lipazın mikrobiyal kaynakları keşfedilmiştir (Tekiner 2011).

1901 yılında da ilk olarak *Serratia marescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinde bakteriyel lipazlar gözlemlenmiştir (Hasan *et al.* 2006). Bu tarihten itibaren, *Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp. gibi pek çok farklı türlerdeki bakteriden lipaz enzimi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Lee and Park 2008).

Bakteriyel lipazlar hücre dışında, hücre zarına bağlı veya hücre içinde bulunabilmektedir. Endüstriyel lipazlar ise genel olarak lipazı hücre dısı üreten mikroorganizmalardan elde edilir. (Gupta 1998; Hasan *et al.* 2006). Ayrıca bakteriyel lipazlar, araştırmacıların yaptığı pek çok çalışmaya rağmen lipolitik veya esterolitik enzimler olarak kolaylıkla ayırt edilememektedir (Rosenstein and Gotz 2000).

Bakteriyel lipazlar glikoprotein ve lipoprotein yapısındadır. 1979'da Winkler'in yaptığı çalışmada bakterilerin çoğunun enzim üretme potansiyellerinin polisakkaritler tarafından etkilendiğini göstermiştir. Bakteriyel lipazların büyük bir kısmının ise substratlarına karşı spesifik olmayan, basit yapılı fakat çok azının sıcaklığa karşı kararlı oldukları bildirilmiştir (Saxena *et al.* 2003).

Bakteriyel lipaz üretiminde, *Arthrobacter* sp., *Staphylococcus* sp., *Achromobacter* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Chromobacterium* sp. gibi mikroorganzimalardan faydalanılmaktadır (Saxena *et al.* 2003). Yapılan çeşitli çalışmalarda stafilolokokkal lipazların ise doğada lipoprotein yapısında bulunduğu tespit edilmiştir.

Genel olarak bakteriyel lipolitik enzimler biyolojik özellikleri ve aminoasit sekansları dikkate alındığında 8 sınıfa ayrılır:

Aile I (Gerçek Lipazlar): (Arpigny and Jaeger 1999) tarafından 6 alt sınıfa ayrılmış olan en geniş lipaz ailesidir. Bu lipaz sınıfı Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly pentapeptidine sahiptir. *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Staphylococcus* sp. lipazlarının çoğu bu grup lipazlardır. Endüstride en çok tercih edilen gerçek lipaz grubu *Pseudomonas* lipazı olmasına rağmen, *Burkholderia glumae, P. aeruginosa, Chromobacterium viscosum* ve *Burkholderia cepacia* lipazlarının kristal yapılarının da aydınlatılmasıyla birlikte, bunlarında kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Arpigny and Jaeger 1999; Nardini *et al.* 2000).

P. aeruginosa lipazı ile yüksek oranda dizi benzerliği taşıyan *Vibrio cholerae, Acinobecter calcoacetis, Pseudomonas wisconsinensis* ve *Proteus vulgaris* gibi lipazların moleküler ağırlıkları yaklaşık 30-32 kDa olarak tayin edilmiştir. I.1 ve I.2 alt ailelerindeki lipazlar, I.3 alt ailesi altında ki *P. fluorescens* ve *Serratia marcescnes* lipazlarından daha küçük molekül ağırlığına sahiptir. *S. marcescens* lipazı 65 kDa iken *P. fluorescens* lipazı 50 kDa dur. Alt aile I.2'de yer alan lipazların orta büyüklükte molekül ağırlığa sahip lipazlar olarak tanımlanmasının nedeni molekül yüzeyinde taşıdıkları ve paralel olmayan bir çift β-ipliğinden oluşan yapıdır (Arpigny and Jaeger

1999). Bütün bu enzimlerin salgılanması, ABC (ATP-bindingcasette) taşıyıcı sistemi üzerinden tek basamakta gerçekleşir (Arpigny and Jaeger 1999).

Aile II lipazları aktif bölgelerinde Gly-Asp-Ser-Leu dizilimi gösterir ve diğer lipolitik enzimlerle karşılaştırıldığında katalitik aktivitelerinde rol alan aminoasitler N- ucuna daha yakındır. *Aeromonas* sp. *Streptomyces* sp., ve *Salmonella* sp. türlerinin esterazları bu aileye aittir.

Aile III, ilk olarak Cruz ve arkadaşları tarafından ortaya konulan enzim ailesidir. Daha sonra Wei ve arkadaşları da *Streptomyces exfoliatus* (M11) lipazının üç boyutlu yapısını çalışarak bu ailedeki enzimlerin α/β-hidrolazlardan olduklarını tespit etmişlerdir. Aile II esterazlarından farklı olarak *Streptomyces* sp. türlerinin hücre dışı lipazları da bu aile içerisinde ele alınmaktadır.

Aile IV; memeli hormon duyarlı lipazının aminoasit sırası ile benzerlik göstermektedir. ortalama %75 oranında benzerlik gösteren *B. subtilis, B. pumilus* ve *B. licheniformis* kökenli dört yakın akraba lipolitik enzimler ve 15°C'nin altındaki düşük sıcaklarda bile aktif olan *Moraxella* suşundan elde edilen lipazlar bu sınıftadır. Aktif bölge rezidülerinde korunmuş Ser, His ve Asp aminoasitleri bulunmaktadır. *Alcaligenes eutrophus* ve *Escherichia coli* gibi mezofilik ve *Archeoglobus fulgidus* ve *Alicyclobacillus acidocaldarius* gibi termofilik bakterilerin aynı şekilde davranmaması aminoasit sırasının önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca *Bacillus* ve *Staphylococcus* lipazlarıyla grup içinde yer alan lipazlar karşılaştırıldığı zaman %15 gibi düşük bir oranda dizi benzerliği taşıdığı ortaya konulmuştur (Arpigny and Jaeger 1999).

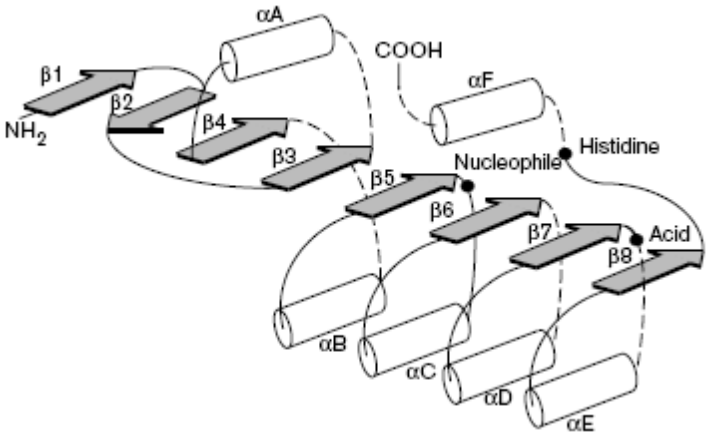
Aile V; α/β-hidrolaz yapısına sahip olan bu enzim grubu içerisinde *Haemophilus influenza* ve *Pseudomonas oleovorans* gibi mezofilik bakterilerin lipazları bulunmaktadır.

Aile VI; yaklaşık olarak 23-26 kDa molekül ağırlığına sahip en küçük esterazlardan oluşur ve alt birimleri ; α/β-hidrolaz yapısına sahip olan aktif enzimlerdir. Bu sınıf lipazlar hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır (Arpigny and Jaeger 1999).

Aile VII; yaklaşık olarak 55 kDa molekül ağırlığınada olan lipazlar Aile VI enzimlerine göre daha büyükdür. Ökaryotik bağırsak ya da karaciğer karboksil esterazları ve asetilkolin esterazları ile benzer aminoasit dizilimi göstermektedir.

Aile VIII; bu sınıf lipazlar (De Pascale *et al.* 2008) tarafından belirtilen klasik sınıflandırmalara uymadığı için yeni bir lipolitik aileye ait olan bir lipaz olarak sınıflandırılmıştır. β-laktamaz sınıfı enzimlerle yüksek seviyede benzerlik göstermektedir. Ayrıca Arpigny ve Jaeger tarafından da keyfi olarak yeni Aile IX ve X olarak sınıflandırılmıştır.

Mikrobiyal lipaz ve esterazların kapsamlı bir veritabanı MELDB veritabanında sekiz süper aileden hiçbirine ait olmayan lipazlar grup-dışı olarak gruplandırılmıştır. Bölgesel bir dizilim sıralaması ve algoritma ile oluşan bir grafiğe göre enzimlerin korunan dizilimleri belirlenmiş ve sınıflandırma yapılmıştır (Sangeetha *et al.* 2010).



Şekil 1.2. Lipazların α-sarmal ve β-yaprak yapılarının şematik gösterimi

Geniş kullanım alanları bulan fungal lipazlar 1950'lerden beri çalışılmaktadır. Bu lipazların, düşük maliyetle saflaştırılabilmesi, pH ve ısıya karşı dayanıklı olması, farklı substratlara özgüllüğü ve organik çözücülerde aktivite gösterebilmesinden dolayı tercih edilmektedir. Ticari lipazların büyük bir kısmı *Rhizopus arrhizus, R. delemar, R. japonicus, R. niveus ve R. Oryzae, Aspergillus niger, Candida cylindracea, Humicola lanuginosa, Mucor miehei* türlerinden elde edilmektedir. *Rhizopus* 1,3-(regio)-spesifiktir ve bu özelliğinden dolayı, lipazlar özellikle gıda ve farmasötik uygulamalarda çok sıklıkla tercih edilmektedirler. Orta-zincirli yağ asitlerine karşı çeşitli *Rhizopu*s türlerinin lipazları (40'tan 45 kDa'ya kadar olanlar) maksimum aktivite gösterir. *R. delemar*'ın hücre dışı ve hücre içi lipaz enzimleri ürettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Saxena *et al.* 2003).

Entomophthora apiculata, E. coronata, E. thaxteriana, E. virulenta, Basidiobolus spp. Ve *Conidiobolus* spp. türleri ise *Entomophthorales* cinsi içindeki lipaz üreticileridir. Ayrıca Pichia, Hansenula ve Saccharomyces türleri de lipaz üreticisi funguslardandır. Üstelik *Saccharomyces lipolytica* gibi çeşitli türlerden iki farklı hücre bağlayıcı lipaz saflaştırılabilmiştir. *Candida deformans*'ın hariç *C. curvata, C. tropicalis, C. valida ve C. pelliculosa*'dan elde edilen lipazlar, trigliseridlerdeki farklı ester bağlarına karşı spesifik değildir.

Yağın hidroliziyle süt ürünlerinde asit oluşumundan sorumlu olan *Geotrichum candidum* bu özelliğinden dolayı trigliseridlerin yapısal analizleri için kullanılmaktadır. Hücre içi ve hücre dışı 1,3-(regiyo)-spesifik *A. niger* lipazı ve mavi peynirin aromasını veren *Penicillium roqueforti*'nin lipazı da yine ticari öneme sahip lipazlardır. *Penicillium cyclopium, P. verrucosum, P. cyclopium ve P. crustosum* gibi *Penicillium* türlerinden izole edilen lipazlar ise bütirik asit için özgüllük gösterirler. *P. camemberti*'de de lipolitik aktivite varlığı ise Brie ve Camembert peynirlerinin beyaz yüzlü küflü taraflarından alınan numunelerden tespit edilmiştir. *H. lanuginosa* DSM 3819'un lipazı ise bazik pH'da yüksek aktivitesi ve anyonik yüzey aktif maddelere ve ısıya dayanıklılığı sayesinde deterjan katkı maddesi olarak kullanılmaya uygun bulunmuştur.

Çizelge 1.2. Lipaz üreten mikroorganizmalar (Sharma *et al.* 2008)

Kaynak	Cins	Tür
BAKTERI GRAM (+)	*Bacillus*	*B. megaterium* *B. cereus* *B. stearothermophilus* *B. subtilis* *B. brevis* *B. thermocatenulatus* *Bacillus* sp. IHI-91 *B. coagulans* *B. acidocaldarius* *Bacillus* sp. RS-12 *Bacillus* sp. J 33 *B. thermoleovorans* ID 1
	Staphylococcus	*S. canosus* *S. aureus* *S. hyicus* *S. epidermidis* *S. warneri*
	Lactobacillus	*Lactobacillus delbruckii* *Lactobacillus* sp.
	Streptococcus	*Streptococcus lactis*
	Micrococcus	*M. freudenreichii* *M. luteus*
	Propionibacterium	*P. acne* *P. granulosum*
	Burkholderia	*Burkhorderia* sp. *B. glumae*

Çizelge 1.2. (devam)

GRAM (-)	*Pseudomonas*	*P. aeruginosa* *P. fragi* *P. mendocina* *P. putida* 3 SK *P. glumae* *P. cepacia* *P. fluorescens* *P. aeruginosa* KKA-5 *P. pseudoalcaligenes* F 111 *Pseudomonas* sp. *P. fluorescens* MF0 *Pseudomonas* sp. KW 156
	Choromobacterium	*C. viscosum*
	Aeromonas	*A. hydrophila* *A. sorbia* LP004
Mantar	*Rhizopus*	*Rp. delemar* *Rp. oryzae* *Rp. arrhizus*
	Aspergillus	*A. flavus* *A. niger* *A. oryzae*
	Penicillum	*P. cyclopium*
	Mucor	*M. miehei*
Maya	*Candida*	*C. rugosa* *C. cylindracea* *C. antartica*
Aktinomisetler	*Streptomyces*	*S. cinnamomeus*

1.1. Lipazların Kullanım Alanları

Son yıllarda enzimlerin kullanıldığı pek çok endüstriyel alanda lipazların kullanımında hızlı bir artış gözlenmektedir. Lipazlar gıda endüstrisinde yağların işlenmesinde, bitkisel ve hayvansal yağların hidroliziyle mono ve diaçilgliseridlerin, yağ asitlerinin ve gliserolün üretimi, triaçilgliseridlerin fiziksel özelliklerinin ve kompozisyonlarının modifikasyonu, biyomedikal uygulamalarda, organik çözgenlerde kimyasalların sentezi, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan endüstrisinde ticari bakımdan önemli bazı kimyasalların sentezinde ve deri sanayiinde, çevre yönetiminde, kağıtların işlenmesi, ecza, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. Lipazlar ayrıca yağlı atıkların ve poliüretanın parçalanmasını hızlandırmak için de kullanılırlar. Özellikle bazı işlemlerdeki enzimler düşük maliyetle üretildiğinden ve genellikle iyi stabilite gösterdiklerinden buradaki uygulamaların bazıları çok avantajlıdır (Sharma *et al.* 2008).

İlk ticari rekombinant lipaz 1994 yılında Novo Nordisk tarafından *Thermomyces lanuginosus*'den, 1995 yılında, ise Genencor International" firması tarafından *Pseudomonas mendocina*'dan "Lumafast" ve *Pseudomonas alcaligenes*'den "Lipomax" isimli iki bakteriyel lipaz elde edilmiştir (Sharma *et al.* 2008).

Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt, et, hamur ve yağ endüstrisinde önemlidir. Süt yağının hidrolizi çeşitli peynirlerin üretiminde zorunludur. Lipazlar tereyağına ve peynire aroma kazandırmada, peynirin olgunlaşmasının hızlandırılmasında, çikolata endüstrisinde, kaymak hidrolizinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca lipazlar; undaki %1-2 oranında bulunan lipid (yağ) içeriğine etki ederek, ekmek hacminde artış, hamurun işlenebilirliğinde kolaylık, ekmek içi yumuşaklık ve hamur stabilitesinde artış sağlar. Bunların yanı sıra lipazlar, balık ve et ürünlerinde bulunan yağların uzaklaştırılmasında da kullanılmaktadır (Sharma *et al.* 2008).

Katı ve sıvı yağlar gıdalar için oldukça önemlidir. Lipazların çeşitli ürünlere ilavesiyle gliserol omurgasındaki kısa zincirli (C4 ve C6) yağ asitleri uzaklaştırılırsa keskin ve hoş

bir aroma, orta zincirli (C12 ve C 14) yağ asitlerinin uzaklaştırılırsa da sabun benzeri bir tat oluşur. Ayrıca kullanılan enzimin miktarı ve tipi de oldukça önemlidir. Örneğin lipazın fazla miktarda kullanımı hamur ve yağın tadında bozulmalara sebep olurken, birçok kaliteli peynir enzim kullanılan proseslerde elde edilir (Saxena *et al.* 2003).

Lipaz enzimi deri işlemeciliğinde derinin yüzeyindeki ve içindeki yağların uzaklaştırılması ve kılların yok edilmesi için kullanılır. Proteaz, lipaz gibi hidrolitik enzimler ve sürfaktan içeren karışım kullanılarak deriye temizleme, tabaklama ve boyama işlemleri gerçekleştirilir. pH'nın 8,0-13,0 aralığında olduğu ortamlarda alkali lipazlar tercih edilir. Bu işlemler gerçekleştirilirken kullanılan yüzey aktif ajan (tensit) miktarı artırılır ve deterjan miktarı en aza indirilir. Bu şartlarda uyum içinde çalışmaya elverişli olan çok sayıda *Bacillus* türleri tespit edilmiştir (Pandey *et al.* 1999)

Hızla büyüyen biyolojik deterjan üretim teknolojisi prosesleri sırasında lipaz, amilaz, proteaz, selülaz peroksidaz, oksidaz ve pektinaz gibi enzimler sıklıkla kullanılmaktadır. Çamaşır ve bulaşıklardaki temizlenmesi zor (çimen, kan, süt ve ter gibi) lekelerle başa çıkmak için deterjanlarda bulunan bu enzimlerin; düşük sıcaklıkta ve daha az enerji ile aktif olabilen, yüksek verimli, substrat özgüllüğü düşük, yıkama koşullarına (pH 10,0-11,0, 30-60°C) ve surfaktanlara dayanıklılık gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Sharma *et al.* 2008).

Deterjanlarda kullanılan enzimlerden lipazlar, yağlı yemek kalıntılarını, proteazlar yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri, amilaz ise nişasta bazlı lekeleri çıkartmak üzere kullanılır. Ayrıca, selülaz enzimi ile çamaşırlarda zamanla meydana gelen selülöz fibriller parçalanarak çamaşırların daha yumuşak ve renklerin daha canlı olması sağlanır (Schmid and Verger 1998; Hiol *et al.* 2000)

Toplam lipaz satışının %32'si deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Yaklaşık olarak 13 milyar ton deterjana 1000 ton kadar lipaz eklemesi yapılmaktadır (Sharma *et al.* 2008). Temizlik malzemelerinde enzimlerin kullanımı hala endüstriyel enzimler için tek büyük pazar olmayı sürdürmektedir.

Gün geçtikçe yenilenebilir enerji kaynaklarının çeşitliliği artmaktadır. Yeni ve alternatif enerji kaynakları ortaya çıktıkça da ekonomik analizler yapılmaktadır. Biyodizel de hem çevreye kısa ve uzun vadede olumsuz etki oluşturmaması hem de yüksek verimli ve ekonomik olması sebebiyle üzerinde çokça çalışılan potansiyel bir enerji kaynağıdır (Akşamoğlu 1997).

Biyodizel, bitkisel (kanola, soya ve aspir gibi) ve hayvansal kaynaklı olabilmektedir. Bitkisel yağlardan katalizör (asidik, bazik katalizörler ile lipazlar) triaçigliserol ve bir alkolün (etanol, metanol) varlığında transesterifikasyon reaksiyonu (alkoliz) ile oluşturulur. Bu üretimin maliyeti katalizörler pahalı olduğu için endüstriyel boyutta oldukça yüksektir. Fakat bir katalizör olarak biyodizel üretiminde işlev gören lipazın matriks veya mikrokapsüllerde tutuklanmasıyla maliyetler düşürülmektedir (Matsumoto *et al.* 2001).

Enzimatik biyodizel üretim proseslerinde hücre içi veya hücre dışı formda lipazlar kullanılarak biyodizelin gliserol kısmı ayrılır ve doğrudan yakıt olarak kullanılır (Ranganathan *et al.* 2008). Ayrıca biyodizel üretiminin ilk yatırım ve enerji girdisi kimyasal katalizlemeye göre çok düşüktür temiz ve yıkamaya daha az ihtiyaç duyan ve atık oluşturmadığı için de çevreye duyarlıdır (Shieh *et al.* 2003).

Biyoteknolojide, kullanılan yeni bir yöntem ise atıkların yok edilmesi için yapılan biyoremediasyon işlemidir. Çevre yönetimi için lipazlar kullanılarak, yağ fabrikalarının atık sularına karışan zeytinyağı gibi yağların yok edilmesi ve yağ kalıntıları temizlenebilmektedir. Ayrıca içerisinde lipazların da bulunduğu enzim karışımları ile atık sular da arıtılabilir. Gerçekleştirilen başarılı uygulamalar sayesinde lipazların biyoremediasyonda kullanımının önemi artmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda lipofilik mikroorganizmalar doğrudan atık içinde üretilerek arıtma işlemi gerçekleştirilmektedir. Aynı zamanda lipazlar çok sayıda ürün içindeki polyester atıkları da indirgeyerek, laktonların ve esterifiye olmamış yağ asitlerinin üretimi sağlamıştır. Ayrıca, su soğutma sistemlerinde zamanla oluşan biyofilm tortularının yok edilmesinde, fabrikalardan çıkan

atık gazların saflaştırılmasında, endüstriyel atıklardan tek hücre proteini üretilmesinde ve atık yağların değerlendirilmesinde de lipazlar kullanılmaktadır (Pandey *et al.* 1999).

Lipaz enzimi, alkololizis, asidolizis, hidroliz ve gliserolizis süreçlerinde termal bozunmayı minimize ettiği ve enerji tasarrufu sağladığı için olekimyasal endüstride de kullanım alanı bulmuştur. immobilize olmuş lipazların substratlar üzerinde kullanımı sonucunda yüksek verimli prosesler elde edilmektedir Günümüzde ise oleokimyasal endüstrisi lipaz kullanımını artırarak, organik çözücüler ve emülsifiyerlerin kullanımının azaltma yönünde çalışmalar yapmaktadır. Japon Miyoshi Yağ şirketi, *Candida cylindracea* lipazının sabun üretiminde kullanıldığını belirtmiştir (Saxena *et al.* 2003; Sharma *et al.* 2008).

Lipazlar lizofosfolipidlerin üretiminde fosfolipazların yerine geçebildiği, enzimatik sentezlerle 60-80°C sıcaklıklarda oldukça iyi bölge seçiciliği gerçekleştirebildiği ve aminoasit bazlı ester ve amid bağlarının parçalama işlemlerini yapabildiği için yüzey aktif maddelerin sentezinde de kullanılmaktadır. Örneğin; *A. terreus* lipazının sentezlediği yüzey aktif madde doğal yağlarla şeker alkolleri arasında transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirir.

Lipazlar, kozmetik ve parfümlerin başlıca bileşenleri arasında bulunan aroma ve sürfaktanların üretiminde de kullanılmaktadır. Kozmetikte ve parfüm endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sürfaktanlar monoaçilgliseroller ve diaçilgliserollerdir ki bunlar gliserolün lipazlarca katalize edilen esterifikasyon reaksiyonları sonucu elde edilir. Açilgliserol ester yağ asitleri ve karışık asit poliesterleri de lipazlar tarafından üretilen kozmetiklerin ana bileşenleri arasındadır (Pandey *et al.* 1999). Örneğin, Unichem Uluslararası Şirketi, cilt yumuşatıcı olarak banyo losyonları ve güneş yanığı kremlerinde kullanmak için isopropil palmitat, isopropil miristat ve 2-etilhekzil palmitat üretimine başlamıştır (Saxena *et al.* 2003).

Kağıt endüstrisinde ise lipazlar, kağıt hamuru ve yapımında sorun çıkaran trigliseritler ve mumların uzaklaştırılması için kullanılır (Jaeger *et al.* 1998; Sharma *et al.* 2001).

Böylece daha yüksek kalitede ürün oluşur ve daha az azaltılmış temizleme gerektirir (Saxena *et al.* 2003).

Pek çok enzimin kullanıldığı organik kimyada katalizör olarak çoğunlukla mikrobiyal kaynaklı lipazlar tercih edilmektedir. Organik kimyasalların sentezinde kullanılan lipazlar, kemo", "regio" ve "stereo seçici" transformasyon reaksiyonlarını katalize edebilirler (Sharma *et al.* 2008).

Lipazlar, hidrofilik-lipofilik ara yüzeyinde suya karışmayan trigliseritlerin hidrolizini katalizlerler ve reaksiyon karışımındaki organik çözücülere karşı oldukça toleranslıdır. Reaksiyon ortamındaki su miktarı, lipazın katalize ettiği reaksiyonun yönünü belirler. Suyun hiç olmadığı ya da çok az miktarda olduğu zamanlarda, yalnızca esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları gerçekleşirken, su içeriğinin yüksek olduğu koşullarda hidroliz reaksiyonları gerçekleşir (Sharma *et al.* 2008)

Optikçe aktif polimerler absorbent olarak kullanılan asimetrik ayıraçlardır. Bu polimerlerin sentezi için lipazların stereoselektivite özelliği kullanılmaktadır. Sıvı kristaller alanında, uygun monomerler alkollerin lipazlar tarafından katalizlenen transesterifikasyonu ile hazırlanabilir (Saxena *et al.* 2003).

Son yıllarda, lipaz uygulamaları sonucu çeşitli pestisitler (insektisitler, herbisitler, fungisitler ve onların öncülleri) ve optik olarak aktif bileşikler üretilmektedir Kimyasal madde üreticileri, pestisit üretimi ve çeşitli yeni ürünlerin/süreçlerin geliştirilmesi için lipazlardan yararlanmaya çalışmalarına başlamıştır. Maliyeti düşürme ve çevresel kirlenmeyi azaltmak içinse aktivitesi oldukça stabil olan immobilize lipaz formları kullanılmaya başlanmıştır.

Doymamış yağ asitleri metabolik etkilerinden (membran lipitlerinin ve prostoglandinlerin normal sentezi için) dolayı eczacılıkta ve gıda katkılarında oldukça fazla kullanılmaktadır. Bu konuyla ilgili ticarileştirilen proseslerden fenoksipropiyonat herbisitlerin sentezi için domuz pankreatik lipazı, menhaden, tuna ve borage yağı gibi

hayvansal ve bitkisel yağlardan, doymamış yağ asitlerinin sentezi için ise mikrobiyal lipazlar kullanılmaktadır. Serbest doymamış yağ asitleri ve onların mono ve diaçilgliseritleri; kolesterol düzeyini düşüren, iltihabı ve kanın pıhtılaşmasını engelleyen çeşitli ilaçların üretilmesinde kullanılmaktadır. AIDS tedavisi alanında da lipaz uygulaması hızla genişlemektedir. Yine yapay tatlandırıcı olan sukralozun sentezinde de lipazlar okta-asetil sukrozun regiyoselektif hidrolizi için kullanılmaktadır (Pandey *et al.* 1999).

Lipazlar (stereo seçici özelliğe sahip oldukları için) ve lipazların kataliz ettiği transesterifikasyon reaksiyonları ile oluşturulan saf enantiyomerler, birbiriyle karışmayan tek fazlı sistemlerde çeşitli rasemik organik asit karışımlarını çözmek için kullanılmaktadır. Bu çözümlenme ile bazı prostaglandin, steroid ve karboksilik nükleosit analogları hazırlanır ve lipazlar endüstriyel katalizörler olarak kullanılmış olur. Özellikle mikroorganizmalar ve enzimler, rasemik karışımları sonlandırmak için de oldukça kullanışlıdır. Örneğin; *Candida rugosa*'dan saflaştırılmış lipazın, tamamen susuz organik çözücüler içindeki aktivitesi, saf olmayan lipaza göre nispeten daha düşüktür. Buna karşın çok az hidrate olmuş hidrofobik organik çözücüde n-bütanollü rasemik 2-(4-klorofenoksi) propanoik asitin esterifikasyonunda, yalnızca saf enzim aktivite göstermiştir (Sharma *et al.* 2008).

Lipaz enzimi katalizörlüğünde kısa zincirli yağ asitlerinden elde edilen esterler gıda endüstrisinde tatlandırıcı ve lezzet arttırıcı olarak, uzun zincirli yağ asitlerinden elde edilen esterler ise dizel yakıtları zenginleştirmede kullanılmaktadır. Örneğin; *Candida antarctica* lipazı ile hekzanlı ortamda gerçekleştirilen, esterifikasyon çalışmaları literatürde sıkça yer almaktadır (Sharma *et al.* 2008).

Lipazların biyosensör olarak kullanımı önemli uygulama alanları arasında yerini almaktadır. Biyosensör bileşeni olarak lipazlar tıptaki uygulamaların yanı sıra, katı ve sıvı yağ endüstrisinde, gıda ve içecek endüstrisinde, kirlilik ve pestisit kalıntılarının analizinde de kullanılırlar. Örneğin tıpta lipaz enzimi lipitlerin tanımlanmasında,

triaçilgliserolden gliserol elde etmek çin kullanılmakta ve kimyasal ve enzimatik yöntemlerle ayrılan gliserol miktarı hesaplanabilmektedir. (Pandey *et al.* 1999).

Çizelge 1.3. Mikrobiyal lipazların endüstriyel kullanım alanları (Wulfson 1994)

Endüstri	**Katalizlenen işlem**	**Ürün ve uygulaması**
Deterjan	Yağların hidrolizi	Kirlerin uzaklaştırılması
Mandıra ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaşması	Süt, yağ ve peynirde lezzet artırıcı bileşenlerin geliştirilmesi
Fırın ürünleri	Lezzet artırımı	Raf ömrünün uzatılması
Meşrubatlar	Aroma artırımı	Meşrubat
Sağlık besinleri	Transesterifikasyon	Sağlık besinleri
Et ve balık	Lezzet artırımı	Et ve balık ürünleri
Kimyasallar	Enantiyoseçicilik, sentez	Kiral yapı blokları
Eczacılık	Transesterifikasyon, hidroliz	Özel lipidler, sindirim amaçlar
Kozmetik	Sentez	Emülsifiyer, nemlendirici
Kağıt	Hidroliz	Kalitesi artırılmış kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri

2. KAYNAK ÖZETİ

Yapılan literatür taraması sonucunda termofilik bakteriler ve lipaz enziminin bu bakterilerden saflaştırılarak karakterize edilmesi üzerine çok sayıda araştırma yapıldığı görülmektedir. Üzerinde araştırma yapılan bakterilerden bazıları *Bacillus megaterium, B. cereus, B. stearothermophilus, B. subtilis, B. brevis, B. thermocatenulatus, Pseudomonas glumae, P. cepacia, P. fluorescens* ve *Aeromonas pseudoalcaligenes*'tir (Sharma *et al.* 2008).

Kumar Saun *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, deterjan ve gıda endüstrisinde sıkça kullanım alanı bulan alkalin lipazı saflaştırılmıştır. Termofilik *Geobacillus* sp. bakterisinden lipazı saflaştırarak karakterize edilmiştir. Saflaştırırken amonyum sülfat çöktürmesi yapmış ve daha sonra Sepharose ve jel filtrasyon kolonlarını kullanmışlardır. Sephacryl S-300 kolonundan sonra enzim; 5,4 kat saflaştırmış ve akabinde, %10'luk SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez) yöntemi ile enzimin molekül kütlesinin 97 kDa olduğunu gözlemlemişlerdir. *Geobacillus* sp. bakterisinden saflaştırılan enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 55°C ve pH 9,5 olarak bulmuştur. 55°C'de enzimin 90 dak'da yarılanma ömrünü tamamladığını tespit etmişlerdir.

Kaur *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada, *Bacillus licheniformis*'den hücre dışı lipaz enzimini kodlayan geni klonlamışlardır. %12'lik SDS-PAGE ile eksprese edilen saf proteinin molekül kütlesini 22kDa, enzimin spesifik aktivitesini ise 0,49 U mg^{-1} olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin pH 9,0–14,0 ile 30–80°C sıcaklık aralıklarında aktivite gösterdiğini, organik çözücülerin varlığında enzim ativitesinin %100 oranında kaybolduğunu, β-merkaptoetnolün enzimde güçlü inhibisyona sebep olduğunu, Triton X-100, Tween 20, Tween 40 ve SDS gibi çeşitli deterjanların enzimde herhangi bir aktivite kaybına sebep olmadığını tespit etmişlerdir.

Masomian *et al.* (2016), *Aneurinibacillus thermoaerophilus* HZ'den lipazı, Q-Sepharose iyon değişim ve Sephadex-G75 jel filtrasyon kromatografisi kullanarak 43,5 U/mg spesifik aktivite, 15,6 saflaştırma katsayısıyla iki adımda saflaştırmıştır. Enzimin mol kütlesini 50 kDa olarak bulmuşlardır. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonların ve organik solventlerin etkisine bakmışlardır. Dimetilsülfoksit (DMSO), methanol, n-tetradekan, n-hegzadekan gibi organik solventlerin enzim aktivitesini artırdığını göstermişlerdir.

Koc *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada, lipaz aktivite taraması yapmadan önce, 32 termofilik izolat ve 20 Basil örneği arasındaki genotipik farklılıkları belirlemek için Rep-PCR ve ITS-PCR yöntemlerini kullanmışlardır. Taramalar sonucunda 11 izolat ve 7 örneğin lipaz ürettiğini gözlemlenmişlerdir. Ekstraselüler lipaz aktivitesi, hem tribütirin hem de zeytin yağlı sıvı besiyerinde 60°C'de ve nötral pH'da ölçülmüştür. 24, 48 ve 72 saatlik periyotlar boyunca değişen lipaz aktivitesi, kültür yoğunluğu ve bütün pH aralıklarında biyokütlenin ıslak ağırlığı belirlenmiştir. Sonuçta lipaz üretim değerleri, tribütirin besiyerinde 0,002-0,019 (U/mL), zeytin yağlı besiyerinde ise 0,008-0,052 olarak tespit edilmiştir.

Kumar Saun *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, lipaz üreten termofilik bakterileri sıcak kaynaklarından izole etmiş ve *Bacillus aerius* (MTCC 10978) suşunu tanımlamışlardır. Daha sonra 48 saat boyunca izolatı çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakmışlar ve yapmış ve maksimum lipaz aktivitesine 30. saatte ulaşmışlardır. Lipaz üretimi ve bakterinin optimum büyümesi için sıcaklığı 55°C ve pH'yı ise 8,0 olarak tespit etmişlerdir. Bu esnada besiyerini hazırlarken, azot kaynağı olarak et ve maya özütü, karbon kaynağı olarak ise pamuk tohumu yağı kullanmışlardır. *Bacillus aerius* (MTCC 10978) tarafından üretilen enzim, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE iyon değişim kromatografisi yöntemiyle %7,2 verimle 9 kat saflaştırılmış ve enzimin moleküler ağırlığını, SDS-PAGE analiziyle 33 kDa olarak belirlemişlerdir. *p*-nitrofenil palmitat substratı ile K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,13mM ve 0,66 µmol/ml/dak olarak hesaplamışlardır.

Tripathi *et al.* (2014), Lipaz enzimini *Microbacterium* sp.'den amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex-G100 jel filtrasyon kromatografisi kullanarak, 2,1 kat saflaştırmış ve mol kütlesini 40 kDa olarak bulmuşlardır. Ayrıca enzim aktivitesi üzerine deterjanların ve organik çözücülerin etkisine de araştırmışlardır.

Jiewei *et al.* (2014), *Oceanobacillus* PT-11'den lipaz enzimi Q-Sepharose FF ve SP-Sepharose FF kromatografi yöntemlerini kullanarak saflaştırmış ve mol kütlesini 23,5 kDa olarak belirlemişlerdir. Daha sonra enzim aktivitesi üzerine deterjanların etkisine bakmışlar ve Triton X-100'ün aktiviteyi düşürdüğünü belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin uzun zincirli alkollerde stabil olduğunu, aseton gibi hidrofilik solventlerde denatüre olduğunu tespit etmişlerdir.

Uğur *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, Tributyrin ve Rhodamine-B Agar besiyerinde lipolitik aktivitesi olan 300 *Streptomyces* izolatı tanımlamışlardır. Lipaz aktivitesi, *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) substratı ile ölçülmüş 300 suş arasından en iyi lipaz üreticisinin *Streptomyces bambergiensis* OC 25-4 olduğu gözlemlenmiştir. İnokülum miktarı, inkübasyon süresi, karbon ve nitrojen kaynağı optimize edilmiştir. *S. bambergiensis* OC 25-4 straini tarafından üretilen LipSB 25-4 amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi ile 2,73-kat ve 92,12U/mg spesifik aktivite ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 8,0 ve 50°C olduğu, β-mercaptoetanol'ün enzimi aktive ederken, PMSF'nin ise aktiviteyi düşürdüğünü belirlemişlerdir. Yine metanol ve etanol varlığında 60 saat boyunca enzim aktivitesinin yaklaşık %75 oranında korunduğunu gözlemlemişlerdir.

Adan ve Arslanoğlu (2013) yaptıkları çalışmada, toprak örneklerinden ekstraselüler lipaz üreten bakteri izole etmiş ve 16S rRNA sekans analiz sonucuna göre *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlamışlardır. *P. fluorescens* KE38 suşunun optimum büyüme sıcaklığının 25°C olduğu ve psikrotolerant özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. KE38 olarak kodlanan lipaz enzimi yaklaşık %54,99 verimle 41,13 kat ve 337,3 U/mg spesifik aktivite ile saflaştırmışlardır. Saf enzimin molekül kütlesi ise SDS-PAGE yöntemi ile yaklaşık 43 kDa olarak bulmuşlardır. 15–65°C sıcaklıklarda lipaz

aktivitesi gözlenmiş olmasına rağmen maksimum aktivitenin pH 8,0 ve 45°C olduğunu bulmuşlardır. pH 8,0 ve 45°C'de 45-100 dak süreyle inkübasyona bırakıldığında, aktivitenin sırayla %100 ve %70 olduğu tespit etmişlerdir. C8-C18 açil gruplu *p*-nitrofenil esterleri substrat olarak kullanıldığında aktivite gözlenmiştir. Enzim Ca^{2+} ve Ni^{2+} ile aktive olduğu ve hatta DMSO ve dimetilformamid gibi çeşitli organik çözücülerde dahi aktivitesini kaybetmediği gözlemlemişlerdir. Yüksek kararlılık, geniş substrat spesifitesi ve düşük sıcaklıkkarda organik çözücülere ve metal iyonlarına dayanıklılığı, KE38 hücre dışı lipazın endüstride kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Cao *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada, organik solventlere karşı kararlı olan lipazı *Pseudomonas stutzeri* LC2-8'dan aseton çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi kullanarak 4760 U/mg protein spesifik aktiviteyle, 21,2 kat saflaştırmış ve mol kütlesini 32 kDa olarak belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin optimum pH'sını 8,0 optimum sıcaklığını ise 30°C olarak bulmuşlardır.

Sarkar *et al.* (2012) *Arachis hypogaea* kökünden izole ettiği *Staphylococcus aureus*'dan izole ettiği lipazı Fenil sepharose CL-4B hidrofobik interaksiyon kolonu ve Superose-12 jel filtrasyon kolonu kullanarak 118,67 U/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırmışlar ve enzimin molekül kütlesini 49 kDa olarak bulmuşlardır.

Ülker ve Karaoğlu (2012), topraktan izole ettiği *Mucor hiemalis f. corticola*'dan sırasıyla; amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi kullanarak lipaz enzimi 12,63 kat saflaştırmışlardır. Enzimin mol kütlesini 46 kDa; optimum pH'sını 7,0, optimum sıcaklığını ise 40°C olarak belirlemişlerdir.

Anuradha *et al.* (2012), *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra'da termostabil lipaz üretimini; %1,0 (w/v) glukoz, %1,25 (w/v) maya özütü, %0,45 (w/v) NaCl, %0,1 (v/v) zeytin yağı bulunan kültür ortamında, 65°C'de 200 rpm hızda 24 saat çalkalayarak gerçekleştirmişlerdir. *G. thermodenitrificans* IBRL-nra'dan termostabil lipaz enzimini sırasıyla ultrafiltrasyon, Heparin afinite kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisini yöntemini kullanarak saflaştırmış, mol kütlesini 30 kDa olarak

belirlemişlerdir. Termostabil lipazın optimum sıcaklığının 65°C olduğunu, en yüksek aktiviteyi ise pH 7,0'de verdiğini gözlemlenmiştir. Daha sonra enzim aktivitesi üzerine $BaCl_2$, $CaCl_2$, ve KCl etkisine bakmışlar; sırasıyla enzimin bağıl aktivitesini %112, %108 ve %106 olarak bulmuşlardır.

Zouaoui and Bouziane (2011), atık sulardan elde ettikleri lipaz üreten altı tane *Pseudomonas aeruginosa* izolatından amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE selüloz iyon değişim kromatografisi kullanarak ilgili enzimi 6,42 U/mg protein spesifik aktiviteyle 204,12 kat saflaştırmışlardır. Enzim aktivitesi üzerine Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}ve Zn^{2+} metal iyonlarının etkisine bakmış; Cu^{2+}, Mn^{2+} ve Zn^{2+}'nun enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Dheeman *et al.* (2011), termostabil lipazı *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304'den, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanarak saflaştırmış ve enzimin mol kütlesini 33 kDa olarak belirlemişlerdir. Substrat olarak *p*-nitrofenil asetatın kulanarak K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,099±0,010 mM ve 2,53±0,06 mmol/dak olarak belirlemişlerdir.

Ahmed *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada, yağlı topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* EH 37 bakterisinden ısıya-dayanıklı bir alkalen lipaz saflaştırmışlardır. Sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi ve fenil-sefaroz hidrofobik etkileşim kromatografisi yapmış ve sonuçta enzim 17,8-kat saflaştığını 41,9 U/ml spesifik aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Kısmen saflaştırılan enzim aktivitesinin 50°C ve 60°C'de 60 dakika boyunca koruduğunu, maksimum aktiviteyi pH 8 ve 60°C'de gösterdiğini belirlediler. Co^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının enzim aktivitesini düşürürken, Mg^{2+}, Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının ise aktiviteyi artırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca lipaz enzimine organik çözücülerle muamelesi sonucunda aktivitesinin %80'inden fazlasını koruduğunu belirlemişlerdir. Bütün bunların yanı sıra etil kaprilatın sentezi için organik çözücü bulunan ortamda *B. subtilis*'den elde edilen EH 37 lipazının etkili bir katalizör olabileceğini kanıtlamışlardır.

Ramani *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada, yüksek lipolitik aktivite gösteren bir bakteriyi izole ederek, 16S rRNA sekans analizi sonucunda *Pseudomonas gessardii* türüne benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Daha sonra lipid substratı olarak; kesimhane atığı ve keçi iç yağını kullanılarak *P. gessardii*'ye asidik lipaz enzimini ürettirmişler, 0,31 g substrat konsantrasyonunda ve pH 3,5'da maksimum lipaz aktivitesini 156 U/mL olarak belirlemişlerdir. Asidik lipaz enzimi saflaştırıldıktan sonra ki spesifik aktiviteyi 1,473 U/mg, molekül kütlesini ise 94 kDa olarak gözlemlemişlerdir. Ayrıca enzimin yüksek molekül kütlesi ile yüksek asidik bir pH (2,0-5,5) aralığında stabilite göstermesinin, değerli olduğu HPLC yöntemi kullanılarak aminoasit bileşimi belirlenen bu asidik enzimin, medisinal (enzim tedavisinde pankreatik lipaza alternatif olarak), oleokimyasal ve biyoteknolojik sektörlerde yaygın bir uygulama alanı bulabileceği sonucuna varmışlardır.

Sangeetha *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada, atıklardan *Bacillus licheniformis* VSG1 türünü izole ederek aynı ortamda proteaz ve lipaz üretmeyi amaçlamışlar. Ortam bileşenlerinin proteaz ve lipaz üretimine etkisi incelemek için protein kaynağı, lipid kaynağı ve emülsifiye edici maddeleri içeren farklı besi ortamları hazırlayarak her iki enzim de optimize edilmiş şartlarda (pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi) üretmeye çalışmışlar. Enzimlerin saflaştırılması sırasında amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemlerini kullanılmış ve her iki enzimi de 20-kat saf elde etmişlerdir. Her iki enzimin de molekül kütlesi 40 kDa olarak SDS-PAGE ile belirlenmişlerdir. Saflaştırılan enzim karışımının karakterizasyon çalışmaları için, optimum pH ve sıcaklığa, inhibitör, katkı maddeleri ve çözücülerin enzim aktivitesi üzerine etkisine bakmışlardır.

Kanjanavas *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada, termotolerant *Bacillus* sp. RN2 (Lip-SBRN2) bakterisinden rekombinant lipaz enzimini izole edilmiştir. SDS-PAGE ve jel filtrasyon kromatografisi metodlarıyla saf lipazın molekül kütlesini 19 kDa bulmuşlardır. pH 9–11 ve 45–60°C'de Lip-SBRN2 enzimin kararlı olduğunu ayrıca enzimin *p*NP-laurat (C12), *p*NP-kaprilat (C8) ve hindistan cevizi yağına karşı da aktivitesini muhafaza ettiğini, ayrıca, benzen, dietileter ve SDS varlığında da aktif

olduğunu göstermişlerdir. *Bacillus* sp. türü RN2 tarafından salgılanan enzimin, organik çözücüler ve deterjanlara karşı dayanıklı olmasından dolayı çeşitli reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Olusesan *et al.* (2009) yaptıkları çalışmada, Kuala Woh bölgesinden, 11 termofilik bakteri izole edilerek termostabil lipaz üretim potansiyelleri Rhodamine B-zeytin yağı agar besiyeri kullanılarak belirlenmiş ve sonuçta suşların tamamının 0,56-2,62 aralığında lipaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Daha sonra termostabiliteleri saptamak için 80°C'de 30 dak inkübasyona bırakmışlar ve KW6, KW12 suşlarının orijinal aktivilerinin sırasıyla %62, %54 oarnında koruduklarını tespit etmişlerdir. Tüm bu analizler sonucunda KW12 suşunun geniş pH ve sıcaklıklarda üreyerek eşsiz bir karakteristik gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Wang SL1 *et al.* (2009) yaptıkları çalışmada, lipaz üreten *Pseudomonas monteilii* TKU009 bakterisini izole etmiş ve tanımlamışlardır. Karbon/azot kaynağı olarak sadece soya fasulyesi tozu kullanarak bir lipaz (F2) ve lipaz benzeri materyalleri (F1) saflaştırmışlar F1 ve F2'nin moleküler ağırlıklarını SDS-PAGE ve jel filtrasyon yöntemlerini kullanarak 44 kDa olarak belirlemişlerdir. F2 için optimum pH 7,0'yı, optimum sıcaklığı 40°C, pH ve sıcaklık kararlılığını ise 8,0- 11,0, 50°C iken; F1 için optimum pH'yı 6,0, optimum sıcaklığı 40°C, pH ve sıcaklık kararlılığını sırasıyla 6,0-7,0, 50°C olarak tespit etmişlerdir. EDTA, F1 ve F2'yi tamamen inhibe ederken, Mg^{2+}, Mn^{2+} ve SDS kısmen inhibe etmiş ve Triton X-100 ve Tween 40 ilavesi ise aktiviteyi arttırmıştır. Fakat F2 uzun zincirli (C10-C18) substratlara etki ederken, F1 (C4-C18) geniş spektrumdaki zincir uzunluğuna sahip substratlara gözlemlemişlerdir.

Kiran *et al.* (2008) yaptıkları çalışmada, Hindistan yarımadasının kıyısından lipaz üretebilen bir deniz süngeri izole etmişler ve *Dendrilla nigra* olarak tanımlamışlardır. Maksimum enzim üretimi için %1 tribütirin içeren minimal besiyeri kullanmışlardır. Karbon kaynağı olarak hazır bulunan karbon kaynakları ilave edildiğinde katabolit baskın oluşmuştur. Enzim üretiminin pH 9 ve 30°C'de optimum seviyede gerçekleştiğini belirlemişlerdir. 20°C'de lipaz enziminin %80 aktivite gösterdiğini,

50°C'nin üstündeki sıcaklıklarda ise aktivitenin oldukça düşük olduğunu tespit etmiş ve bu bulgulardan yola çıkarak, enzimin psikrofilik alkalin lipaz olduğu kanısına varmışlardır.

Yapaşan (2008) yaptığı çalışmada, *Pseudomonas* sp. türünü topraktan izole ederek, bu suyun hücre-içi lipaz enzimine sahip olduğunu kanıtlamış, kısmen saflaştırmış ve karakterizasyonunu yapmıştır. Saflaştırma sırasında boyut dışlamalı kromatografi kullanarak, enzimi kısmi olarak saflaştırmıştır. Lipaz enzimi en yüksek enzim aktivitesini *p*-nitrofenil lauratın substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda göstermiştir. Lipaz enziminin çalışması için en uygun pH aralığının; 8,0-9,0, sıcaklık değerinin ise 25°C olduğu belirlenmiştir. Çeşitli metal tuzları ve organik çözücüler varlığında; katkı bileşiklerine göre ya hızlı bir şekilde düşmüş ya da etkilenmeden sabit kalmıştır. Ayrıca enzimin molekül kütlesinin poliakrilamid jel elektroforezi ile yaklaşık 23 kDa ve 49 kDa arasında olduğunu bulmuştur.

Chakraborty and Raj (2008) yaptıkları çalışmada, *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 tarafından üretilen hücre-dışı lipaz enzimini saflaştırmışlardır. Karbon kaynağı olarak, sardalye yağı ile desteklenmiş nutrient broth (pH 8,0) kullanılmış ve 37°C'de 48 saat boyunca büyümeye bırakmışlardır. Ham ekstrakt aktivitesi 41,7 U/mL olarak ölçmüşlerdir. Saflaştırma için amonyum sülfat çöktürmesi, etanol/eter çöktürmesi, diyaliz, Amberlite IRA 410 (Cl- formu) ile anyon değiştirme kromatografisi ve Tris–HCl tamponu (pH 8,0) kullanarak Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanmışlardır. Enzim %8,36 verim ile 208-kat saflaştırılmış ve 520 U/mg olarak spesifik aktivite elde etmişlerdir. Saf enzimin yaklaşık 74,8 kDa molekül kütlesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Lineweaver–Burk eğrisine göre; 4-nitro fenilpalmitat substrat olarak kullanıldığında V_{max} 0,64 mM/mg/dak ve K_M 29 mM olarak bulmuşlardır. Lipaz enzimi pH 8 ve 45°C'de optimum aktivite göstermişlerdir. Ca^{2+} (%18) ve Mg^{2+} (%12) ile enzim aktivitesi artarken, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} ve Fe^{2+} iyonları ile azaldığını belirtmişlerdir. 70 mM konsantrasyondaki EDTA lipazı büyük ölçüde inhibe ederken, Fenil metil sülfonil florür (PMSF, 70 mM) tamamen inaktif hale getirdiğini belirtmişlerdir. Enzim sadece Ca^{2+} ile inkübe edildikten 45 dakika sonra

aktivitesinin %91,5 korurken, Ca^{2+} ve sorbitolün bir kombinasyonu ile lipaz aktivitesi sinerjik olarak uyarmıştır. Bunlara ilaveten, daha fazla sayıda çift bağ içeren triaçilgliserollere karşı lipaz enzimi hidrolitik olarak dayanıklı olduğunu bulmuşlardır.

Shariff *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada, termofilik bir bakteri olan *Bacillus* sp. L2 suşunu Malezya'nın sıcak kaynak sularından izole etmişlerdir. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi için petri ve broth deneyleri yapmışlardır. Lipaz üretiminin pH 7,0'de, 150 rpm çalkalama hızı ve %1'lik başlangıç inokülüm miktarı ile 70°C'de 28 saatlik inkübasyon sonunda gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Hücre dışı L2 lipazının üretim ve salgılanmasını etkileyen trehaloz, Ca^{2+} ve Tween 60 gibi çok sayıda faktör olduğunu tespit etmişlerdir. Lipazın molekül ağırlığının ise 39 kDa olduğunu göstermişlerdir.

Chen and Lin (2007) yaptıkları çalışmada, *Bacillus cereus* C71 bakterisinden lipaz enzimini saflaştırmışlardır. İşlem sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, fenil-sefaroz kromatografisi, DEAE iyon değiştirme kromatografisi ve CIM1 QA kromatografisi yöntemlerini kullanarak %18 verim ile 1092-kat olarak lipaz enzimini saflaşmıştır. Enzimin molekül yaklaşık 42 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzim pH 8,5–10,0 arasında aktivite gösterdiğini ve 35°C 3 saat inkübasyondan sonra aktivitesinin %92'sini koruduğunu belirtmişlerdir. Optimum sıcaklık 33°C ve optimum pH 9,0 olarak bulmuşlardır. C4- C12 arasında zincir uzunluğuna sahip *p*-nitrofenil esterlerini hidroliz ettiğini belirtmişlerdir. Aktivitesi non-iyonik yüzey-aktif maddelerle artarken, Cu^{2+} ve Zn^{2+} varlığında azaldığı sonucuna varmışlardır. Ticari lipazlarla karşılaştırıldığında saflaştırılan lipaz, etil 2- arilpropanoatın R-izomerine karşı daha yüksek enantiyoseçicilik göstererek saf ilaçların hazırlanmasında katalizör olarak da kullanılabileceği görüşüne varmışlardır.

Nawani *et al.* (2006) yaptıkları çalışmada, hücre-dışı ısıya dayanıklı lipaz enzimini termofilik *Bacillus* sp. türünden saflaştırmışlardır. Enzimin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi, fenil-sepharose (jel filtrasyon) kromatografisi ve Q-sepharose kromatografisi yötemlerini kullanmışlardır. Sonuçta 9730 U/mg protein spesifik aktivite ile 58 kat ve %10 verimle saflaştırmıştır. SDS-PAGE yöntemi ile

proteinin molekül kütlesi 61 kDa, jel filtrasyon kromatografisinde ise yaklaşık 60 kDa, ayrıca enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 60–65°C, optimum pH ise 8,5 olduğu belirlemişlerdir. 1 saatlik inkübasyonun sonunda (60°C, pH 8,0) aktivitenin %100 korunduğunu Mg^{2+} (10 mM) ile lipazın aktivitesinin arttığı, civa (10 mM) ile inaktif olduğu tespit etmişlerdir. Termolizin enzimi %50 inhibe ederken, tripsin ve kimotripsinin enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. EDTA, PMSF, DTT, SDS, βME'nin 100 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının ise lipolitik enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlemlemişlerdir. *p*-nitrofenil laurat substratıyla enzimin K_M değerinin 0,5 mM, V_{max} değerinin ise 0,139 μM/dak/mL olduğu belirlemişlerdir.

Kanwar *et al.* (2006) yaptıkları çalışmada, *Bacillus coagulans* MTCC-6375 türünden hücre-dışı lipaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırma sırasında DEAE-selüloz anyon değiştirme, oktil-sefaroz hidrofobik kolon kromatografilerini kullanmışlar ve enzimi 76,4-kat saflıkla elde etmişlerdir. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi jel elektroforezinde yaklaşık 103 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzimin, optimum sıcaklığının 45°C; pH'sının ise 8,5 olduğunu belirlemişlerdir. 55°C'de 20 dakika inkübasyon sonunda aktivitesi yaklaşık %50 oranında koruduğunu belirtmişlerdir. Ca^{2+}, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} ve Fe^{3+} (1 mM) lipazın aktivitesini arttırırken, EDTA (150 mM) lipaz aktivitesini inhibe etmiştir. 15 mM PMSF lipaz aktivitesini %98 azaltmıştır. Enzimin 8 (*p*NPC) ve 16 (*p*NPP) karbon zincir uzunluğundaki *p*-nitrofenil esterlerine karşı spesifik olduğu bulmuşlardır. Ayrıca *p*NPP'nin hidrolizinde lipazın, K_M değerinin 28 mM iken, V_{max} değerinin 0,44 mmol mg^{-1} dak^{-1}; *p*NPC'nın hidrolizinde ise K_M'nin 32 mM, V_{max}'ın ise 0,7 mmol mg^{-1} dak^{-1} olduğu tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan su örneği Erzurum ili Ilıca ilçesi kaplıcası'ndan temin edildi.

3.1.1. Kimyasallar

Tris, Akrilamid, Bisakrilamid, N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin (TEMED), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), SDS, TritonX-100, Tween-80, Tween-20, Amonyum persülfat (PER), *β*-merkaptoetanol, İzopropanol, DMSO (Sigma), Glisin, Bromtimol mavisi, BSA (Merck), Sodyum asetat, Karboksimetilseloz(CMC), K_2HPO_4, KH_2PO_4, $CaCl_2$, NaCl, Congo kırmızısı, Gliserol, HCl, NaOH, H_2O_2, DMSO, $MgCl_2$, dNTP, TAE, Amfisilin, IPTG, X-gal, Dimetilformamid, Soya pepton, Tripton, Agar ve Skimmilk powder, Coomassie Brillant Blue G-250, Sephadex G-100 kolonu, Q-Sepharose kolonu, Coomassie Brillant Blue R-250, *β*-merkaptoetanol, Fast Red TR, α-naftil asetat, *p*NPA (*p*-nitrofenil asetat), *p*NPB (*p*-nitrofenil bütirat), *p*NPO (*p*- nitrofenil oktaonat), *p*NPL (*p*- nitrofenil laurat), *p*NPD (*p*-nitrofenil decanoate), Malaşit yeşili, Kristal viyolet, Na_2HPO_4, K_2HPO_4, NaCl, NH_4Cl, $MgSO_4$, $CaCl_2$, Tribütirin agar, Rhodamine B, TSA (Triptic Soy Agar), TSB (Triptic Soya Broth), Luria Bertani (LB) Broth

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Steril Kabin (Telstar AV -100)
Spektrofotometre (Beckman Coulter DU'730 Life science UV/V is spectrophotometer)
Santrifüj (Hettich)
Magnetik Karıştırıcı (Stirrer HS31)
Etüv (Termo Scientific Heraus Incubator)
Vorteks (WiseMix)

Çalkalayıcı (Midi Dual 14)
İnkübatör (Sanyo)
Deep-Freeze (Harris, -20°C)
Hassas Terazi (Geg, Avery)
Otoklav (Hıclave Hv-50L)
Su Banyosu (Grant 6G)
Sterilizatör (Heraus)
pH metre (Metler Toledo)
Kar makinesi (Scotsman AF-20)
Saf su cihazı (Bamstead Pure Easy)
Sonikatör (Heidolph)
Peristaltik pompa (Ismatec)
Elektroforez tankı (Bıorad (dikey))
Güç kaynağı (1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135)
Buzdolabı (Siemens)

3.1.3. Çözeltiler

3.1.3.a. Bakteri izolasyonu ve tanimlanmasi sirasinda kullanilan çözeltiler

1. %0,85'lik NaCl'nin çözeltisi: 8,5 mg NaCl'nin hacmi saf su ile 1 L ye tamamlanarak otoklavlandı.
2. 1XTAE ve TBE tamponu: 10XTBE veya TAE'den 100 mL alınarak, son hacim steril saf su ile1000 mL'ye tamamlandı.
3. 100 mM Kalsiyum klorür solüsyonu: 111 mg $CaCl_2$, 10 mL saf suda çözülerek otoklavlandı ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
4. Amfisilin solüsyonu: 20 mg amfisilin tartılarak 1mL steril saf su içerisinde çözüldü. Ardından 0,22 µm çapındaki milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.
5. X-Gal solüsyonu: 400 mg X-Gal tartılarak, 10mL dimetilformamid içerisinde çözüldü ve kullanılıncaya kadar ışık almayan şişede -20°C'de muhafaza edildi.

6. IPTG solüsyonu: 238 mg IPTG tartılarak 10 mL steril saf su içerisinde çözüldü ve 0,22 μm çapındaki milipor filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.
7. %3'lük KOH çözeltisi: 6 g KOH 200 mL steril distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.
8. Lügol solüsyonu: 1 gr iyot ve 2 g KCl tartılarak toplam hacim steril saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
9. Safranin solüsyonu: 1g safranin, %96'lık EtOH'da çözülerek üzerine, 100mL saf su eklenerek hazırlandı.
10. Kristal violet çözeltisi: 2g kristal viyolet (gentian violet) tartıldı. Sonra %96'lık EtOH'da çözüldü ve üzerine 80 mL saf su eklenerek hazırlandı.
11. %7'lik H_2O_2 çözeltisi: 7 mL H_2O_2'in hacmi steril saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
12. Malaşit yeşili: 0,5 g malaşit yeşili (oksalat tuzu), 10 mL steril saf su içinde çözüldü.

3.1.3.b. Lipaz aktivite tayini için kullanılan çözeltiler

1. *p*NPA (*p*-nitrofenil asetat): 1,81 mg *p*-nitrofenil asetat tartıldı ve 1 mL asetonitril içerisinde çözüldü.
2. *p*NPB (*p*-nitrofenil bütirat): 1,8 μL *p*-nitrofenil bütirat alındı ve 1 mL asetonitril içerisinde çözüldü.
3. *p*NPO (*p*- nitrofenil oktaonat): 2,4 μL *p*- nitrofenil oktaonat alındı ve 1 mL asetonitril içerisinde çözüldü.
4. *p*NPL (*p*- nitrofenil laurat): 3,2 mg *p*- nitrofenil laurat tartıldı ve 1 mL asetonitril içerisinde çözüldü.
5. *p*NPP (*p*-nitrofenil palmitat): 3,8 mg *p*-nitrofenil palmitat tartıldı ve 1 mL asetonitril içerisinde çözüldü.
6. *p*NPD (*p*-nitrofenil decanoate): 2,9 mg *p*-nitrofenil decanoate tartıldı ve 1 mL asetonitril içerisinde çözüldü.

3.1.3.c. Doğal PAGE için kullanılan çözeltiler

1. Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi: 300 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 200 µL %0,1 bromofenol mavisi, 500 µL %80 gliserol ve 920 µL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı. Küçük hacimlere bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.
2. Doğal PAGE Yürütme Tamponu: 14,4 g Tris ve 3 g glisin yaklaşık 980 mL saf suda çözüldükten sonra, pH 8,3'e ayarlandı. Son çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.
3. Jel Boyama Çözeltisi: 62,5 mL glasiyel asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde 1 g Coomassie Brillant Blue-R250'nin çözülmesiyle hazırlandı.
4. Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 200 mL glasiyel asetik asit, 800 mL metanol ve 1200 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

Substrat Boyama Çözeltisi;

5. Renatürasyon çözeltisi: 0,1 M pH 7,5 Tris-HCI içerisinde %5'lik (a/h) Triton-X 100'ün çözünmesiyle hazırlandı.
6. A çözeltisi: 16 mg α-naftil asetat 4 mL asetonda çözüldükten sonra üzerine 36 mL 0,1 M Tris tamponu (pH 7,5) ilave edildi.
7. B çözeltisi: 40 mg Fast Red TR tuzu 40 mL 0.1 M Tris tamponunda (pH 7,5) çözülerek hazırlandı.

3.1.3.d. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl (pH 8,8): 12,11 g Tris tartılarak, 80 mL suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl ile yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH 6,8):12,11 g Tris tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid, 34,6 g su içinde karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 mL'ye tamamlandı.

5. %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak, 450 mL saf suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 mL ilave edildi, pH 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 6,8)'den 0,5 mL, %10'luk SDS'den 1 mL, %100'lük gliserinden 1 mL ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 mL alınarak saf suyla 10 mL'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µL olacak şekilde *β*-merkaptoetanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitlestirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su içerisinde 0,1 g Coomassie Brillant Blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su karıştırılarak elde edildi.

3.1.3.e. Q-Sepharose iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözelti

1. 20 mM Tris-HCI tampon çözeltisi (pH 7,5): 2,422 g Tris yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. 1M HCI ile pH 7,5'ye getirildikten sonra, son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözelti

1. 20 mM Tris-HCI tampon çözeltisi (pH 7,5): 2,422 g Tris, yaklaşık 900 mL saf suda çözüldü. 1M HCI ile pH 7,5'ye getirildikten sonra, son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.g. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler

1. Coomassie Brillant Blue G-250 boyası: 100 mg Coomassie Brillant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.
2. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL; protein tayini için kullanılan çözelti): 1 mg standart serum albuminin 1 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

3.1.3.h. Kinetiğinin çalişilmasi için kullanılan çözeltiler

1. Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,205 g sodyum asetat çözüldükten sonra, pH'sı 1 N asetik asit ile 4,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
2. Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,205 g sodyum asetat çözüldükten sonra, pH'sı 1 N asetik asit ile 5,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
3. MOPS Tamponu (50 mM, pH 6,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,52 g MOPS çözüldükten sonra, pH'sı 1 N NaOH ile 6,0'a ayarlanarak hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
4. MOPS Tamponu (50 mM, pH 7,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,52 g MOPS çözüldükten sonra, pH'sı 1 N NaOH ile 7,0'e ayarlanarak, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
5. Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,3028 g Tris çözüldükten sonra, pH'sı 1 N HCl ile 8,0'e ayarlanarak, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
6. Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,3028 g Tris çözüldükten sonra, pH'sı 1 N HCl ile 9,0 a ayarlanarak, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
7. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,187 g Glisin çözüldükten sonra, pH'sı 1 N NaOH ile 10'a ayarlanarak, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
8. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,187 g Glisin çözüldükten sonra, pH'sı 1 N NaOH ile 11'e ayarlanarak, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
9. Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 12,0): Yaklaşık 45 mL saf suda 0,187 g Glisin çözüldükten sonra, pH'sı 1 N NaOH ile 12'e ayarlanarak, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.4. Besiyerleri

1. TSA (Triptic Soy Agar): TSA (Oxoid CM0131) besiyerinden 4 g tartılarak, 100 mL saf su içerisinde çözüldü. Ardından 121°C'de 15 dak otoklavlanarak hazırlandı.
2. TSB (Triptic Soya Broth): TSB (Oxoid CM0129) besiyerinden 3 g tartılarak, 100 mL saf su içerisinde çözüldü. Ardından 121°C'de 15 dak otoklavlanarak hazırlandı.
3. Luria Bertani (LB) Broth: LB (Sigma L3022) besiyerinden 2 g tartılarak, 100 mL saf su içerisinde çözüldü. Ardından 121°C'de 15 dak otoklavlanarak hazırlandı.
4. Nitrat besiyeri: 1 L distile suya 5 g NaCl, 2 g KNO_3, 10 g pepton, ve 3 g agar katılarak kaynatıldı. pH 7 ye ayarlanarak, 3mL'lik tüplere aktarıldı. 121°C'de 15 dak otoklavlanarak steril edildi.
5. Proteaz besiyeri: 1 L saf su içerisine 10 gr pepton, 3 gr maya özütü, 5 g NaCl, 15 g agar katılarak 121°C'de 15 dak steril edildi ve 11 g Skimmilk powder besiyerine sonradan katıldı.
6. Ksilanaz besiyesi: 1 lt saf su içerisinde 5 g pepton, 1 gr maya özütü, 5 g NaCl, 15 g agar, 5 g ksilan, 1 g K_2HPO_4 çözüldü. 121°C'de 15 dak steril edilerek hazırlandı.
7. Selülaz besiyeri: 1 lt saf su içerisine 10 gr CMC, 10 gr maya özütü, 10 gr NaCl, 10 gr tripton ve 15 gr agar katıldı. 121°C'de 15 dak steril edilerek hazırlandı.
8. Amilaz besiyeri: 1 L saf su içerisine 6 g Na_2HPO_4, 3 g K_2HPO_4, 0,5 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 0,24 g $MgSO_4$, 0,24 g $CaCl_2$, 3 g pepton, 10 g nişasta ve 15 g agar katılarak 121°C'de 15 dak otoklavlandı.
9. Tribütirin Agar Besiyeri: 1L distile suya 23 g tribütirin agar, 10 mL gliserol tribütirat katıldı. Tamamen çözünene kadar ısıtıldı ve 121°C'de 15 dak otoklavlanarak steril edildi.
10. Rhodamine B Agar: 1 L distile suya 35 g LB agar, 10 gellan gum ve 10 mL yağ katılarak, 121°C'de 15 dak otoklavlandı. Otoklavdan sonra %0,1 w/v'lik Rhodamine B'den 10 mL eklenerek hazırlandı.

3.1.5. Kitler

Promega wizard^{R} genomic DNA purification kit (A2360); pGEM-T Easy Vector System: Promega-A1360; Wizard plus JV minipreps DNA purification System: Promega-A1330

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin toplanması

Çalışmada kullanılan sıcak su ve çamur örneği, Erzurum ili Ilıca Kaplıcasından alınarak aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi ve en kısa sürede çalışıldı.

3.2.2. Termofilik bakterilerin izolasyonu

Steril ağzı kapalı şişe içerisinde alınan su örneklerinin üzerine ambalajındaki orana göre belli miktarda TSB (Tripton Soya Broth) besiyeri eklenerek 55°C'de çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından %0,85'luk fizyolojik su kullanılarak bu örneklerden bir seri dilüsyon (10^{-1}-10^{-6}) hazırlandı ve her bir dilüsyondan 100'er µl alınarak, TSA (Tripton Soya Ağar) besiyerine yayma ekim tekniği kullanılarak inokülasyon gerçekleştirildi. Daha sonra bu petriler 55°C'ye ayarlı inkübatörde 24-48 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.3. Termofilik bakterilerin kantitatif taraması

Değişik dilüsyon plakalarından morfolojik olarak ayrık koloniler seçilerek, TSA plakalarına çizgi ekim yöntemiyle 3-4 faz olacak şekilde aktarıldı ve 55°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda saf kolonilerin bulunduğu petrilerden bu bakteriler 2-3 öze dolusu toplanılarak, stok besiyerlerine aktarıldı. Hazırlanan bu stok kültürler

kodlanarak (ST1, ST2, ST3,ST4, ST5, ST6, ST7, ST8, ST9, ST10, ST11) -86°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi (Adıgüzel vd 2006).

3.2.4. Test suşlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Bakterilerin hücre morfolojileri, gram özellikleri, endospor oluşturup oluşturmadıkları, katı ve sıvı ortamlardaki koloni morfolojileri, elde edilen izolatların tuz konsantrasyonları, büyüme sıcaklıkları, pH değeri ve atmosferik oksijen ihtiyaçları, katalaz, oksidaz, amilaz, selülaz, ksilanaz ve proteaz üretimi gibi özelliklerine bakıldı (Adıgüzel vd 2006).

3.2.4.a. Hücre morfolojisi

Stoklardan alınan saf bakteri strainleri, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde TSA besiyerine aktarıldıktan sonra 55-60°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerden preparat hazırlanarak, kristal violet ile basit boyama yapıldı, 1 dakika bekleme periyodundan sonra preparat yıkanarak kurutuldu. Daha sonra mikroskopta immersiyon objektifiyle incelendi (Saygılı 1995; Temiz 1996).

3.2.4.b. Koloni morfolojisi

Saflaştırılan bakteriler çizgi ekim yöntemiyle TSA besiyerine ekilerek, 55-60°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra koloni özellikleri incelendi (Saygılı 1995).

3.2.4.c. Gram boyama

Bakteri strainlerinin hücre duvar yapısındaki temel farklılıkların ortaya konması amacıyla yapılmaktadır. Bu gram özelliklerinin belirlenmesi için 2 farklı yönteme

başvurulmaktadır. İlki KOH testidir. Bu doğrultuda steril lamların üzerine hazırlanan steril %3'lük KOH çözeltisiden bir iki damla damlatıldı. TSA da büyütülen bakteri kolonisinden bir öze alınarak KOH içinde iyice yayıldı. Hücre duvar yapısına göre eğer bakteri sakız gibi yukarı uzarsa gram negatif, eğer uzama olmazsa gram pozitif olarak kaydedildi (Saygılı 2006).

İkinci yöntem olan gram boyamada ise 4 faklı işlem gerçekleştirildi. Bu amaçla TSA'da büyütülen genç kültürden alınan bir öze bakteri, temiz bir lam üzerine fikse edildi ve smear hazırlandı. İlk olarak kristal violet boyası ile 1 dak boyandı ve sonra saf su ile yıkandı. Bu boya her türlü hücreyi doğrudan mora boyar. Ardından Lügol ile preparatlar 1 dak kadar muamele edildi ve %96'lık etil alkol ile dikkatlice yıkandı. Gram negatif bakteriler rengini kaybederken, Gram pozitif bakteriler bünyesindeki kristal violet-lügol kompleksinden dolayı mor kalır. Tekrar saf sudan geçirilerek son kez safranin boyaması yapıldı. Preparat yıkandı ve kurutuldu. İmmersiyon objektifinde bakıldığında; Gram pozitif bakteriler mor, gram negatifler ise pembe görüldü (Özkan 2009).

3.2.4.d. Endospor varlığının belirlenmesi

Endospor, bakterilerin zor yaşam koşullarında kendilerini korumak amaçlı oluşturdukları bir yapıdır. Stoklardan alınan saf bakteri strainleri, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde TSA besiyerine aktarıldı ve endospor oluşumua nadan olacak stres koşullarına maruz bırakıldı. Süre sonunda her bir bakteriden smear hazırlandı ve hazırlanan smearlar 20 kez alevden geçirildi. İlk boya olarak malaşit yeşili kullanıldı ve preparatlar üzerine kurutma kağıdı konulup, 10 dakika bekletildi. Süre sonunda dikkatlice saf su ile 10 sn yıkama yapıldı. Karşıt boya olarak 20-30 sn safranin ile preparat muamele edildi. Preparat saf su ile yıkandı, kurutuldu ve immersiyon objektifinde incelendi (Harley and Prescott 2002).

3.2.4.e. Bakterilerin yaşayabildikleri tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi

Bakterilerin gelişimi amaçlı kullanılan TSB besiyerlerinin içerisine son tuz konsantrasyonları %2, %4, %6, %8, %10 olacak şekilde NaCl tuzu eklendi. Steril tüplere, steril öze ile inokülasyon yapıldı ve 55°C'de 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spektrofotometrik olarak 600'nm de köre (TSB) karşı okundu (Baltacı vd 2016).

3.2.4.f. Bakterilerin yaşayabildikleri sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

Bakteriler TSB besiyerleri içerisine inoküle edilerek, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C sıcaklıklarda inkübe edildi ve 600 nm'de spektrofotometrik ölçümlerle, minumum, maksimum ve optimum sıcaklıkları belirlendi (Harley and Prescott 2002).

3.2.4.g. Bakterilerin yaşayabildikleri pH değerlerinin belirlenmesi

İzolatları gelişimi için TSB besiyerleri içine inoküle edilen bakteriler, değişen pH değerlerinde (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) inkübe edildi. Spektrofotometrik olarak 600 nm'de ölçümleri yapıldı ve optimum, minimum ve maksimum pH değerleri belirlendi (Dulger vd 2004).

3.2.4.h. Oksidaz testi

Yapılan oksidaz testleri, canlının elektron transferi sırasında sitokrom c proteinlerine sahip olup olmadığını gösterir. Eğer oksidaz c sistemi bulunuyorsa, enzimin reaksiyon vermesi sonucunda ortamda mavi renk oluşumu gözlenir. Testte hazır kitler kullanılır. %1 tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren bu kitler, 1 damla saf su ile aktifleştirildi. Üzerine steril öze ile 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden konuldu.

Oksidaz pozitif bakteriler mavi-mor renk oluşumu verirken, oksidaz negatiflerde renk oluşumu gözlenmedi (Acar 2009).

3.2.4.ı. Katalaz testi

Elde edilen strainlerin katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını tespit etmeyi sağlayan bir testtir. Katalaz enzimi, ETS sisteminde reaksiyonlar sonucunda meydana gelen hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijen gazına dönüştürür. Oksijen açığa çıktığı zaman hava kabarcıkları gözlenir. Bu nedenle test için temiz bir lama 1 damla %5'lik hidrojn peroksittendamlatıldı ve üzerine bir öze dolusu bakteri aktarılarak homojenize edildi. Hava kabarcığı çıkan bakteriler katalaz pozitif, çıkartmayanlar ise katalaz negatif olarak kaydedildi (Adıgüzel vd 2006).

3.2.4.i. Nitrat üretimi testi

Nitrat besiyeri 121°C'de 15 dak süreyle otoklavlandıktan sonra, 10 mL'lik steril test tüplerine 3'er mL olacak şekilde aktarıldı. Besiyeri donduktan sonra, test edilecek strainler saplama ekim yöntemiyle besi yerine inoküle edildi. Tüplerin üstü otoklavlanarak, sıcaklığı 50°C'ye düşürülen %3'lük su agarı ile kapatıldı. 55-60°C'de 2 gece süre ile inkübasyona bırakılarak, bakterinin ortamda gelişmesi nitrat pozitif, gelişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi (Klement *et al.* 1990).

3.2.4.j. Amilaz testi

Bakterilerin nişasta molekülünü parçalayan amilaz enzimini içerip içermediklerini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen bir testtir. Bakteriler amilaz besiyerine ekildi. 55°C'de 2-3 günlük inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petri üzerine lugol solüsyonundan 5 mL kadar döküldü ve mavi renk verenler negatif, mavi renk vermeyip ekim çizgileri etrafında zon oluşturanlar ise pozitif olarak değerlendirildi (Klement *et al.* 1990; Narayanasamy 1997).

3.2.4.k. Proteaz testi

Skimmilk Powder katılarak steril hale getirilen besiyeri petrilere dökülerek donması beklendi. Daha sonra herbir örnekten steril öze ile alınarak çizgi ekim yöntemiyle petrilere inokülasyon gerçekleştirildi. Daha sonra petriler 55°C'ye ayarlanmış etüve bırakılarak zon oluşumu belirlendi (Adinarayana *et al.* 2003).

3.2.4.l. Ksilanaz testi

Ksilan petrilerine, her bir izolattan steril öze ile çizgi ekim yapıldı. Daha sonra petriler 3-4 gün süre ile 55°C'ye ayarlanmış etüve bırakılarak, termofilik bakterilerin zon oluşturup oluşturmadıkları kaydedildi.

3.2.4.m. Selülaz testi

Selülaz aktivitesini belirlemek amacıyla, termofilik izolatlar çizgi ekim yöntemiyle selülaz besiyerine aktarıldı ve 55°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilerin üzerine Kongo kırmızısı döküldü ve 15 dak bekletildi. Daha sonra 1 M NaCl ile yıkanarak zon oluşumu gözlemlendi.

3.2.5. Moleküler testler

3.2.5.a. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

1. Genomik DNA izolasyonu

İzole edilen bakterilerin 24 saatlik kültürleri, TSA katı besiyerinden, TSB sıvı besiyerine aktarıldı ve çalkalayıcı inkübatörde 150 rpm de bir gece 55°C inkübasyona bırakıldı ve Promega wizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolü ile DNA izolasyonu yapıldı.

- 24 saat inkübasyona bırakılan 5 mL TSB besiyerleri, 16000 rpm'de çöktürüldü. Süpernatant atıldıktan sonra, 50 mM EDTA'dan çökelti üzerine 480 µL eklendi. 10 mg/mL olan 120 µL lizozim ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası karışım 14000 rpm'de 2 dak santfirüj yapılıp, süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine 600 µL Nüklei Lizis eklendi ve homojen hale getirmek için hafifçe pipetaj yapıldı.
- Karışım 5 dak boyunca 80°C'de inkübe edildikten sonra, oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu ve üzerine 3 µL RNase A eklendi. Daha sonra alt üst edilen karışım yarım saat 37°C'de inkübe edildi.
- Oda sıcaklığında soğutulan karışıma Protein Presipitasyon solüsyonundan 200 µL eklendikten sonra 20 sn vortekslendi.
- Karışım buzda 5 dak ekletildikten sonra, 14000 rpm'de 30 sn santfirüj edildi. Elde edilen süpernatant, içinde 600 µL izopropanol bulunan yeni ependorf içerisine alındı ve pellet oluşumu görünür oluncaya kadar ependorflar alt üst edildi.
- Ardından tüpler tekrar 14000 rpm'de 2 dak santfirüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kurutma kağıdında içindeki sıvı tamamen uzaklaşıncaya kadar bekletildi.
- Üzerine %70'lik etanolden 600 µL eklendi ve 14000 rpm'de 2 dak santfirüj edildi. Yine süpernatant uzaklaştırıldı ve 20 dak 37°C'de inkübe edildi.
- Ependorflara 100'er µl DNA Rehidrasyon solüsyonu eklenerek, 65°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Hazır olan DNA tüpleri kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edildi.

2. 16S rRNA PCR işlemi

Evrensel olarak kabul edilen primerlerle çoğaltılan 16S rRNA bölgesi, evrimsel açıdan korunmuş bölge olduğundan, bakteri sistematiği açısından oldukça önemlidir. Her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan, 16S rRNA gen bölgesi 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3') ve 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı ve elde edilen PCR ürünlerinin 5µL'si %1'lik agaroz jelde yürütülerek istenen bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığı kontol edildi (Yanmis ve Adiguzel 2014).

Çizelge 3.1. 16S rRNA PCR bileşenleri

REAKTİFLER	**KONSANTRASYON**	**MİKTAR (µL)**
PCR Buffer	10X	3
dNTP 10X	10 mM	0,6
Forward primer	5 pmol	3
Reverse primer	5 pmol	3
DMSO	%99	1,2
$MgCl_2$	25 mM	1,8
ddH_2O	-	14
Kalıp DNA	100 ng	3
Taq DNA pol.	5u/µL	0,4
Toplam Hacim	-	30

Çizelge 3.2. PCR programı

Ön denatürasyon	95^{o}C	2 dak
Denatürasyon	94^{o}C	1 dak
Bağlanma	49^{o}C	1 dak
Uzama	72^{o}C	2 dak
Son uzama	72^{o}C	5 dak
Saklama	4^{o}C	-

PCR koşulları; ön denatürasyon 95°C, İkinci denatürasyon 94°C, bağlanma 49°C ve uzama basamağı olan 72°C ve 36 tekrar olacak şekilde dizayn edildi (Adıgüzel 2006; Baltacı vd 2016).

3. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

Kosantrasyonu %1 olacak şekilde 1X TAE tamponu içerisinde, agaroz çözüldü. Çözünme işlemi tamamlanıncaya kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. İçerisine 0,4 µL etidyum bromür eklendi (ekleme işlemi çözelti biraz soğuduktan sonra yapılmalıdır). Tank içerisine taraklar yerleştirildikten sonra, çözelti küvete döküldü. Jel polimerleştikten sonra, dikkatlice taraklar çıkartıldı. İlk kuyuya 10 kb DNA markırı (Sigma D-7058) konuldu. Diğer PCR ürünleri 6X yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. Örnekler 110 voltta 1 saat yürütüldükten sonra jelde yürüyen DNA bantları Quantum Vilber Laurnat Gel Documantation System ile görüntülendi (Baltacı vd 2006).

4. Kompotent hücre hazırlanması

Kompotent hücre hazırlamak amaçlı *Escherichia coli* JM101 suşu stoktan katı besiyerine 3-4 faz ekim yapılarak canlandırıldı. Tek bir koloni alınarak LB broth (4 mL) besiyerine inoküle edildi ve bir gece 37°C'de inkübe edildi. 2700 µL su üzerine, 300 µL kültür aktarılarak 600 nm'de spektorofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Böylece kültürden ne kadar alınması gerektiği hesaplandı. Ayrı bir erlende hazırlanan 60 mL LB broth üzerine, hesaplama sonucu eklenmesi gereken kültür miktarı ilave edildi ve 37°C'de 50-90 dak süre ile çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

Yaklaşık 45. dak'dan itibaren kültürden alınan örnek, 3 kat seyreltilerek, 600 nm'de 0,044-0,055 olana kadar 15 dak aralıklarla ölçüldü. Kültür istenilen değere ulaşılınca, santifirüjde 10 dak süre ile 4000 rpm'de çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Çökeltiye soğuk 100 mM'lık $CaCl_2$'den 10 mL eklendi ve 40 dak buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda, +4°C'de 4400 rpm'de 10 dak boyunca çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant atıldıktan sonra, üzerine 100 mM'lık $CaCl_2$'den 2 mL eklenerek buzdolabında 1 gece bekletildi.

5. Ligasyon basamağı

Çizelge 3.3. Ligasyon bileşenleri

Reaktif	Miktar (µL)
2X Ligasyon buffer	5 µL
PCR Ürünü	3 µL
Vektör	1 µL
T4 DNA Ligaz	1 µL
Toplam Hacim	10 µL

PCR tüplerinde karışım hazırlandı ve 16°C'de 16 saat süre ile bekletildikten sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de bekletildi.

6. Transformasyon basamağı

- Buzdolabında muhafaza edilen kompotentten 200'er µL alınarak, örnek sayısı kadar ependorfa bölündü. Üzerine ligasyon ürününden 2,5 µL eklendi ve yarım saat buzda bekletildi.
- Karışım 42°C sıcaklıktaki su banyosuna alınarak, 2 dak bekletildi ve ısı şokuna uğratıldı. Üzerine 200 µL LB besiyeri konularak, 37^{o}C'de 1 saat 40 dak inkübe edildi.
- Aynı zamanda daha önce hazırlanmış dolapta bekletilen amfisilinli katı besiyeri dışarı çıkarılarak, oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra katı besiyerine 40 µL X-gal ve 40 µL IPTG yayıldı.
- Üzerine kompotent + ligasyon ürünü karışımından 150 µL alınarak, steril drigalski özesi ile petriye yayıldı.
- Ardından petriler 37°C'ye ayarlanmış etüvde 14 saat süre ile inkübe edildi.

7. Kolonilerin seçilmesi ve sıvı kültüre alınması

37°C'ye ayarlanmış etüve bırakılan petriler, etüvden alınarak +4°C'ye bırakıldı ve bir gecede burada bekletildi. Mavi beyaz koloniler oluşumu gözlendikten sonra, beyaz koloniler steril bir kürdan ile alındı ve içinde 3 mL amfisilinli LB broth besiyeri bulunan tüplere inoküle edildi ve 37°C'de bir gece inkübe edildi.

8. Koloni PCR

İnkübasyona bırakılan kültürden 4 µL alınıp, içinde 16 µL steri saf su bulunan tüplere konularak seyreltildi. Daha sonra su banyosuna alınarak, 10 dak kaynatıldı ve 2 dak buzda bekletilerek ısı şokuna maruz bırakıldı. Karışım 12000 rpm'de 5 dak süre ile santfirüj edildi.

Çizelge 3.4. Koloni PCR bileşenleri

Reaktif	**Miktar (µL)**
dH_2O	16,1
Tampon	3
dNTP miks	0,6
$MgCl_2$	1,8
T7 primer	2
SP6 primer	2
DMSO	1,2
Taq polimeraz	0,3
Süpernatant	3
Toplam Hacim	30

Çizelge 3.5. Koloni PCR reaksiyon koşulları

Ön denatürasyon	94°C	2 dak
Denatürasyon	94°C	30 sn
Bağlanma	55°C	30 sn
Uzama	72°C	2 dak
Son uzama	72°C	10 dak
Saklama	4°C	-

Hazırlanan %1'lik agaroz jelde; ilk kuyuya markır olmak üzere, negatif ve pozitif kontroller yüklendi. Jel 110 voltta 1 saat yürütüldükten sonra geni taşıyan koloniler seçildi ve amfisilin bulunan LB brotha aktarıldı.

9. Plazmit izolasyonu

Promega A1330 plazmit izolasyon kitine ait protokol uygulandı.

Protokole göre;

- LB besiyerinde üretilen kültür 11000 rpm'de 10 dak santfirüj edilerek süpernatant atıldı.
- Çökelti üzerine, 250 µL Cell Resuspension solüsyonu eklendi ve pipetaj ile homojen hale getirildi.
- Üzerine Cell Lysis solüsyonundan 250 µL eklenerek, alt üst edildi ve oda sıcaklığında 5 dak beklemeye bırakıldı.
- 5. dak sonunda üzerine, Alkaline Protease Solution dan 10 µL ilave edildi ve 5 dak daha oda sıcaklığında bekletildi.
- Nötralizasyon çözeltisinden 350 µL eklendikten sonra, 13000 rpm'de 10 dak santfirüjlendi.
- Kullanılacak olan süpernatanttan 700 µL alındı ve içinde kolon olan ependorf tüpüne aktarıldı. 13000 rpm'de 1 dak santrifüj edildi.

• Kolonun üstte kalan kısmına 750 µL Wash Solution eklendi ve santfirüjlemenin ardından tekrar kolonun üzerine, Wash Solution'dan 250 µL eklendi. 13000 rpm'de 2 dak daha santfirüj edildi.

• Alttaki sıvı uzaklaştırılıp, 1 dak 13000 rpm de tekrar santfirüj yapıldıktan sonra kolon yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine 100 µL Nuclease-Free Water ilave edilerek tekrar 1 dak 13000 rpm'de santfirüjlendi.

• Kolon çıkarılıp atıldıktan sonra tüpler -20°C'de konsantrasyon tespitine kadar muhafaza edildi. Daha sonra sonuçların kotrolü için EcoRI ile kesildi ve agaroz jelde yürütüldü (Baltacı 2016).

10. Plazmit konsantrasyonunun belirlenmesi

• 2 µL plazmit, 998 µL saf su ile karıştırılarak, spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda konsantrasyonu tespit edildi.

• 50 (sabit katsayı) x absorbans x 500 (dilüsyon oranı) ile plazmit konsantrasyonun 150-200 ng olması sağlandı.

• İstenilen konsantrasyona sahip plazmitlerden alınarak sekans analizi için Macrogen e gönderildi.

Gelen sekans sonuçları BioEdit programı ile analiz edilip, Fasta formatına döndürülerek primerler bulundu. Vektöre ait sekanslar çıkarılarak, diziler anlamlı hale getirilmişdi. Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan dizilerle karşılaştırılarak bakterilerin tür seviyesinde ki tanıları gerçekleştirildi (Adıgüzel vd 2015).

3.2.6. Enzim saflaştirilmasi ve karakterizasyonu çalişmalari

3.2.6.a. Lipaz enzim üreten bakterilerin tribütirin agar besiyerinde belirlenmesi

Test izolatları (ST1, ST2, ST3,ST4, ST5, ST6, ST7, ST8, ST9, ST10, ST11) -86°C'den alınarak, TSA besiyerine 3-4 faz ekildi ve 55°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. TSA'da büyüyen saf koloniler alınarak 5'er ml TSB besiyeri bulunan tüplere aktarldı ve

çalkalamalı inkübatörde 1 gece inkübe edildi. Daha sonra hazırlanan Tribütirin Agar Besiyeri (1 L distile su, 23 g tribütirin agar ve 10 mL Gliserol Tribütirat) pertilere dökülüp donduktan sonra, besiyerlerinin ortası delindi. TSB besiyerinde büyüyen sıvı kültürlerden 50µL alınarak, petrilere bırakıldı ve 2-3 gün 55°C'de büyütüldü. Tribütirin agar besiyerinde zon oluşturup oluşturmadığı gözlemlendi (Ertuğrul vd 2007).

3.2.6.b. Lipaz enzim üreten bakterilerin rhodamine B agar besiyerinde belirlenmesi

Termofilik izolatlar TSA besiyerine 3-4 faz ekilerek ve 55°C'de 1 gece inkübasyona bırakılarak stoklardan canlandırma yapıldı. Daha sonra TSA'da büyüyen bakteriler, 5'er mL'lik TSB besiyerlerine aktarılarak, çalkalamalı inkübatörde 1 gece daha büyümeye bırakıldı. Rhodamine B Agar (1 L distile su, 35 g LB agar, 10 g gellan gum, 10 mL yağ ve 10 mL %0,1 w/v'lik Rhodamine B) besiyeri hazırlandı ve pertilere dökülüp donduktan sonra, besiyerinin ortası delindi. TSB besiyerinde büyüyen sıvı kültürlerden 50µL alınarak petrilere bırakıldı ve 2-3 gün 55°C'de büyümeye bırakıldı. Rhodamine B besiyerinde büyüyen bakterilerin zon oluşturup oluşturmadıkları UV ışık altında incelendi (Arslanoğlu ve Adan 2013).

3.2.7. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 suşunun büyütülmesi

Yapılan petri denemeleri sonucu en iyi lipaz zonu veren *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 suşu bundan sonraki çalışmalar için seçilerek Luria-Bertani Besiyeri (LB) ortamında 55°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Elde edilen kültür soğutmalı santrifüjde 6.000 rpm +4°C'de 10 dakika santrifüjlenerek, bakterilerin çöktürülmesi sağlandı. Daha sonra çöktürülen bu bakteri, sonikatörde parçalanıp lipaz kaynağı olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.8. Hücre içi lipazin eldesi

LB besiyerinde büyütülen bakteri çökeleği, 50 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8,0) süspansiye edildi. Bu süspanse karışım, sonikatörde 5 dakika boyunca parçalandı. Parçalama işleminden sonra elde edilen homojenat, soğutmalı santrifüjde 13.000 rpm'de 4°C'de 40 dak boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham lipaz kaynağı olarak kullanıldı. Bu ham kaynakta enzim aktivitelerine bakıldı ve protein tayininin ardından, gerekli hesaplamalar yapıldı.

3.2.9. Enzim aktivite yöntemi

Lipaz aktivitesi *p*NPO (*p*-nitrofenil oktaonat), *p*NPA (*p*-nitrofenil asetat), *p*NPD (*p*-nitrofenil decanoate) ve *p*NPL (*p*-nitrofenil laurat) substratları ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Substratın asetonitril içerisinde 10 mM konsantrasyonunda hazırlanmış çözeltisi, etil alkol ve 50 mM Tris-HCl tamponu ile (pH 8,0) 1:4:95 oranında karıştırılarak, substrat karışımı hazırlandı. Bu karışımdan 980 µL alındı ve içerisine 20 µL enzim çözeltisi ilave edildikten sonra, oda sıcaklığında absorbans derişimleri 405 nm dalga boyunda ölçüldü. Aktivite dakikada oda sıcaklığında 1 µmol *p*-nitrofenol açığa çıkarmak için gerekli enzim miktarı olarak belirlendi ve özgül aktivite mg protein başına düşen aktivite olarak hesaplandı.

3.2.10. Kantitatif protein tayini

Hazırlanan homojenat ve saflaştırılan enzimin için kantitatif protein miktarı, Bradford metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brillant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (λmax=465 nm) ve mavi (λmax=595 nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümü ile olur. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça düşüktür (1-100 µg arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder ve iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri prosedürü şöyle gerçekleştirildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır

albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konularak saf su ile bütün tüplerin hacmi 100 µL'ye tamamlandı ve 4900 µL Coomessie Brillant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de 3 mL'lik cam küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 100 µL enzim numunesinin içinde bulunduğu tampon ile 4900 µl Coomessie Brillant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 10 kat veya daha çok seyreltme yapıldı. Elde edilen seyreltilmiş çözeltiden her tüpe 100 µL alınarak üzerlerine 4,9'ar mL renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Elde edilen değerler ile standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford 1976).

3.2.11. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, fenilalanin ve tirozin aminoasitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır. Bu özellikten yararlanılarak örnekteki protein miktarının yaklaşık olarak bulunmasını temel alan hızlı bir yöntemdir. Kromatografi işlemlerinin ardından eşit hacimlerde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvartz küvetlere alınarak, absorbansları spekrofotometrede köre (100 mM Tris-HCI pH 8,5) karşı okundu.

3.2.12. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 lipaz enziminin saflaştırma aşamaları

3.2.12.a. Q-Sepharose iyon değişim kromatografisi

Bu çalışmada Q-Sepharose anyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu metaryeli, hazır olarak satın alındı. Islak iyon değişim jeli, 6 mL/g oranında ve konsantre 20 mM Tris-HCI tampon çözeltisi (pH 7,5) ile karıştırılarak, 2-3 dak

bekletildi. Jelin bir süre dibe çökmesi beklendi. Daha sonra süpernatant dekante edildi. Dibe çöken jel tekrar tampon ile 6 mL/g oranında süspanse edildi. Uygun hacmi ölçülebilen bir cam silindire tatbik edilen karışımın dibe çökmesi beklendi. Bekleme süresi t=n.h formülünden hesaplandı. Burada;

t= zaman (dak)
h= Jelin kolon içersindeki yüksekliği (cm)
n=1,3 ile 2,4 arasında değişen bir faktör

Dibe çöken jelin hacmi hesaplandı (Bu hacmin kolon tatbikinden sonra elde edilen yatak hacmine eşit olması beklenir). Süpernatant derhal dekante edildi. Daha sonra kolona tatbik edildi ve yatak hacminin 2-4 katı hacimde tampon ile kolon yıkandı. Q-Sepharose kolonu (3,0x50 cm) 20 mM Tris-HCI tampon çözeltisi (pH 7,5) ile dengelendikten sonra akış hızı 12 mL/saat olacak şekilde ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek sonikatör sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Lipaz enzimi Q-Sepharose kolon materyaline tutundu ve 20 mM Tris-HCI tampon çözeltisi (pH 7,5) ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponunun pH ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için 0,25-2,5 mM NaCl gradientli Tris-HCI tampon çözeltisi ile elüsyon işlemi gerçekleştirildi. EIüatlar, kolon akış hızı 12 mL/saat'e ayarlanarak yaklaşık 2 mL'lik hacimler halinde tüplere alındı. 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ve protein tayini yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri daha sonraki işlemlerde kullanıldı. Son aşama olarak spesifik aktivite hesaplandı ve saflaştırma oranı belirlendi.

3.2.12.b. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

Kolon materyali olarak kullanılan Sephadex G-100 den 3 g alınıp 200 mL su da oda sıcaklığında 1 gece bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş polimer materyalin içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trombu kullanılarak vakumla alındı. Şişirilmiş ve havası

uzaklaştırılmış jel pH 7,5 olan 20 mM Tris-HCI tamponuyla dolu kolona aktarıldı ve paketlendi. Kolonu dengelemek için 20 mM Tris-HCI pH 7,5 tampon çözeltisi kullanıldı. Kolonun akış hızı peristaltik pompayla 3 mL/saat'e ayarlandı. Dengeleme tamponu kolondan uzun süre geçirilerek ilave edilen tampon ile alttan akan tamponun 280 nm'de absorbansı ile pH değerinin aynı olduğu anda kolonun dengelendiği anlaşıldı. Dengelenmiş kolona numunelerin tatbiki için kolonun üzerindeki kapalı sistem açıldı ve jelin üzerinde birikmiş tamponun emilmesi beklendi. Tampon oranı jel seviyesine indiğinde iyon değişim kolonundan elüe edilip hacmin %10'u kadar gliserol ile karıştırılan enzim numunesi jelin üzerine tatbik edildi. Numune tatbik edildikten sonra numunenin jel seviyesine inmesi beklendi ve daha sonra tampon ilave edildi. Stok tampon çözelti ile kapalı sistem oluşturularak sabit hızla akış sağlandı. Daha sonra elüatlar alınmaya başlandı ve alınan elüatlarda 280 nm de absorbans değerlerine bakılıp elüat ve kör olarak kullanılan elüsyon tamponunun absorbans farkı sıfır olana kadar elüatlar alındı ve kaydedildi. 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ve protein tayini yapıldı. Son aşama olarak spesifik aktivite hesaplandı ve saflaştırma oranı belirlendi.

3.2.13. Doğal poliakrilamid jel elektroforezi (doğal PAGE)

SDS katılmadan hazırlanan Doğal PAGE için %5'lik yığma jeli ve %10'luk ayırma jeli hazırlandı.

Çizelge 3.6. Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları

	%10'luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)	**%5'lik Yığma Jeli Bileşenleri (mL)**
Saf su	6,2	5,4
%30 Akrilamid/bisakrilamid	6,6	1,34
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	1
1,5 M Tris (pH 8,8)	5	-
%10 APS	0,2	0,08
TEMED	0,008	0,008

Jel SDS içermeyecek şekilde hazırlandıktan sonra tanka yerleştirildi ve tankın içerisi doğal PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Her bir kuyucuk için numuneler ependorflara konuldu ve doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırıldı. Hamilton şırıngası vasıtasıyla kuyucuklara yüklendi. Ardından elektroforez ünitesi boya yığma jelinden çıkana kadar 20 mA'de, daha sonra da boya ayırma jelinin alt kısmına gelene kadar yaklaşık olarak 25 mA'de yürütüldü. Jel tanktan çıkarıldıktan sonra üzerine jel boyama çözeltisi ilave edildi ve yavaş bir şekilde 10 dakika sallanarak bekletildi. Daha sonra jel boya uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandı.

"Fast Red" ile Substrat Boyama

Doğal-PAGE yapılıp yürütüldükten sonra sonra jel 60°C de Fast Red A ve B çözeltilerinin karışımında (1:1) 30 dakika bekletildi. Oluşan kırmızı-kahverengi bantlar lipaz ve esterazın varlığını göstermektedir.

"Coommassie Blue R 250" ile Boyama

Elektroforez jeli Fast Red boyamasından çıkarılıp saf su ile yıkandıktan sonra doğrudan Coommassie Blue R 250 çözeltisi ile boyandı. Sonuçta bütün proteinlere ait bantlar gözlemlanmiş oldu.

3.2.14. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile lipaz enzim safliğinin kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kıskaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Jelin

donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim numunesi; 100 µl enzim örneği, 100 µL numune tamponu, 100 mL gliserol olacak şekilde hazırlandı. Örnekler 5 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra enzim numuneleri her bir kuyucuğa dikkatli bir şekilde yüklendi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 30 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 120 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleme çözeltisine konuldu. Sabitleme çözeltisinde 30 dakika çalkalayıcıda yıkanan jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve 6 saat çalkalayıcıda bırakıldı. Daha sonra jel yıkama çözeltisiyle 2 saat yıkandı. Protein bantları belirginleşen jel görüntüleme cihazına konularak fotoğrafı çekildi.

Çizelge 3.7. SDS-PAGE'de kullanılan bileşenler ve oranları

	%8'lik Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)	**%3'lük Yığma Jeli Bileşenleri (mL)**
Saf su	2,35	1,84
%30 Akrilamid/bisakrilamid	3,3	0,325
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	0,31
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,75	-
%1,5 PER	0,2	0,05
%5 TEMED	0,1	0,025
%10 SDS	0,15	0,025

3.2.15. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) İle lipaz enziminin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak İntron Prestained PageRuler 24052 kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin Rf değerleri hesaplanarak Rf - log MK standart grafiği çizildi. Daha sonra *Bacillus thermoamylovarans* ST-10 bakterisinden elde edilen lipaz enzimi için Rf değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak Lipaz enziminin log MK'sı belirlendi. Bu değerin antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi belirlendi.

Proteinlerin Rf değerleri şu formüle göre belirlendi;

$$Rf = Xe/Xboya$$

(X_e= Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya}= Boyanın yürüme mesafesi)

3.2.16. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 lipaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu

Lipazın kinetik özelliklerini araştırmak amacıyla en iyi substrat belirlendi ve bununla optimum pH ve sıcaklık değerleri, stabil sıcaklık ve pH, protein miktarı ve bazı kimyasallar, deterjanlar ve metal iyonlarının aktivite üzerine etkisi, V_{max}, K_m değerlerinin tayini yapıldı.

3.2.16.a. Lipaz enzimi için optimum pH ve stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar

B. thermoamylovorans ST-10 lipazının aktivitesi, pH'ın bir fonksiyonu olarak farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak *p*-nitrofenil asetat, *p*-

nitrofenil oktaonat, *p*-nitrofenil laurat ve *p*-nitrofenil decanoate kullanılarak belirlendi. Bunun için, 50 mM konsantrasyonlarında hazırlanmış olan; Asetat tamponu (pH 4,0-5,0), MOPS tamponu(pH 6,0-7,0), Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0) ve Glisin-NaOH tamponları (pH 10,0-12,0) kullanıldı. Belirlenen optimum pH değerinden faydalanılarak substrat konsantrasyonunun, protein miktarının ve diğer parametrelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Enzimin pH profilinin grafik çiziminde en yüksek aktivitenin gözlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek amacıyla, enzim 50 mM konsantrasyonunda pH 4-12 arasında enzim-tampon karışımları +4°C'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre içeirsinde optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. Aynı şekilde hazırlanan ancak inkübasyona bırakılmamış enzim-tampon karışımlarının optimum şartlar altında aktiviteleri bulunarak yüzde kalan aktiviteler hesaplandı. Enzimin pH stabilitesi grafiğinin çiziminde, farklı pH değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi (Rahman *et al.* 2006).

3.2.16.b. Lipaz enzimi için optimum sicakliğin ve stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

B. thermoamylovorans ST-10 lipazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 10°C'lik artışlarla 10-90°C aralığında sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. 30 dakika inkübe edilen tampon ve substrat çözeltisi karışımları, belirlenen optimum pH değerinde ve belirtilen sıcaklık aralığında çalışıldı. Sonuçlar grafiğe aktarılarak değerlendirildiğinde grafikte gözlenen pik optimum sıcaklık değeri olarak alındı. Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin gözlendiği sıcaklık değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

Enzimin stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla enzim; oda sıcaklığı, 40, 50 ve 60°C sıcaklıklarda enzimin aktivitesine bağlı olarak toplam 6 güne kadar değişen sürelerde inkübe edildikten sonra optimum şartlar altında aktivite tayinleri gerçekleştirildi. *B. thermoamylovorans* ST-10 lipazının kalan yüzde aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı. Enzim sıcaklık kararlılığını gösteren grafiğinin çiziminde, farklı sıcaklık değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek inkübasyon sonrası elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

3.2.16.c. Lipaz enzimi substratlari için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasina yönelik çalişmalar

Enzimin aktivite gösterdiği en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, daha önceden belirlenen optimum pH ve sıcaklık enzim aktivitesi *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil oktaonat, *p*-nitrofenil laurat ve *p*-nitrofenil decanoate substratlarının değişen miktarlarına (0,01-1 mM) karşı belirlendi. Enzim konsantrasyonunda ise 30 µg/mL olacak şekilde ayarlama yapıldı. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi ve Lineweaver-Burk eğrisi yardımıyla her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.2.16.d. Bazı kimyasallar, deterjanlar ve metal iyonlarinin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemeye yönelik çalışmalar

B. thermoamylovorans ST-10 lipazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Hg^{2+}, Na^{+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} ve Cu^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri kullanıldı. Metal iyonlarının reaksiyon karışımlarında son konsantrasyonu 5 mM arasında olacak şekilde ilave edildi ve optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı.

B. thermoamylovoran ST-10 lipazının aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini incelemek amacıyla Triton X-100, Tween-80, Tween-20 ve SDS kullanıldı. Bu

deterjanların %10'luk stok çözeltileri hazırlandı ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlar altında aktivite tayinleri yapıldı.

Ayrıca β-merkaptoetanol (β-ME) ve EDTA son konsantrasyonu da 5 mM olacak şekilde ilave edilerek, optimum şartlarda aktivite tayini yapıldı. Metal iyonu, deterjan ve kimyasal içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek karışımın aktivitesi elde edilen sonuçlarla kıyaslandı ve % bağıl aktiviteler hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu

Bu çalışmada Erzurum ili, Ilıca ilçe kaplıcasından toplam 11 termofilik bakteri straini (ST-1- ST-11) izole edilerek, tür düzeyindeki teşhisleri gerçekleştirildi. Petri denemeleri sonucunda en yüksek lipolitik zonu veren izolat seçilerek, enzim saflaştırması ve karakterizasyon işlemleri yapıldı.

4.2. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

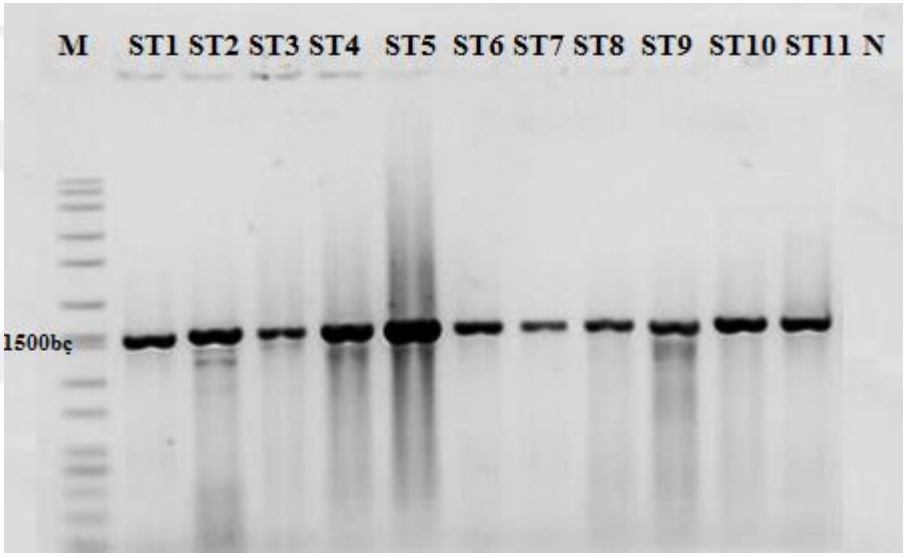
İzolasyon çalışması sonucunda elde edilen test suşlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bir dizi test gerçekleştirildi. Bu analizler sonucunda izolatların tamamının çubuksu hücre morfolojisine, krem koloni rengine sahip, gram pozitif bakteriler olduğu tespit edildi. Ayrıca bu suşların; endospor (ST-10 hariç), amilaz (ST-2, ST-4, ST-8 ve ST-11 hariç), proteaz (ST-4, ST-10 ve ST-11 hariç), ksilanaz (ST-4, ST-8 ve ST-11 hariç) ve selülaz (ST-2, ST-4 ve ST-11 hariç) testleri bakımından da pozitif sonuç verdiği belirlendi (Çizelge 4.1.). Daha sonra bu izolatların üreyebildiği optimum tuz konsantrasyonları, pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucunda sırasıyla; %2-6, 7-8 ve 45-60°C'de gelişebildikleri gözlemlendi.

Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

Stok kodu	Gram	Endo spor	Morfoloji	Tuz konsantrasyonu %	pH toleransı	Sıcaklık (°C)	Oksidaz	Katalaz	Nitrat	Amilaz	Proteaz	Ksilanaz	Selülaz
ST-1	+	+	Çubuk	2-8	7-9	30-60	+	+	+	+	+	+	+
ST-2	+	+	Çubuk	2-8	6-9	40-60	+	+	+	-	+	+	-
ST-3	+	+	Çubuk	2-8	7-9	30-60	+	+	+	+	+	+	+
ST-4	+	+	Çubuk	2-10	7-8	30-70	+	+	+	-	-	-	-
ST-5	+	+	Çubuk	2-8	7-9	30-60	+	+	+	+	+	+	+
ST-6	+	+	Çubuk	2-8	7-9	30-60	+	+	+	+	+	+	+
ST-7	+	+	Çubuk	2-8	7-9	30-60	+	+	+	+	+	+	+
ST-8	+	+	Çubuk	2-8	6 -10	30-60	+	+	+	-	+	-	+
ST-9	+	+	Çubuk	2-8	7-9	30-60	+	+	+	+	+	+	+
ST-10	+	-	Çubuk	2-6	6-9	45-60	+	+	+	+	-	+	+
ST-11	+	+	Çubuk	2-10	6-9	30-60	-	-	-	-	-	-	-

4.3. İzolatların 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Test izolatlarının konvensiyonel yöntemlerle identifikasyonu gerçekleştirildikten sonra DNA'ları izole edildi ve universal primerler (27F, 1492R) kullanılarak PCR cihazında 16S rRNA bölgesi amplifiye edildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler %1'lik Agarose jelde 110 voltta 90 dak süreyle yürütüldü. Süre sonunda tüm suşların 1500 bç büyüklüğünde tek bant içerdikleri tespit edildi.



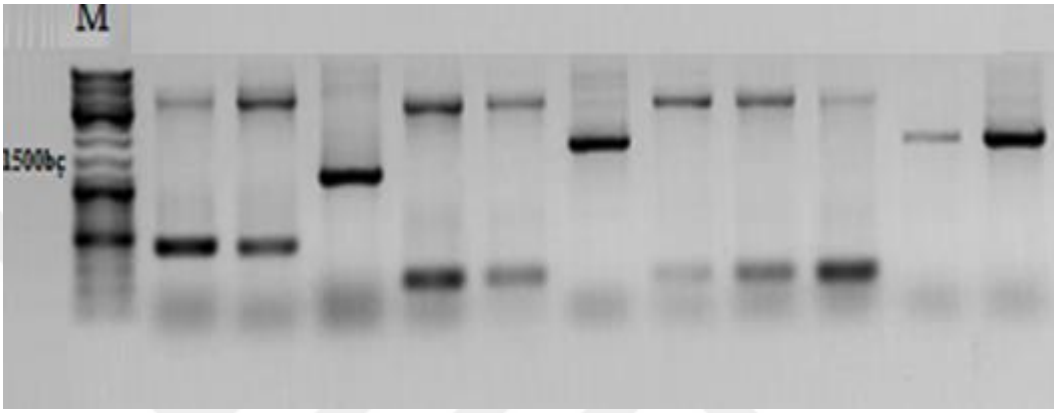
Şekil 4.1. 16S rRNA PCR görüntüsü

Kaplıca suyundan bakteriler izole edildikten sonra DNA ekstraksiyonu yapıldı. Evrensel primerler kullanılarak (27F-1492R), 16S rRNA gen bölgesi çoğaltıldı. %1'lik agaroz jelde yürütülen PCR ürünleri görüntülenerek 1500 bç'de tek bant olduğu belirlendi.

4.4. Amplifiye Edilen 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması

Bakterilerin identifikasyonunda 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması oldukça önemli olduğundan, bu aşamada ligasyon ve transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. Daha sonra, X-Gal ve IPTG içeren petrilere bakteriler yayıldı ve 1 gece inkübasyondan sonra mavi-beyaz kolonilerin oluşumu gözlemlendi. Genin inset olduğunu düşündüğümüz

beyaz koloniler alınarak koloni PCR yöntemiyle doğrulama çalışması yapıldı (Şekil 4.2.). 1500 bç'lik DNA marker hizasında bant veren koloniler antibiyotikli besiyerine aktarılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Plazmit izolasyonunun ardından ürünler sekans analizi için Macrogen'e (Hollanda) gönderildi.



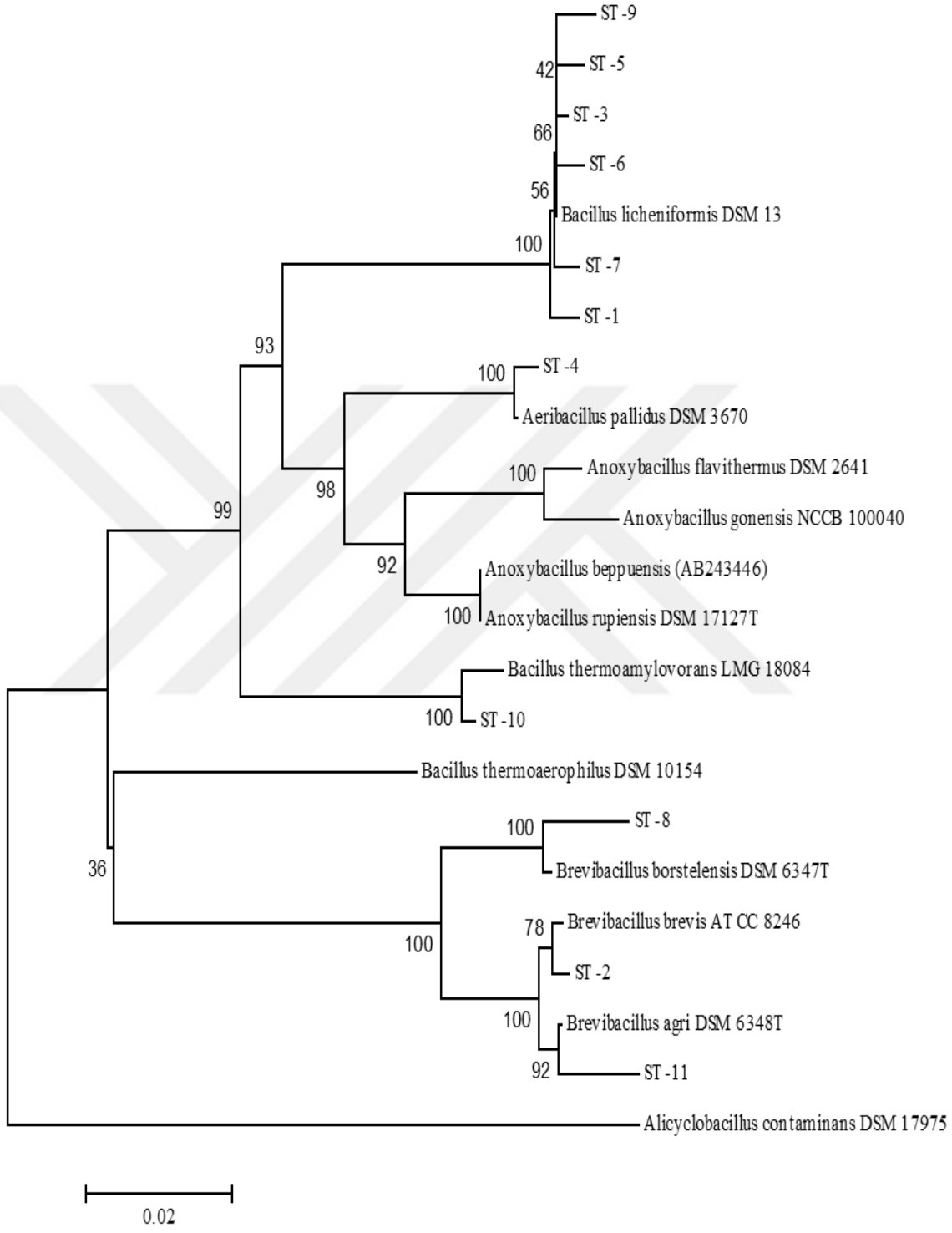
Şekil 4.2. Koloni PCR görüntüsü

4.5. İzolatların 16S rRNA Genlerinin Baz Dizilerine Göre Benzerlik Oranları

Bakterilerin sınıflandırılması için gerekli olan genotipik bilginin ilk adımı olan 16S rRNA dizisinin klonlanması tamamlandıktan sonra, genlerin baz dizileri belirlendi. Belirlenen 16S rRNA gen dizileri, GenBank'ta bulunan diğer bakterilerin 16S rRNA dizileri ile karşılaştırıldı. Analizler sonucunda ST-1, ST-3, ST-5, ST-6, ST-7 ve ST-9 suşlarının *Bacillus licheniformis*'e, ST-2 suşunun *Brevibacillus brevis*'e, ST-4 suşunun *Aeribacillus palidus*'a, ST-8 suşunun *B. borstelensis*'e, ST-10 suşunun *Bacillus thermoamylovorans*'a, ST-11 suşunun ise *Brevibacillus agri*'ye %99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi (Çizelge 4.2). Elde edilen bu veriler EzTaxon programı ile doğrulandıktan sonra sekans dizileri kullanılarak MEGA 4.0 programında filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.3) (Yanmış vd 2015).

Çizelge 4.2. Test suşlarının 16S rRNA benzerlik oranları

İzolat Kodu	**Benzediği Tür**	**GenBank numarası**	**Benzerlik Oranı**	**Baz Uzunluğu**
ST-1	*Bacillus licheniformis*	KX447663	%99	1424 bç
ST-2	*Brevibacillus brevis*	KX447662	%99	1411 bç
ST-3	*Bacillus licheniformis*	KX462970	%99	1425 bç
ST-4	*Aeribacillus pallidus*	KX462971	%99	1426 bç
ST-5	*Bacillus licheniformis*	KX462972	%99	1426 bç
ST-6	*Bacillus licheniformis*	KX462973	%99	1425 bç
ST-7	*Bacillus licheniformis*	KX462974	%99	1425 bç
ST-8	*Brevibacillus borstelensis*		%99	1411 bç
ST-9	*Bacillus licheniformis*		%99	1425 bç
ST-10	*Bacillus thermoamylovorans*		%99	1421 bç
ST-11	*Brevibacillus agri*		%99	1412 bç



Şekil 4.3. Filogenetik ağaç

4.6. Enzim Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Çalışmaları

4.6.1. Lipaz enzim üreten bakterilerin tribütirin agar besiyerinde belirlenmesi

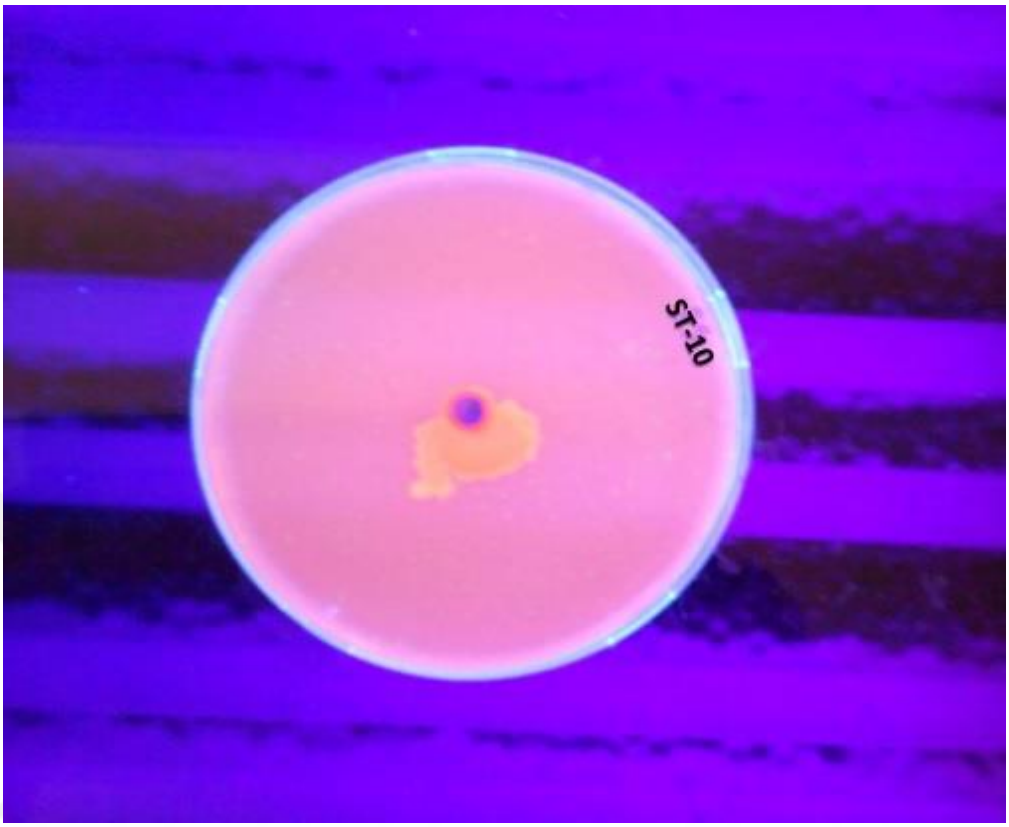
TSB besiyerinde büyütülen 11 izolatın her biri faklı Tribütirin agar besiyerine ekildi ve petrilerde oluşan şeffef zon bakterilerin lipaz üretip üretmediği sonucuna ulaşmamızı sağladı. Elde edilen 11 izolattan 8 tanesinin kolonilerinin etrafında şeffaf bir açıklık gözlenmesine karşın, en büyük zon çapı ST-10 suşunda görüldüğünden, lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu için bu bakteri tercih edildi.



Şekil 4.4. Tribütirin agar petrisindeki ST-10 izolatının lipaz aktivite görüntüsü

4.6.2. Lipaz enzim üreten bakterilerin rhodamine B agar besiyerinde belirlenmesi

TSB besiyerinde büyütülen 11 izolat, ortası delinmiş Rhodamine B agar besiyeri petrilerine inoküle edildi. UV ışık altında sarı-turuncu bir hat oluşturan 10 bakteriden en geniş zonu veren ST-10 suşu seçilerek çalışmaya devam edildi.



Şekil 4.5. Rhodamine B agar petrisindeki ST-10 suşunun lipaz aktivite görüntüsü

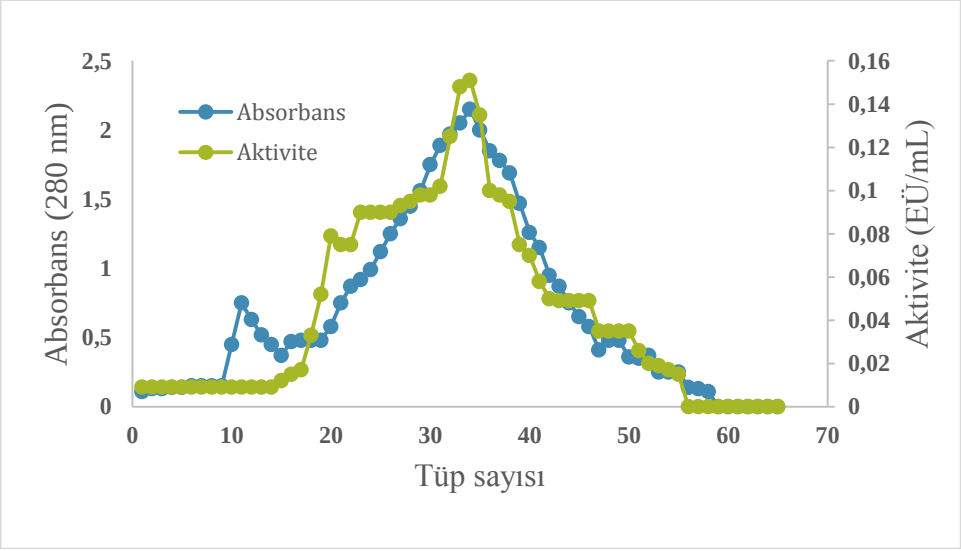
4.6.3. İntraselüler lipazin eldesi

LB besi ortamında 55°C'de 1 gece inkübe edilen *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 straini soğutmalı santrifüjde +4°C 6.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Bakteriler çöktürüldükten sonra 50 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8,0) süspanse edilerek, sonikatörde 8 dakika boyunca parçalandı. Parçalama işleminden sonra elde edilen homojenat soğutmalı santrifüjde 13.000 rpm'de 40 dak boyunca santrifüj edildi. Elde edilen ham enzim kaynağının protein içeriği 6,2 mg/mL ve spesifik aktivitesi ise 0,039 U/mg protein olarak bulundu (Çizelge 4.3).

4.6.4. Saflaştırma aşamaları

4.6.4.a. Q-Sepharose iyon değişim kromatografisi

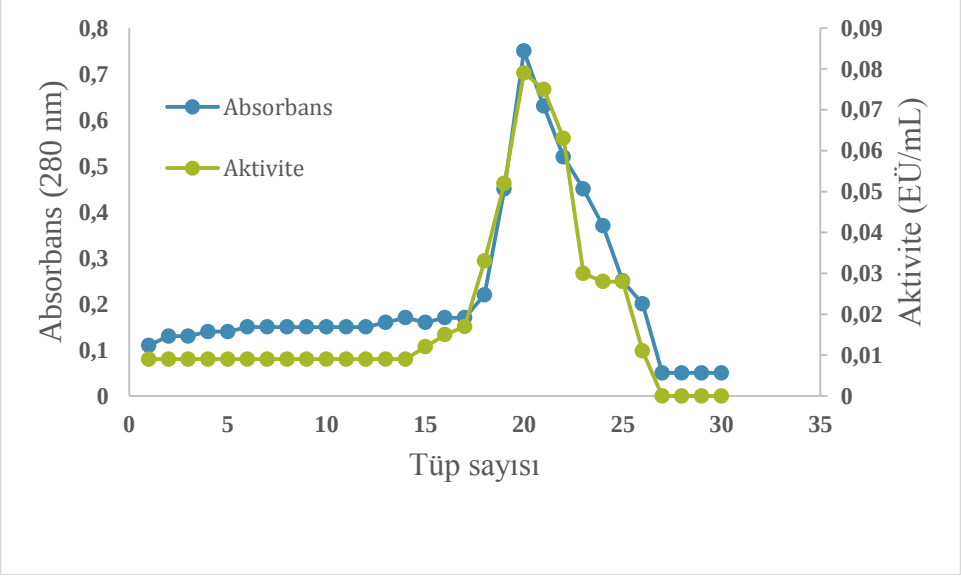
Sonikatör işlemi sonucu yapılan santrifüjün ardından lipaz içeren homojenat, 20 mM Tris-HCI (pH 7,5) tamponun ile dengeye getirilmiş olan Q-Sepharose (3,0x50 cm) kolonuna tatbik edildi. Akış hızı 12 mL/saat olacak şekilde ayarlandı. 0,25-2,5 mM NaCl içeren Tris-HCl tamponuyla (pH 7,5) artan tuz gradiyenti oluşturularak yıkandı. Ayrılan fraksiyonlar 2 mL'lik elüsyonlar halinde toplandı. Her bir eIüatın 405 nm'de aktivitesine bakılarak aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri daha sonraki işlemlerde kullanıldı. Konsantre edilen enzim çözeltisinde aktivite ve protein tayini yapılarak protein miktarı 2,15 mg/mL ve özgül aktivitesi ise 0,070 U/mg olarak hesaplandı (Çizelge 4.3).



Şekil 4.6. Q- Sepharose kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve aktivite değerleri

4.6.4.b. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

Dengeye getirilmiş kolonun akış hızı peristaltik pompayla 3 mL/saat'e ayarlandı. Dengeye getirilmiş olan Sefadeks G-100 kolonuna, Q-Sepharose kolonunda aktivite gösteren fraksiyonların birleştirilmesiyle elde edilen 4 mL'lik enzim çözeltisi yüklendi. Kolondan protein çıkışı sona erene kadar denge tamponu olan pH 7,5 50 mM Tris-HCI tamponu geçirilerek proteinler elüe edildi. Elüatlar 1'er mL şeklinde ayrı ayrı tüplere toplandı. 280 nm dalga boyunda elüatlara ölçüm yapıldı Protein yoğunluğunun yüksek olduğu bazı fraksiyonlarda aktivitenin de yüksek olduğu gözlendi. Protein olan fraksiyonların diğer kısmımda aktivitenin olmaması saflaştırma için lipaz dışındaki proteinlerin bir kısmının uzaklaştırıldığını göstermektedir (Şekil 4.7). Lipaz aktivitesinin yüksek olduğu elüatlarda protein elektroforezi yapıldı. Enzim çözeltisindeki protein miktarı 6,2 mg/mL ve özgün aktivitesi ise 0,039 U/mg protein olarak hesaplandı (Çizelge 4.3). Elde edilen çözelti daha sonra tekrardan aynı kolona yüklendi ve aynı işlemler tekrar edildi.



Şekil 4.7. Sephadex G-100 kolonu sonrası toplanan fraksiyonların protein içeriği ve aktivite değerleri

Saflaştırma aşamalarında ham enzim özütünün ve uygulanan kromatografik yöntemlerde elde edilen tüm elüatların, protein miktarları Bradford yöntemiyle belirlenip özgül aktiviteleri hesaplandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10'dan saflaştırılan lipaz enzimine ait saflaştırma tablosu

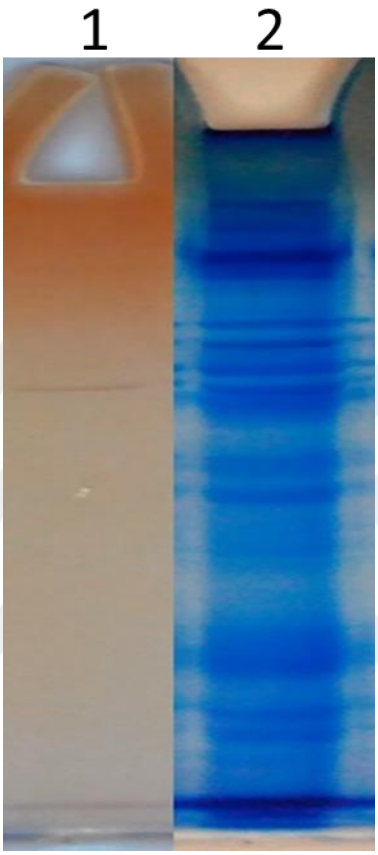
Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Yüzde Verim (%)
Ham Enzim Özütü	25	6,2	155	0,240	6	0,039	1	100
Q-Sepharose	20	2,15	43	0,151	3,02	0,070	1,79	50,33
Sephadex G-100 1.yükleme	4	0,75	3	0,079	0,316	0,105	2,69	5,27
Sephadex G-100 2.yükleme	3	0,09	0,27	0,026	0,078	0,289	7,41	1,3

4.6.4.c. Doğal poliakrilamid jel elektroforezi (Doğal PAGE)

SDS katılmadan hazırlanan Doğal PAGE için %5'lik yığma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanıldı.

%10'luk PAGE hazırlandıktan sonra, jel 30 dakika boyunca 60°C'de Fast Red substrat boyama çözelti karışımında bekletildi. Oluşan kırmızı-kahverengi bantlar lipaz ve esterazın varlığını göstermektedir (Şekil 4.8).

Fast Red boyamasının ardından elektroforetik jel, doğrudan Coommassie Blue R 250 çözeltisi ile boyanarak, protein karışımındaki tüm proteinlere ait bantlar gözlemlendi.

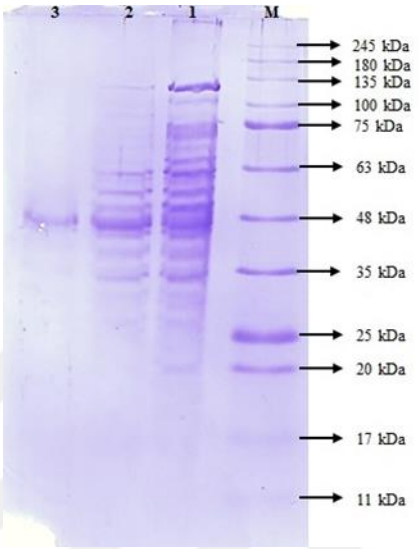


Şekil 4.8. Doğal PAGE elektroforezi
1: Substrat Boyaması **2:** Coommassie Blue R 250 çözeltisi ile boyama

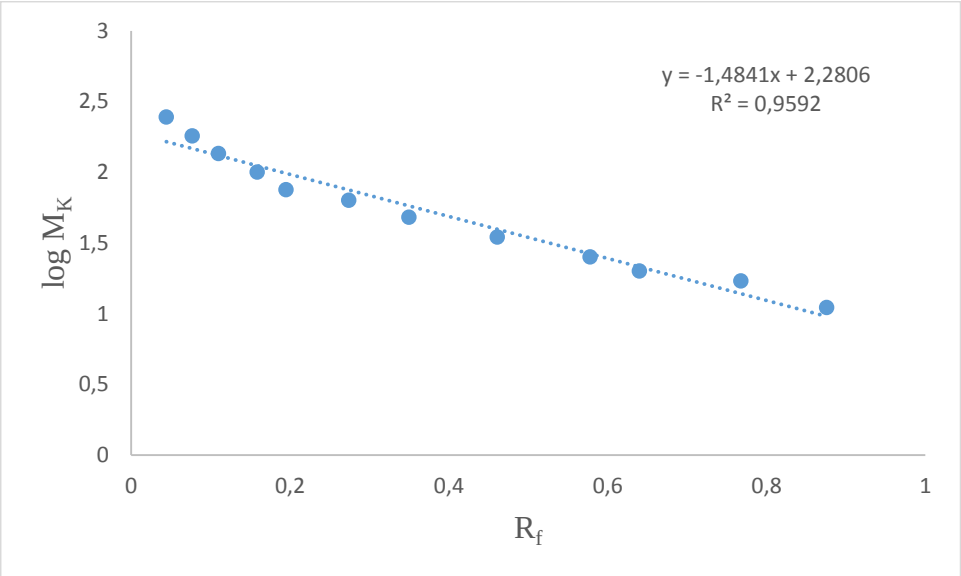
4.6.4.d. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 SDS-PAGE (sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) Laemmli metoduna göre yapılarak, enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Saflaştırma aşamalarından alınan her bir örnek, ayrı ayrı kuyulara tatbik edildi. Numuneler yürütüldükten sonra jel, sabitleme çözeltisine konuldu. Sabitleme çözeltisinde 30 dakika boyunca yıkanan jel, çıkarılarak boyama çözeltisine bırakıldı ve 6 saat çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra jel yıkama çözeltisiyle 2 saat yıkandı. Protein bantları belirginleşen jel, görüntüleme cihazına konularak fotoğrafı

çekildi. Kullanılan standartlar referans alınarak molekül ağırlığı yaklaşık 45.87 kDa olarak belirlendi. Kuyucuklardaki bantlara bakıldığında ise saflaştırılmanın tam olarak gerçekleştiği gözlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. SDS-PAGE elektroforezi
M: Marker; **1:** Ham enzim özütü. **2.** Q-Sepharose kolon sonrası **3.** Jel filtrasyon sonrası

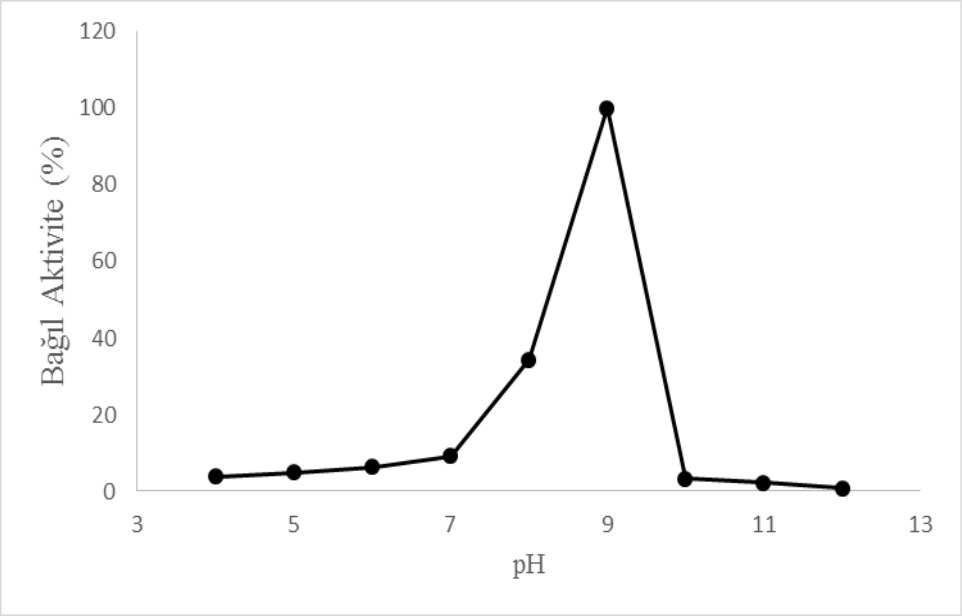


Şekil 4.10. Lipaz enziminin molekül kütle grafiği

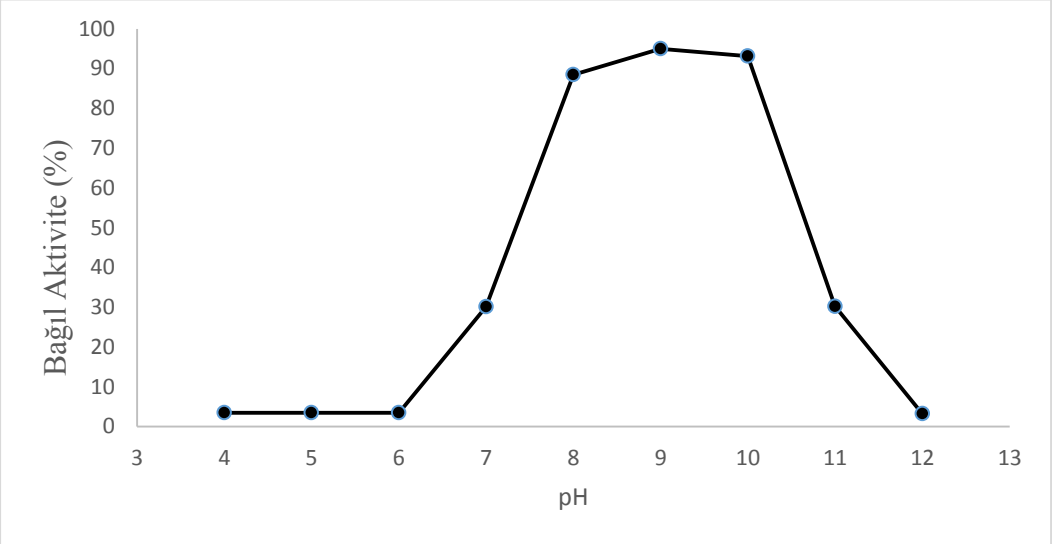
4.6.4.e. Enzimin biyokimyasal karakterizasyonu

1. Bacillus thermoamylovorans ST-10 lipaz enzimi için optimum pH ve stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar

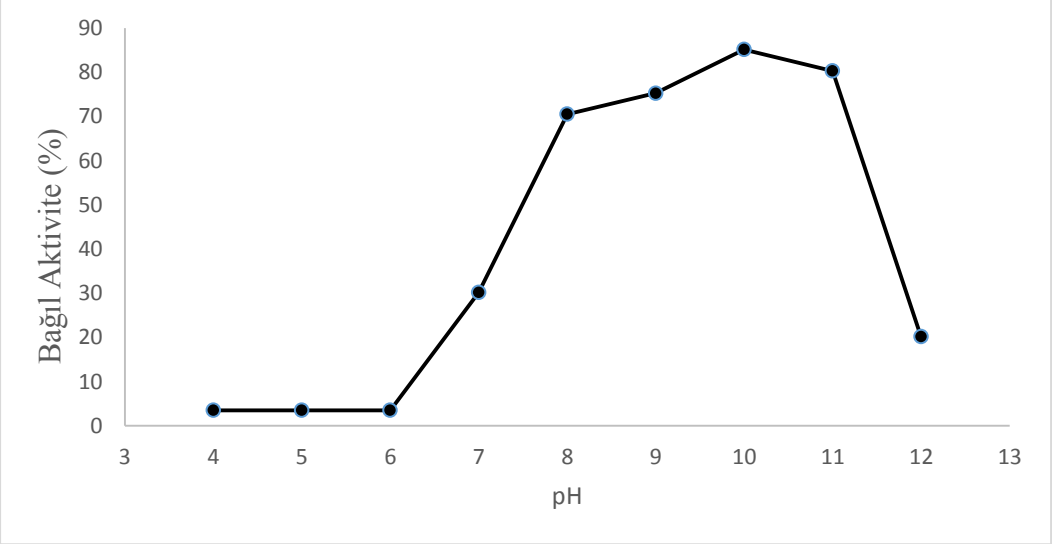
Bacillus thermoamylovorans ST-10 izolatından elde edilen lipaz enziminin optimum pH değeri, farklı pH (4-12)'larda hazırlanan tampon çözeltilerle ve substrat olarak *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil decanoate, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat kullanılarak belirlendi. Optimum pH değerleri; *p*-nitrofenil asetat için 9, *p*-nitrofenil oktaonat için 8-10 arası, *p*-nitrofenil laurat için 9-11 arası ve *p*-nitrofenil decanoate için ise 9-11 arası olarak belirlendi. (Şekil 4.11-4.14). pH 11'den sonra ise substratların kendiliğinden hidroliz olduğu gözlendi.



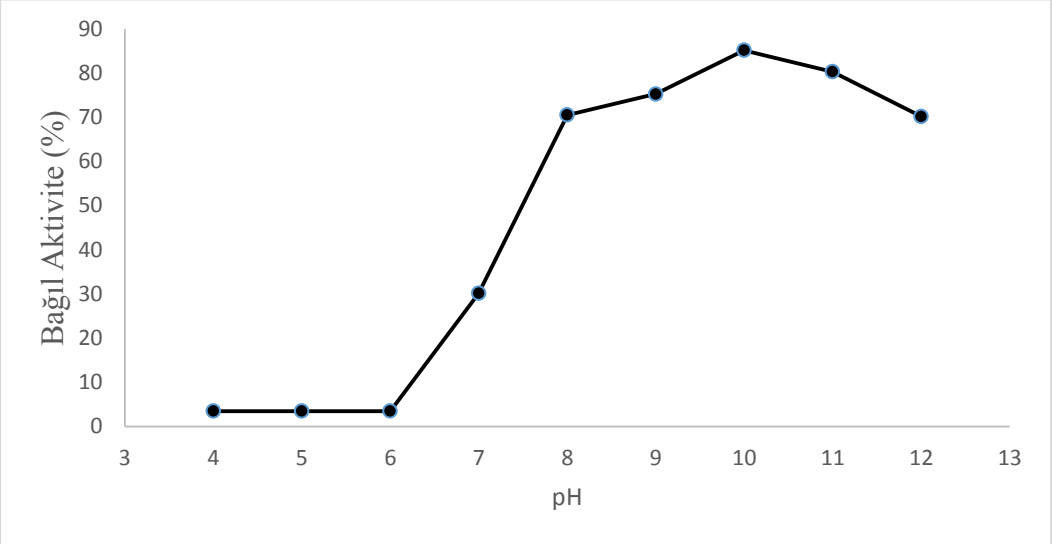
Şekil 4.11. p-nitrofenil asetat substratı varlığında, enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



Şekil 4.12. p-nitrofenil oktaonat substratı varlığında, enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

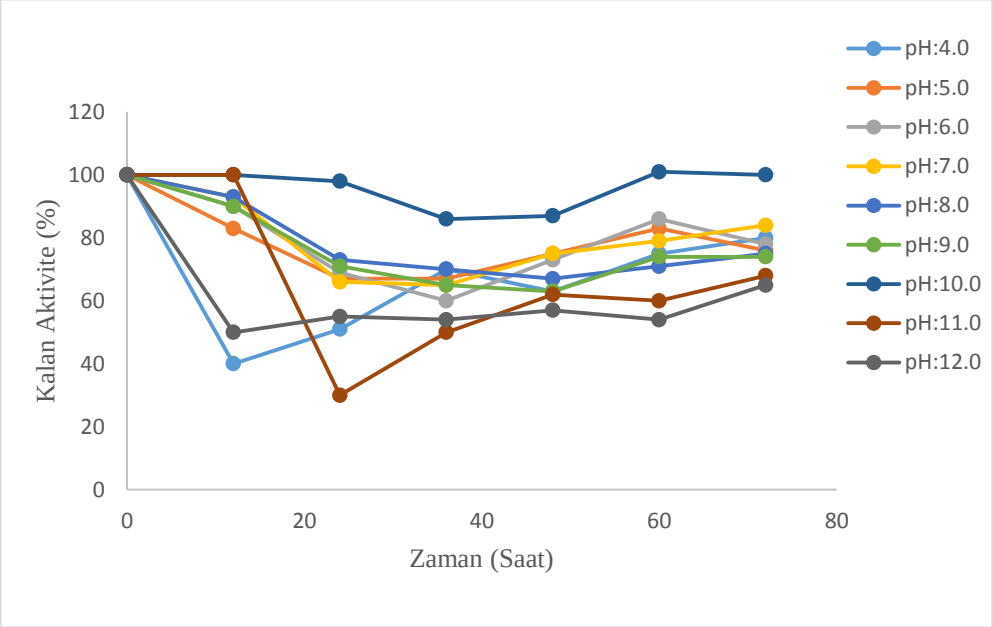


Şekil 4.13. p-nitrofenil laurat substratı varlığında, enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



Şekil 4.14. p-nitrofenil decanoate substratı varlığında, enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

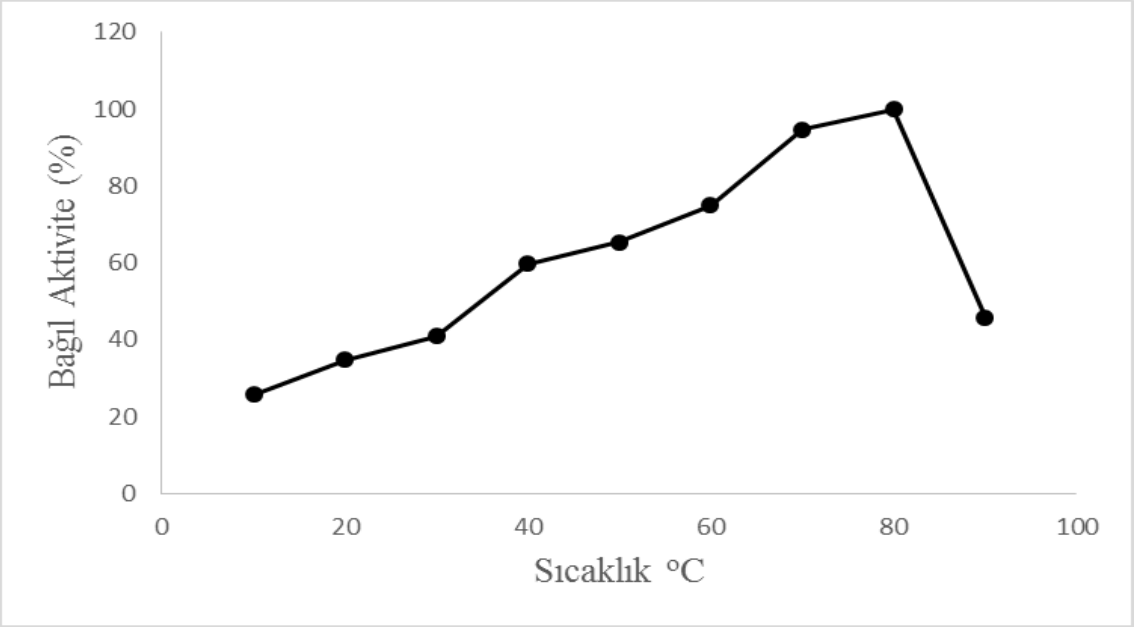
Enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla; 50 mM konsantrasyonda pH 4-12 arasında, enzim ve tampon karışımları +4°C'de 6 gün boyunca inkübe edildi. *p*-nitrofenil asetat substratı varlığında 12 saat aralıklarla optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. *B. thermoamylovorans* ST-10 lipazının, geniş bir pH aralığında yüksek kararlılık gösterdiği belirlendi (Şekil 4.15.). 12. saat sonunda pH 4,0 ve 12,0'de enzimin başlangıçtaki aktivitesinin %60'ını kaybettiği, diğer bütün pH değerlerinde ise neredeyse aktivitenin tamamının korunduğu tespit edildi. 48. saatin sonunda pH 8,0'de enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %90'ını, diğer bütün pH değerlerinde ise yaklaşık %60'ını korunduğu bulundu. 6. günün sonunda aktivitenin yüksek oranda korunduğu gözlemlendi.



Şekil 4.15. B. thermoamylovorans ST-10 lipazının +4°C'de ki pH kararlılığının zamana göre değişimi grafiği

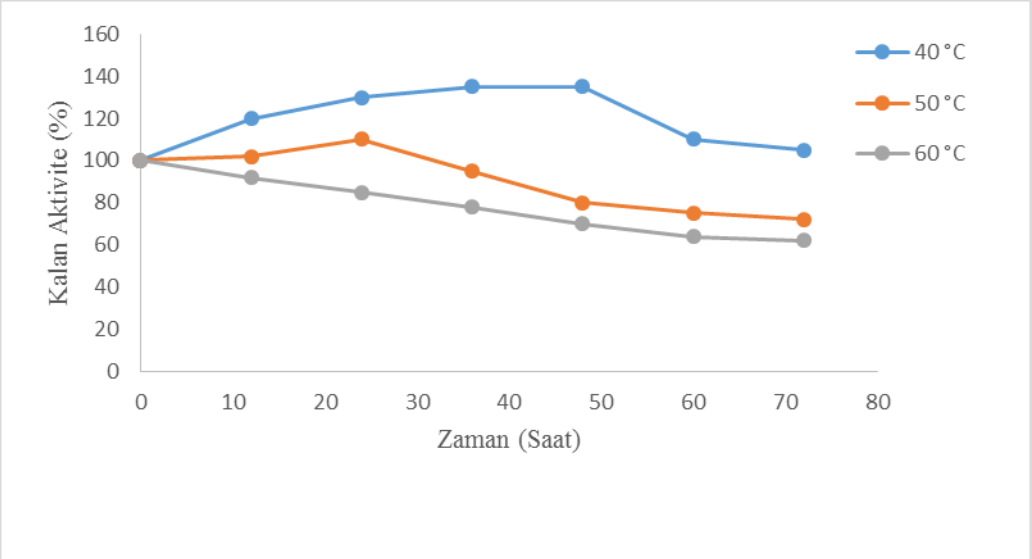
2. Bacillus thermoamylovorans ST-10 lipaz enzimi için optimum sıcaklığın ve stabil sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 10°C'lik artışlarla 10-90°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. Tampon ve substrat çözeltisi karışımları, belirlenen optimum pH ve sıcaklık aralıklarında p-nitrofenil asetat substratı kullanılarak, elde edilen veriler grafiğe aktarıldı ve optimum sıcaklık değeri belirlendi. Optimum sıcaklık 80°C olarak belirlendi (Şekil 4.16). *p*-nitrofenil asetat substratı için 50 ve 60°C'de aktivitenin yaklaşık %70'i, 40°C'de yaklaşık %60'ı, 70°C'de ise %95'inin korunduğu gözlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. p-nitrofenil asetat substratı varlığında lipaz enzimi optimum sıcaklık ölçülmesi için çizilen sıcaklık-bağıl aktivite grafiği

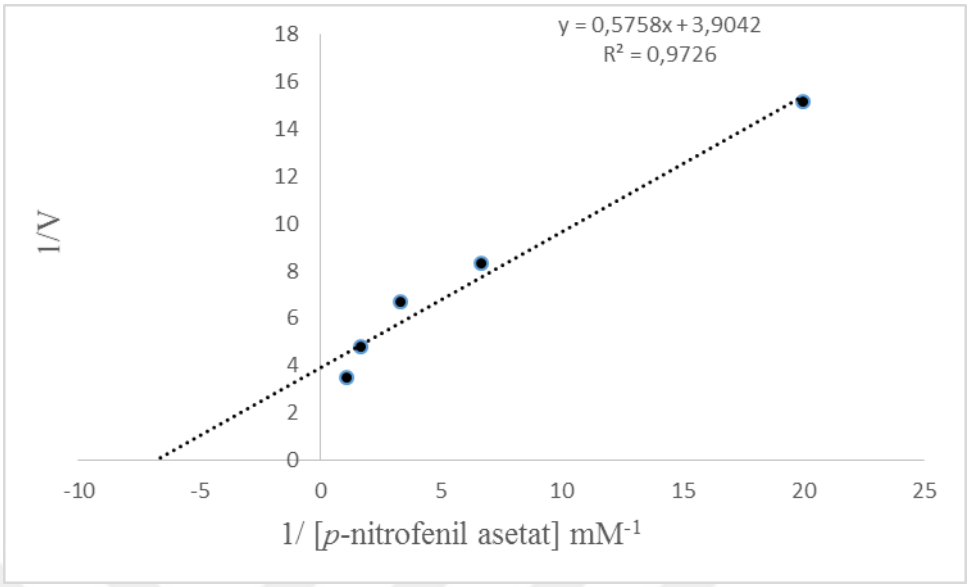
Enzimin stabil sıcaklığı incelemek amacıyla enzim; 40, 50 ve 60°C sıcaklıklarda (enzimin aktivitesine bağlı olarak), 12'şer saat aralıklar ile 72 saat boyunca inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda optimum şartlar altında aktivite tayini yapıldı. *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 lipazının kalan yüzde aktivitesi inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı. Enzimin 60 ve 50°C'lerde 72 saat sonunda aktivitesinin yaklaşık %20'sini, 40°C'de yaklaşık %10'unu, 60°C'de 48 saat sonunda, aktivitesinin yaklaşık %30'unu kaybettiği gözlemlendi (Şekil 4.17).



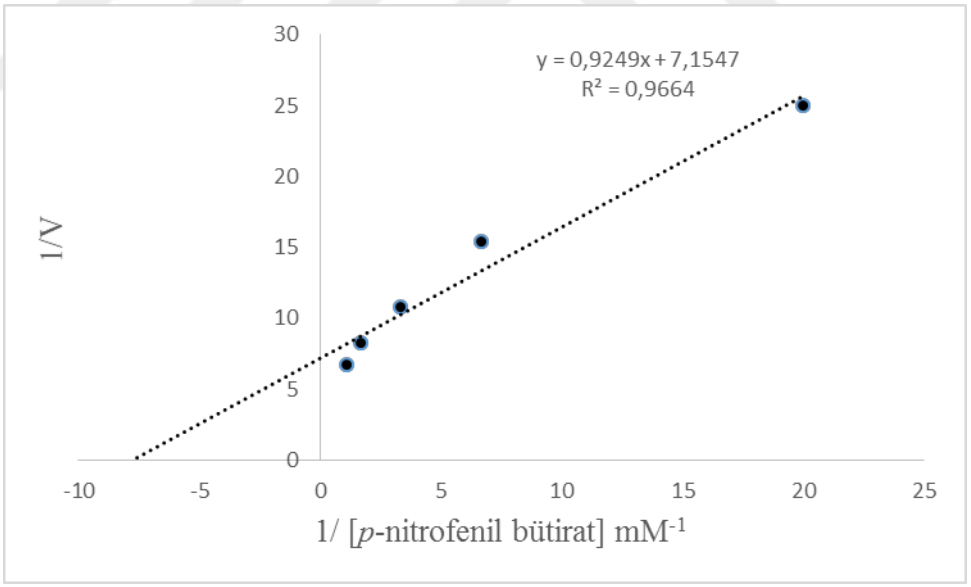
Şekil 4.17. B. thermoamylovorans ST-10 lipazının 40, 50 ve 60°C'de ki ısıl kararlılığının zamana göre değişimi grafiği

3. Lipaz enzimi substratları için KM ve Vmax değerlerinin bulunmasına yönelik sonuçlar

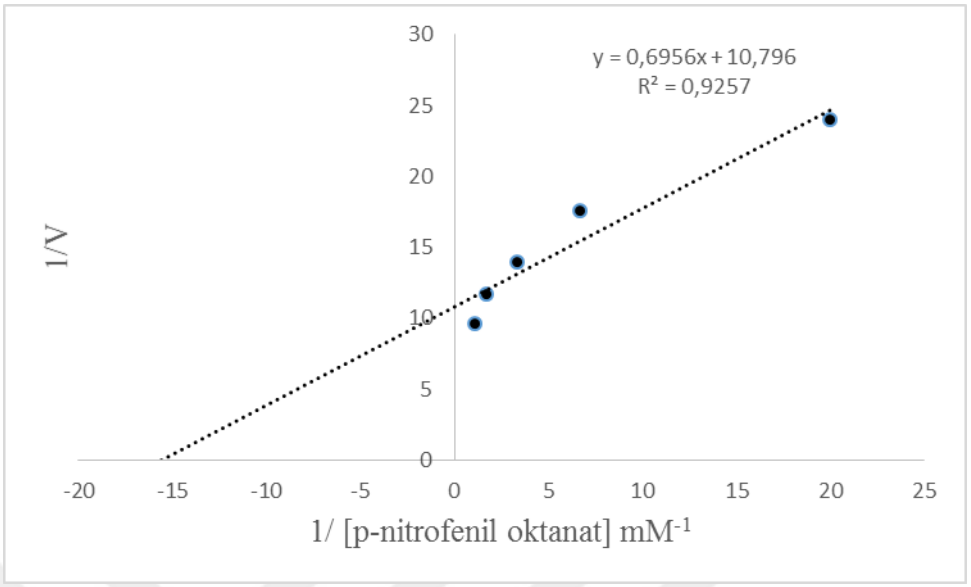
Lipaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak, optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Substrat olarak *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat kulanıldı. Enzimin K_M değerleri sırasıyla; 0,147 mM, 0,129 mM, 0,064 mM ve 0,055 mM, V_{max} değerleri ise sırasıyla; 0,256 U/mL, 0,140 U/mL, 0,093 U/mL ve 0,0356 U/mL olarak hesaplandı. (Şekil 4.18- 4.21).



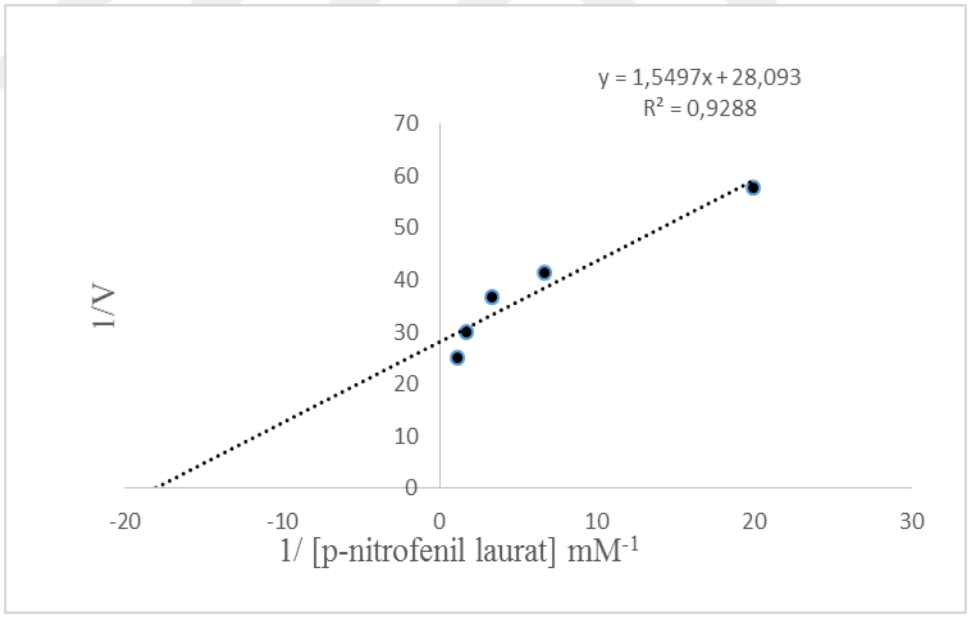
Şekil 4.18. Lipaz enzimi için p-nitrofenil asetat substratı varlığında Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. Lipaz enzimi için p-nitrofenil bütirat substratı varlığında Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.20. Lipaz enzimi için *p*-nitrofenil oktanat substratı varlığında Lineweaver-Burk grafiği



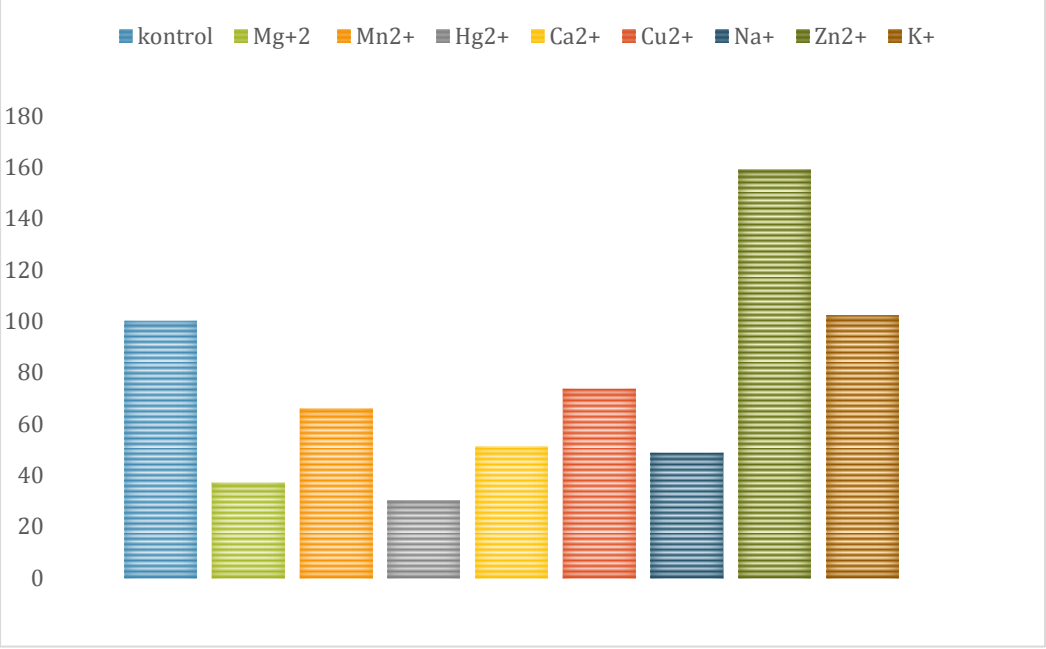
Şekil 4.21. Lipaz enzimi için p-nitrofenil laurat substratı varlığında Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.4. Lipaz enzimi için K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	**K_M (mM)**	**V_{max} (U/mL)**
p-nitrofenil asetat	0,147	0,256
p-nitrofenil bütirat	0,129	0,14
p-nitrofenil oktaonat	0,064	0,093
p-nitrofenil laurat	0,055	0,0356

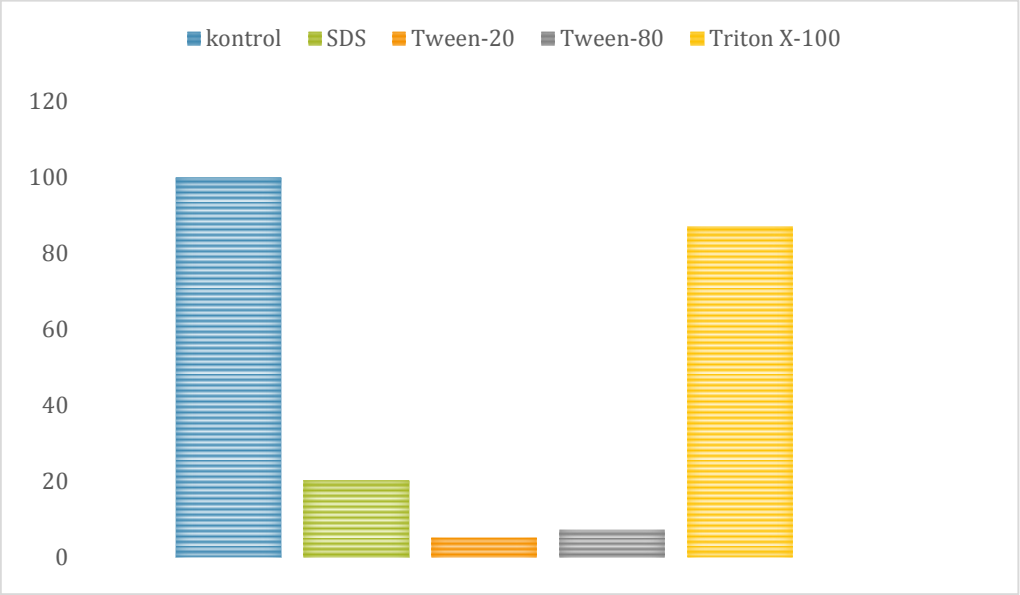
4. Bazı kimyasallar, deterjanlar ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemeye yönelik sonuçlar

B. thermoamylovorans ST-10 lipazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Hg^{2+}, Na^{+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} ve Cu^{2+} iyonlarının 5 mM'lık konsantrasyonları çalışıldı. İçlerinde Zn^{2+} enzim aktivitesini artırırken, K^{+} değişikliğe neden olmadı, diğer iyonların ise düşürdüğü tespit edildi. Ca^{2+} iyonunun %49, Hg^{2+}'nin %70, Mg^{2+}'un ise %73 oranında inhibe ettiği belirlendi (Şekil 4.22).



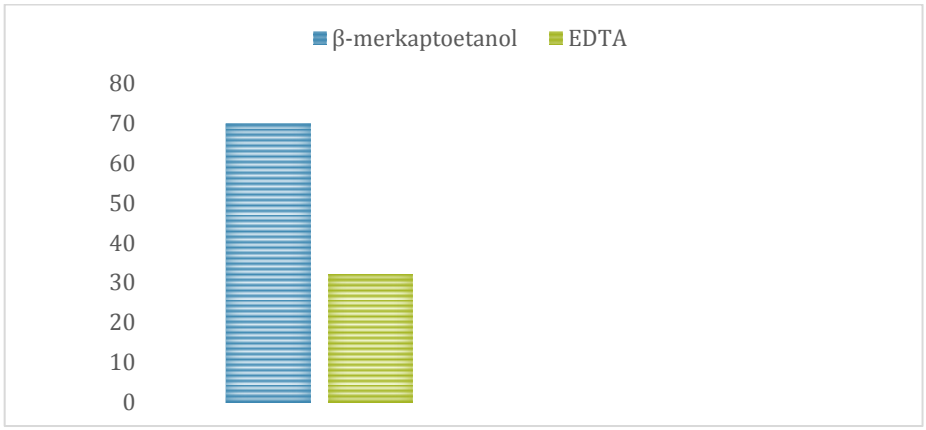
Şekil 4.22. Bazı metal iyonlarının B. thermoamylovorans ST-10 aktivitesi üzerine etkisi

Bazı yüzey aktif maddelerin, *B. thermoamylovorans* ST-10 izolatının lipaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; yüzey aktif madde olarak da; Triton X-100, Tween-80, Tween-20 ve SDS kullanıldı. Elde edilen sonuçlar kimyasal ve deterjan içermeyen reaksiyon karışımın aktivitesi ile kıyaslanarak %bağıl aktivite hesabı yapıldı (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Bazı deterjanlar B. thermoamylovorans ST-10 lipazinin aktivitesi üzerine etkisi

İnhibitör etkisi olan maddelerin, *B. thermoamylovorans* ST-10 izolatının lipaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; tiyol grubu inhibitörü olan β –merkaptoetanol ve metalloproteaz inhibitörü olan EDTA kullnıldı. β–merkaptoetanol'ün kısmen, EDTA'nın ise enzim aktivitesini ciddi oranda düşürdüğü belirlendi. Elde edilen sonuçlar kimyasal ve deterjan içermeyen reaksiyon karışımın aktivitesi ile kıyaslanarak % bağıl aktivite hesabı yapıldı. Optimum şartlar altında aktiviteleri belirlendi ve sonuçta bu kimyasalların tamamının enzim aktivitesini genel olarak azalttığı gözlemlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Bazı kimyasallarin B. thermoamylovorans ST-10 lipazinin aktivitesi üzerine etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaşadığımız biyosferin önemli bir kısmını oluşturan mikroorganizmaların büyük bir bölümü henüz keşfedilmediğinden, yeni tür ve izolatların bilim dünyasına kazandırılmasını hedefleyen çalışmalarda ciddi bir ivmelenme söz konusudur. Jeolojik yapısından dolayı yüzlerce termal kaynağa sahip olan ülkemizde, bu kaynaklardan yeni izolatların tanısı ve biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirliğinin tespine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle bilim insanlarını bu organizmaların karakterizasyonuna yönelten temel sebeplerden biri, ürettikleri termostabil enzimlerin endüstride yaygın kullanım alanına sahip olmasıdır (Akhmaloka *et al.* 2006; Baltacı vd 2016). Günümüzde termofilik mikroorganizmaların taksonomisi, filogenisi, önemli endüstriyel enzimlerinin saflaştırılması ve uygulama alanlarının tespitine yönelik çalışmalarda ciddi bir artış olmuştur. Bakterilerin identifikasyonunda tek başına konvensiyonel testlerin yeterli olmamasından dolayı, evrensel olarak korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesi başta olmak üzere pek çok gen, tanılamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Baltacı vd 2016).

Bu bilgiler ışığında yapılan bu tez çalışmasında; Erzurum ili-Ilıca ilçe kaplıcasından alınan su örnekleri, mümkün olan en kısa zamanda laboratuvar ortamına getirilerek, besiyeri ortamına aktarıldı ve toplam 11 bakteri straini saf olarak elde edildi. Bu bakterilerin DNA izolasyonları yapıldıktan sonra, 16S rRNA gen bölgeleri PCR yardımı ile çoğaltıldı. Daha sonra bu gen bölgesi, pGEMT-Easy vektör sistemine aktarıldı ve sekans bilgileri GenBank'ta bulunan verilerle karşılaştırılarak tür düzeyinde ki teşhisleri gerçekleştirildi. Elde edilen bu 11 izolattan 6'sının farklı türlere ait olduğu belirlendi. Benzer morfolojik ve biyokimyasal özellikler gösteren ST-1, ST-3, ST-5, ST-6, ST-7 ve ST-9 izolatlarının %99 oranında *Bacillus licheniformis*'e, ST-10 izolatının aynı oranda *Bacillus thermoamylovorans*'a, ST-2, ST-8 ve ST-11'in ise sırasıyla *Brevibacillus brevis, B. borstelensis* ve *B. agri*'ye, ST-4 straininin ise *Aeribacillus pallidus*'a benzerlik gösterdiği tespit edildi. Adiguzel vd 2009 ve Yanmiş vd 2015'de yaptıkları çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak, birbiriyle morfolojik ve biyokimyasal

özellikleri açısından benzerlik gösteren bakteriyal suşların, moleküler identifikasyon sonuçlarının da aynı olduğunu ifade etmişlerdir.

Acar, 2009 yılında, Van iline bağlı Erciş ilçe kaplıca sularını kullanarak yapmış olduğu çalışmada, 5 farklı suş tanılamıştır. Yaptığı bu çalışma sonucunda; *B. licheniformis, Brevibacillus brevis, Geobacillus pallidus, Brevibacillus borstelensis* ve *Bacillus pumilus* türlerini belirlerken, Haghighat ve arkadaşları ise 2008 yılında yaptıkları çalışmada benzer bir şekilde baskın tür olarak *B. licheniformis* ve *B. subtilis*'i tespit etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada da literatür verilerine paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda, endüstriyel olarak oldukça önemli olan lipazı üretebilme potansiyeline sahip tür veya türleri tespit etmek için iki farklı besiyeri kullanıldı. İlk olarak tribütirin agar besiyerine ekilen izolatlardan şeffaf zon verenler pozitif olarak değerlendirilirken, elde edilen verileri doğrulamak için Rhodamine B'li ikinci bir besiyeri hazırlandı. Bu besiyerine, izolatların tamamı inoküle edildi ve inkübasyon sonunda büyüyen bakterilerin zon oluşumu UV ışık altında incelendi. Sarı-turuncu zon veren 10 suş pozitif olarak değerlendirilirken, aynı bakterilerden sadece 9 tanesi Tribütirin agar besiyerinde pozitif sonuç verdi.

Faiz (2005) yaptığı çalışmada, Tribütirin agar besiyeri kullanarak *Anoxybacillus gonensis* ve *A. kestanbolensis* suşlarının lipaz/esteraz üretme kabiliyetlerini araştırmış ve bu besiyerinin lipaz/esteraz ön enzim ativitesinin tespitinde bizim verilerimize paralel olarak bu besiyerinin başarılı olduğunu ifade etmiştir. Petride oluşan berrak bölgelerin bu suşların tribütirini kullanabildiği ve hidrolizleyebileceğinin göstergesi olduğunu ifade etmiştir.

Çalışmamızın sonraki aşamasında ise; *B. thermoamylovorans* ST-10 suşundan, lipaz enzimini saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Deneyler sırasında farklı teknikler kullanılarak, aktivite kaybının önüne geçilmesi ve maksimum verim-saflıkta enzim eldesi amaçlandı. Petri denemeleri sonucu lipaz enzimini ürettiği tespit edilen *B.*

thermoamylovorans ST-10 suşu, LB besiyerinde büyütüldü. Sonikatörde parçalanarak elde edilen 30 ml ham enzim kaynağı satrifüjlenerek sırasıyla; iyon değişim kromatografisi olarak Q-Sepharose, jel filtrasyon kromatografisi olarak ise iki kez ardarda Sephadex G-100 kolonuna tatbik edilerek, enzim %1,3 verim ile 7,41 kat saflaştırıldı. Ham enzim kaynağında enzimin spesifik aktivitesi; 0,039 U/mg protein, iyon değişim kolonu Q-Sepharose sonrası 0,070 U/mg protein, jel filtrasyon kolonları Sepadex G-100 sonrası 0,105 U/mg protein, 2. Sephadex G-100 sonrası 0,289 U/mg protein olarak bulundu. Lipazın saflaştırılmasında Q-Sepharose (Nawani *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2008), Amberlite IRA-410 (Cl- formu) (Chakraborty and Raj 2008), Mono Q HR (Chang 1998) gibi pek çok kuvvetli anyon değiştirme kromatografisi, ayrıca CM-sefaroz (Liming 2005) ve CM-selüloz (Vujaklija *et al.* 2003) gibi katyonik iyon değiştirme kromatografilerinin kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Cai *et al.* (2009) ise, *Geotrichum* sp. mantarından lipaz enzimini, DEAE-selüloz ve jel filtrasyon kromatografileriyle %20,4 verim ile saflaştırmıştır. Joseph (2006), *Bacillus sphaericus* MTCC 7526'dan ürettiği lipaz enzimini, DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisi yöntemi sayesinde %4,7 verimle, 17,74 kat saflaştırmıştır. Başka bir çalışmada ise *Geobacillus stearothermophilus*'un lipaz enzimi, iyon değişim (Q-sepharose), jel filtrasyon (Sephadex G-100), hidroksil apatit kromatografileri ile saflaştırılmış ve spesifik aktiviteleri sırasıyla; 157,03 U/mg, 340 U/mg ve 579,22 U/mg olarak bulunmuştur (Sifour 2010). Balan (2012), *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra suşunun lipazını ise ultrafiltrasyon, Heparin-afinite ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanarak %9 verimle 34 kat saflaştırmıştır. Test izolatından saflaştırdığımız enzim veriminin yukarıda belirttiğimiz literatür verilerine göre daha düşük olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda uygulanan kromotografik işlemlerin ardından elde edilen enzim elüatı, elektroforetik olarak analiz edildi. %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezi hazırlandıktan sonra, enzim elüatı kuyulara tatbik edildi ve α-naftil asetat-Fast Red substrat boyaması sonrasında, lipaz/esteraz varlığı incelendi. Daha sonra Commassie Brillant Blue R-250 boyanması ile jel boyanarak, mevcut bantlar görünür hale getirildi. Doğal PAGE işleminin ardından, SDS poliakrilamid jel elektroforezi hazırlandı ve başta

markır olmak üzere sırasıyla homojenat, Q-Sepharose ve Sefadeks G-100 kolonlarından alınan elüatlar yüklendi. Jelin boyanıp yıkanması işlemlerinden sonra, jel filtrasyon kolonu örneğinin yüklendiği kuyuda tek bant gözlemlendi, bu da bize enzimi saf olarak elde ettiğimizi göstremektedir. Lipaz enzimin molekül ağırlığı, 11 ile 92 kDa arasında değişmekte olup, genellikle tek polipeptit zincirinden oluşur (Lawson 1994, Schmid and Verger 1998). Molekül kütlesi 92 kDa olan lipaz enzimi, *Pseudomonas gessardii* bakterisinden (Ramani *et al.* 2010), 11 kDa olan lipaz ise *Mortieralla alliacea*'den (Jermsuntiea 2011) saflaştırılmıştır. Çalışmamızda SDS-PAGE sonrası çizilen grafik ile, *B. thermoamylovorans* ST-10 suşundan saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesi yaklaşık 45,87 kDa olarak belirlendi. *Aeromonas caviae* AU04 suşundan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı; 39 kDa (Velu 2012), *Bacillus stearothermophilus* P1 ve *Geobacillus* sp. SBS-4S'dan saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı; 43 kDa (Sinchaikul 2001; Dheeman *et al.* 2011), *Thermomyces lanuginosus* ve *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304'dan saflaştırılan lipaz enziminin molekül ağırlığı; 33 kDa (Dheeman *et al.* 2011; Zheng *et al.* 2011) *Aspergillus carneus*'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 27 kDa (Saxena *et al.* 2003), *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 ve *Rhizopus oryzae* suşlarından saflaştırılan lipazın molekül kütlesi 32 kDa (Hiol *et al.* 2000; Cao *et al.* 2012), *Bacillus megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesi yaklaşık 45 kDa (Tekiner 2011), *Bacillus thermocatenulatus* lipazının molekül kütlesi yaklaşık 45 kDa (Kumar and Nussinov 2001), *Bacillus coagulans* BTS-3'dan saflaştırılan lipaz enziminin molekül ağırlığı 31 kDa *Mucor* sp. ve *Pseudomonas luteola*'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 42 kDa (Litthauer *et al.* 2002; Abbas 2004), *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773), *Staphylococcus* sp. ve *Yarrowia lipolytica*'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 38 kDa (Daoud *et al.* 2013) olarak belirlenmiştir. Bu veriler bizim sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.

Bakteriyal lipazların birkaçı dışında genellikle nötral veya alkali pH değerlerinde optimum aktivite gösterdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Gupta 1998). Bu çalışmada *B. thermoamylovorans* ST-10 suşundan saflaştırılan lipaz için aktivitenin pH'ya olan bağlılığı pH 4,0-12,0 aralığında *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil decanoate, *p*-nitrofenil oktaonat ve *p*-nitrofenil laurat substratları kullanılarak yapılan aktivite

tayiniyle incelendi ve inceleme sonucunda enzimin en iyi aktiviteyi *p*-nitrofenil asetat için pH 9,0'da, *p*-nitrofenil decanoate için pH 10,0, *p*-nitrofenil oktaonat için pH 9,0 ve *p*-nitrofenil laurat için ise pH 10,0'da gösterdiği gözlemlendi. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren bu grafiklere göre enzimin asidik pH'larda çok düşük aktivite gösterdiği ve hafif alkali pH'larda *p*-nitrofenil substratlarını hidroliz etme yeteneğinin daha yüksek olduğu tespit edildi. Bununla birlikte literatürde yapılan incelemelere göre *Bacillus cereus* C71'dan saflaştırılan lipaz enziminin optimum pH değeri 9,0 (Chen and Lin 2007), *Bacillus megaterium* M22 lipazının 7,0 (Tekiner 2011), *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *B.atrophaeus* SB-2 ve *B. licheniformis* SB-3 suşlarından elde edilen lipazlarının pH 3-12 aralığında (Bradoo *et al.* 1999, Litthauer *et al.* 2002, Sharma *et al.* 2008), *Pseudomonas* sp. lipazının pH 8,0-9,0 aralığında (Kiran *et al.* 2008), *Bacillus* sp. L2 lipazının pH 7,0'de (Shariff *et al.* 2007) ve *Staphylococcus epidermidis* lipazının ise, pH 6,0 civarında (Simons *et al.* 1998) aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bakteriyel lipazlar genellikle 30–60°C arasında optimum sıcaklığa sahipken, daha düşük veya daha yüksek sıcaklık aralığıda bildirilmektedir (Gupta and Punj 2006). Bu çalışmada *B. thermoamylovorans* ST-10 suşundan saflaştırılan lipaz enziminin aktivite değişimi, *p*-nitrofenil asetat substratı kullanılarak 10-90°C'de incelendi. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı, 80°C olarak belirlendi. Ayrıca *p*-nitrofenil asetat substratı için 50 ve 60°C'de aktivitenin yaklaşık %70'inin, 40°C'de yaklaşık %60'ının, 70°C'de ise %95'inin korunduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar enzimin 20'den 80°C'ye kadar herhangi bir sıcaklıkta kolaylıkla kullanılabileceğini ve çeşitli endüstriyel uygulamalar açısından büyük avantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde yapılan literatür incelemeleri ile *B. megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığı 40°C (Tekiner 2011), *B. licheniformis* MTCC 6824 lipazının optimum sıcaklığı 40°C (Chakraborty and Raj 2008) *B. licheniformis* RSP-09 lipazının optimum sıcaklığı 40°C (Madan and Mishra 2010), *Bacillus* sp. L2, *G. stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. T1 lipazının optimum sıcaklığı 70°C (Leow *et al.* 2007; Shariff *et al.* 2007; Berekaa 2009) *B. stearothermophilus* P1 ve *Staphylococcus aureus* lipazlarının optimum sıcaklığı 50°C (Kumar and Nussinov 2001; Sinchaikul 2001; Litthauer *et al.* 2002), *Geoacillus* sp. SBS-4S, *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 ve

Thermomyces lanuginosus lipazlarının optimum sıcaklığı 60°C (Dheeman *et al.* 2011, Tayyab *et al.* 2011, Zheng *et al.* 2011) *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 lipazının optimum sıcaklığı ise 40°C (Chang 1998) olduğu belirlenmiştir.

B. thermoamylovorans ST-10 lipazı için en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, değişen konsantrasyonlarda substrat içeren bir dizi reaksiyon karışımında aktivite ölçümleri yapıldı. Substrat olarak *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil bütirat, *p*- nitrofenil oktaonat ve *p*- nitrofenil laurat kullanıldı. Bu substratlar için elde edilen verlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. K_M değerleri *p*-nitrofenil asetat için 0,147 mM, *p*-nitrofenil bütirat için 0,129 mM, *p*-nitrofenil oktaonat için 0,064 mM ve *p*-nitrofenil laurat için 0,055 mM olarak bulundu. Vmax değerleri ise sırasıyla 0,256 U/mL, 0,140 U/mL, 0,093 U/mL ve 0,0356 U/mL olarak belirlendi. K_M değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür ve ne kadar küçük olursa enzimin substrata olan ilgisinin o kadar büyük olduğunu gösterir. Bu sonuçlara göre kullanılan substratlar içerisinde en küçük K_M değeri 0,055 mM olarak *p*-nitrofenil laurata (*p*NPL) ait olduğu için enzimin bu substrata ilgisinin daha çok olduğu söylenilebilir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde substrat olarak *p*NPL kullanıldığında, *Bacillus* sp.'den elde edilen lipazın K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,5 mM ve 0,139 µM/dak/mL (Nawani *et al.* 2006), *B. megaterium* M22 lipazının 4,74 µM ve 8,13 U/ml (Tekiner 2011), *Aureobasidium pullulans* HN2.3 lipazının 0,608 mM ve 0,039 mM dak^{-1} (Liu *et al.* 2008) olarak belirlemişlerdir. Substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) kullanılan çalışmalarda K_M ve Vmax değerleri sırasıyla *Mucor hiemalis f. corticola* lipazı için 1,327 mM ve 91,11 µmol dak^{-1} mg^{-1} (Ülker ve Karaoğlu 2012), *A. mediterranei* DSM 43304 lipazı için 0,099 mM ve 2,53 mmol dak^{-1} mg^{-1} (Dheeman 2011), *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipazı için ise 70,4 mM ve 2,24 µmol dak^{-1} mg^{-1} (Gaur *et al.* 2008), *Spirulina platensis* lipazı için 0,02 mM ve 38,9 µmol dak^{-1} mg^{-1} (Saygıdeğer Demir ve Tükel 2010) ve *Burkholderia multivorans* V2 lipazı için 1,56 mM ve 5,62 µmol dak^{-1} mg^{-1} (Dandavate *et al.* 2009) olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonları ve inhibitörlerin etkisi çalışılmıştır. *B. thermoamylovorans* ST-10 lipazının aktivitesinin Zn^{2+} ile arttığı, K^+ ile

değişme olmadığı, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Hg^{2+}, Na^{+}, Ca^{2+}, Cu^{2+} ve EDTA ile azaldığı, *β*–merkaptoetanol, Triton X-100, Tween-80, Tween-20 ve SDS'nin ise ciddi oranda düştüğü belirlendi. Yapılan literatür çalışması ile *G. stearothermophilus* AH22 lipazını Hg^{+2} ve Zn^{+2} inhibe ederken, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+} ve Fe^{2+} aktive etmiştir. β-merkaptoetanol (2ME) aktive ederken, Triton X-114, Triton X-100, Tween-80 ve SDS deterjanları büyük oranda inhibe etmiştir (Ekinci 2015). *B. stearothermophilus* MC 7 lipazını Cu^{2+} ve Zn^{2+}, Co^{2+} ve Hg^{2+} iyonları inhibe ederken, Ca^{2+} iyonları ise aktive etmiştir (Kambourova *et al.* 2003). *Pseudomonas* lipazını, Hg^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+} ve Cu^{2+} inhibe ederken, Co^{2+} ve Ca^{2+} aktive etmiştir (Kiran *et al.* 2008). *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 lipazını Cu^{2+} ve Zn^{2+} iyonları inhibe ederken, Ca^{2+} iyonu ise aktive etmiştir *(Cao et al.* 2012). *P. gessardii, P. aeruginosa* PseA ve *Bacillus* sp. lipazları β -merkaptoetanol ile inhibe olmuştur (Nawani *et al.* 2006; Gaur *et al.* 2008; Ramani and Sekaran 2010). *B. cereus* lipazı Triton X-100 ve setiltrimetilamonyum bromür hariç diğer yüzey aktif maddeler inhibe olduğu tespit edilmiştir (Dutta and Ray 2009). *S. aureus* lipazını; SDS, Triton X -100 ve Tween 80, *P. luteola* lipazını; SDS, Triton X-100 ve Tween 80, *Pseudomonas* sp. lipazını ise; Tween 20, Tween 80 ve SDS, *Geobacillus* sp. SBS-4S lipazını ise; Tween 20, SDS, Tween 80 ve Triton-X 100'ün inhibe ettiği rapor edilmiştir (Litthauer *et al.* 2002; Tayyab *et al.* 2011; Sarkar *et al.* 2012).

Sonuç olarak, bu çalışma ile Erzurum-Ilıca kaplıcasından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve *B. thermoamylovorans* ST-10 suşundan lipaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu gerçekleştirildi. Bu sayede endüstriyel ve biyoteknolojik açıdan önemli olan, multi-enzim potansiyeli bulunan suş veya suşların literatüre kazandırılmasının önünü açılmış oldu. Özellikle endüstriyel açıdan önemi olan enzim ve enzim sistemlerini birarada eksprese edebilen suşların belirlenmesi, hem bilimsel hem de ticari açıdan oldukça önemlidir. Çünkü multi-enzim potansiyeli yüksek olan suşlar, aynı kültür ortamında birden fazla sayıda biyokimsal reaksiyonu katalizlediklerinden, hem maliyetin düşmesine, hem de oluşabilecek muhtemel yan ürün miktarının azalmasına sebep olacaktır. Tüm bunlar dikkate

alındığında, elde ettiğimiz bu suşların biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirliğinin yüksek olacağı kanısındayım.

KAYNAKLAR

Abbas, S. M. N., Halkman, A.K., 2004. "Antimicrobial Effect of Water Extract of Sumac (Rhus corlarla L.) on the Growth of Some Food-Borne Bacteria Including Pathogens." International of Food Microbiology 97(1): 63-69.

Acar, S., 2009. "Hasandabal köyü termal tesislerinden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu." Yüksek lisans tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Adiguzel A., I. K., Sahin F., Ozbek T., Gulluce M., Belduz A.O., Baris O., 2011. "Molecular Diversity of Thermophilic Bacteria Isolated From Erzurum City Pasinler Hot Spring (Erzurum/Turkey)." Turkish Journal of Biyology 35(3): 267-274.

Adiguzel, A., Agar, G., Baris, O., Gulluce, M., Sahin ,F., Sengul, M., 2006. "RAPD and FAME analysis of *Astragalus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. Biochemical Systematics and Ecology." 34(5): 424-432.

Adiguzel, A., Nadaroglu, H. and Adiguzel, G., 2015. "Purification and characterisation of β-mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices." Journal of Food Science and Technology DOI 10.1007/s13197-014-1609-y (inpress).

Adinarayana, K., P. Ellaiah and D. S. Prasad, 2003. "Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11." AAPS PharmSciTech 4(4): 440-448.

Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag,Weinheim.

Aguilar, A., 1996. "Papers presented at the First International Congress on Extremophiles Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations." FEMS Microbiology Reviews 18(2): 89-92.

Akhmaloka, A. S., S. Nurbaiti, I. N. Tika and F. M. Warganegara, 2006. "Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium From Papandayan Crater." Proceeding ITB on Engineering Sciences, 38B:1, 110.

Anuradha, B., Darah, I., Rashidah, A., Fatimah Azzahra, A.R., 2012. "Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra." Enzyme Research doi:10.1155/2012/987523.

Arpigny, J. L. and K. E. Jaeger, 1999. "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties." Biochem J 343 Pt 1: 177-183.

Atanassova, M., Derekova, A., Mandeva, R., Sjøholm, C., Kambourova, M., 2008. "*Anoxybacillus bogrovensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Dolni Bogrov, Bulgaria." Int. J. Syst. Evol. Microbiol 58: 2359–2362.

Bae, S. S., J. H. Lee and S. J. Kim, 2005. "*Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough." Int J Syst Evol Microbiol 55(Pt 3): 1211-1215.

Baillargeon, M. W. and P. E. Sonnet, 1991. "Selective lipid hydrolysis by *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase." Biotechnology Letters 13(12): 871-874.

Balan, A., Ibrahim, D., Rahim, R. A., Rashid, A. A. F., 2012. "Purification and

Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans I*BRL-nra." Enzyme Research 987523, 7

Baltaci, O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, A., 2016. "Isolation, characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary." Research an biotechnological enzyme potential 10.1080/01490451.2015.1137662.

Banerjee, M. and P. K. Sarkar, 2003. "Microbiological quality of some retail spices in India." Food Research International 36(5): 469-474.

Beldüz, A. O., . Dülger, S, Demirbağ, Z., 2003. "*Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endosporeforming bacterium. ." Int J Syst Evol Micr 53: 1315-1320.

Berekaa, 2009. "Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5."

Boomer, S. M., Noll, K.L., Geesey, G.G., Dutton, B.E., 2009. "Formation of multilayered photosynthetic biofilms in an alkaline thermal spring in Yellowstone National Park, WY, USA." Appl. Environ. Microbiol 75: 2464–2475.

Bouras, N., F. Mathieu, N. Sabaou and A. Lebrihi, 2007. "Influence on dithiolopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137." Process Biochemistry 42(6): 925-933.

Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry 72: 248-251.

Bradoo, S., R. K. Saxena and R. Gupta, 1999. "Two acidothermotolerant lipases from new variants of Bacillus spp." World Journal of Microbiology and Biotechnology 15(1): 87-91.

Brock, T. D., 2010. Thermophilles. (Ed: Brock T.D.) A Willey-Interscience Publication, New York.

Cao, Y., Zhuang, Y., Yao, C., Wu, B., He, B., 2012. "Purification and characterization of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 and its application for efficient resolution of (R, S)-1-phenylethanol." Biochemical Engineering Journal 64: 55-60.

Chakraborty, K. and R. P. Raj, 2008. "An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization." Food Chem 109(4): 727-736.

Chang, H. a. 1998. "Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1."

Chen, J.-P. and Y.-S. Lin, 2007. "Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate–silicate sol–gel beads." Process Biochemistry 42(6): 934-942.

Colacino, F., Crichton, R. R., 1997. "Enzyme thermostabilization the state of the art." Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 14: 211-271.

Dandavate, V., J. Jinjala, H. Keharia and D. Madamwar, 2009. "Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis." Bioresour Technol 100(13): 3374-3381.

Daoud, L., J. Kamoun, M. B. Ali, R. Jallouli, R. Bradai, T. Mechichi, Y. Gargouri, Y.

B. Ali and A. Aloulou, 2013. "Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase." Int J Biol Macromol 57: 232-237.

De Pascale, D., A. M. Cusano, F. Autore, E. Parrilli, G. di Prisco, G. Marino and M. L. Tutino, 2008. "The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family." Extremophiles 12(3): 311-323.

Demirjian, D. C., F. Moris-Varas and C. S. Cassidy, 2001. "Enzymes from extremophiles." Curr Opin Chem Biol 5(2): 144-151.

Derekova, A., Mandeva, R., Kambourova, M., 2008. "Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs." World J. Microbiol. Biotechnol 24, : 1697–1702.

Derekova, A., Sjøholm, C., Mandeva, R., Kambourova, M., 2007. "*Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria)." Extremophiles 11: 577–583.

Dheeman, D. S., G. T. Henehan and J. M. Frias, 2011. "Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis." Bioresour Technol 102(3): 3373-3379.

Dheeman, D. S., Henehan, G. T. M., Frías, J. M., 2011. "Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis." Bioresour. Technol 102: 3373-3379.

Divakar, K., J. Deepa Arul Priya and P. Gautam, 2010. "Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 66(3–4): 311-318.

Dulger, S., Demirbag, Z.,Belduz, A.O., 2004. "*Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. ." Int J Syst Evol Microbiol., 54: 1499-1503.

Dutta, S. and L. Ray, 2009. "Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C(7)." Appl Biochem Biotechnol 159(1): 142-154.

Ekinci A. P., 2015. *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşundan lipaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.

Erkaya E, Ç. A., 2006. "Kalınyaprak F. Enzimatik Kataliz." pp. 78.

Faiz, Ö. 2005. "Yeni bir termofilik bakterinin, *Anoxybacillus gonensis* A4, hücredışı lipaz/esteraz yeteneğinin incelenmesi ve karakterizasyonu." Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon. 2-6.

Gaur, R., G. N. Gupta, M. Vamsikrishnan and S. K. Khare, 2008. "Protein-coated microcrystals of *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipase." Appl Biochem Biotechnol 151(2-3): 160-166.

Ghosh, D., Bal, B., Kashyap, V.K., Pal, S., 2003. "Molecular phylogenetic exploration of bacterial diversity in a Bakreshwar (India) hot spring and culture of Shewanellarelated thermophiles." Appl. Environ. Microbiol. 69: 4332–4336.

Glıck, B. R., and Pasternak,S.S., 1994. "Principlesand Applications of Recombinant DNA." Molecular biotechnology.

Gomes, J., Steiner,W., 2004. "The Biocatalytic Potential of Extremophiles and

Extremozymes." Extremophlies 42(4): 223-235.
Gul-Guven, R., Guven, K., Poli, A., Nicolaus, B., 2008. "*Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. asaccharedens subsp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman." J. Gen. Appl. Microbiol. 54: 327-334.
Gupta, R. S., 1998. "Protei Phlogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships Archaebacteria, Eubacteria, and Eukaryotes." Microbiology and Molecular Biology Reviews 62.
Haki, G. D. R., A.K. , Bioresource Technology, 2003. "Developments in industrially important thermostable enzmeys." a review: 17-34.
Harwood, C. R., 1989. *Bacillus*, Biotechnologicy Handbooks. Plenum Press, London.
Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed, 2006. "Industrial applications of microbial lipases." Enzyme and Microbial Technology 39(2): 235-251.
Hiol, A., M. D. Jonzo, N. Rugani, D. Druet, L. Sarda and L. C. Comeau, 2000. "Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit." Enzyme Microb Technol 26(5-6): 421-430.
Houde, A., A. Kademi and D. Leblanc, 2004. "Lipases and their industrial applications: an overview." Appl Biochem Biotechnol 118(1-3): 155-170.
Hough, D. W. and M. J. Danson, 1999. "Extremozymes." Curr Opin Chem Biol 3(1): 39-46.
Imamura S, K. S., 2000. "Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257." J Biochem 127: 419–425.
Jaeger, K. E. a. E., T., 2002. "Lipases for Biotechnology." Current Opinion in Biotechnology 13: 390–397.
Jermsuntiea, 2011. "Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*."
Jiewei, T., L. Zuchao, Q. Peng, W. Lei and T. Yongqiang, 2014. "Purification and characterization of a cold-adapted lipase from *Oceanobacillus* strain PT-11." PLoS One 9(7): e101343.
Joseph, B., Ramtepe, P. V., Kumar, P. A., 2006. "Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*." J Gen Appl Microbiol. 52(6):315-20.
Kanjanavas, P., S. Khuchareontaworn, P. Khawsak, A. Pakpitcharoen, K. Pothivejkul, S. Santiwatanakul, K. Matsui, T. Kajiwara and K. Chansiri, 2010. "Purification and characterization of organic solvent and detergent tolerant lipase from thermotolerant *Bacillus* sp. RN2." Int J Mol Sci 11(10): 3783-3792.
Kanwar, S. S., I. A. Ghazi, S. S. Chimni, G. K. Joshi, G. V. Rao, R. K. Kaushal, R. Gupta and V. Punj, 2006. "Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate." Protein Expr Purif 46(2): 421-428.
Kaur, G., A. Singh, R. Sharma, V. Sharma, S. Verma and P. K. Sharma, 2016. "Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India." 3 Biotech 6(1): 49.
Kıvanç, A. v., 2008. "Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gram(+) Basillerin İzolasyonu ve İdentifikasyon Yöntemleri." 02: 61-70.
Kiran, G. S., S. Shanmughapriya, J. Jayalakshmi, J. Selvin, R. Gandhimathi, S.

Sivaramakrishnan, M. Arunkumar, T. Thangavelu and K. Natarajaseenivasan, 2008. "Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057)." Bioprocess Biosyst Eng 31(5): 483-492.

Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C., 2002. "Industrial enzyme applications." Current Opinion in Biotechnology 13: 345-351.

Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C., (1990. " Methods in Phytopathology." 153-180.

Koc, M., C. Cokmus and A. C. Cihan, 2015. "The genotypic diversity and lipase production of some thermophilic bacilli from different genera." Braz J Microbiol 46(4): 1065-1076.

Kolankaya, N., 2000. Biyoteknolojiye Bir Bakış:Dünya ve Türkiye.“Küreselleşme Sürecinde Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik. Sempozyum Bildirileri Kitabı.

Kristjansson, J. K., Hreggvidsson, G.O., 1995. "Ecology and habitats of extremophiles." World J. Microbiol Biotechnol 11, 17-25.

Kumar, S. and Nussinov, R. 2001. "How do thermophilic proteins deal with heat?" Cell Mol Life Sci 58(9): 1216-1233.

Lau, M. C., Aitchison, J.C., Pointing, S.B., 2009. "Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet." Extremophiles 13: 139–149.

Lawson, D. M., Brzozowski, A. M., Rety, S., Verma, C., Dodson, G. G., 1994. "Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling." Protein Eng. 7(4):543-50

Lee, S. H. and Park, D. H., 2008. "Isolation and physiological characterization of *Bacillus clausii* SKAL-16 isolated from wastewater." J Microbiol Biotechnol 18(12): 1908-1914.

Leow, T. C., Rahman,R. N., Basri, M., and Salleh, A. B., 2007. "A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1." Extremophiles 11(3): 527-535.

Li, H., Zhang, X., 2005. "Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1." Protein Expr. Purif. 42: 153–159.

Liming, L., Lianghua, T., 2005. "Purification and partial characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* ZJU318." Appl Biochem Biotechnol. 125(2):139-46

Litthauer, D., A. Ginster and E. van Eeden Skein, 2002. "*Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family." Enzyme and Microbial Technology 30(2): 209-215.

Liu, Z., X. Li, Z. Chi, L. Wang, J. Li and X. Wang, 2008. "Cloning, characterization and expression of the extracellular lipase gene from *Aureobasidium pullulans* HN2-3 isolated from sea saltern." Antonie Van Leeuwenhoek 94(2): 245-255.

Madan, B. and P. Mishra, 2010. "Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol 85(3): 597-604.

Madigan, M. T., Martinco, J.M. ve Parker, J., 2000. "Procaryotic diversity the Archaea." Brock Biology of Microorganisms.

Manceau, C. and A. Horvais, 1997. "Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. tomato." Appl Environ Microbiol 63(2): 498-505.

Marangoni, F., C. Agostoni, A. M. Lammardo, M. Bonvissuto, M. Giovannini, C. Galli

and E. Riva, 2002. "Polyunsaturated fatty acids in maternal plasma and in breast milk." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 66(5-6): 535-540.

Marteinsson, V. T., Hauksdottir, S., Hobel, C.F.V., Kristmannsdottir, H., Hreggvidsson, G.O., Kristjansson, J.K., 2001. "Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland." Appl. Environ. Microbiol. 67: 4242–4248.

Masomian, M., R. N. Rahman, A. B. Salleh and M. Basri, 2016. "Analysis of Comparative Sequence and Genomic Data to Verify Phylogenetic Relationship and Explore a New Subfamily of Bacterial Lipases." PLoS One 11(3): e0149851.

Matsumoto, T., S. Takahashi, M. Kaieda, M. Ueda, A. Tanaka, H. Fukuda and A. Kondo, 2001. "Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production." Appl Microbiol Biotechnol 57(4): 515-520.

Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E., 2001. "A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents." Syst. Appl. Microbiol. 24: 572–587.

Mert, Ş., 1994. "Gliserinin yağ asitleri ile çörekotu tohumu varlığında enzimatik esterleşme reaksiyonlarının incelenmesi."

Miller, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner, 1993. "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." Clin Sci (Lond) 84(4): 407-412.

Miller, S. R., Purugganan, M.D., Curtis, S.E., 2006. "Molecular population genetics and phenotypic diversification of two populations of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*." Appl. Environ. Microbiol 72: 2793–2800.

Narayanasamy, P., 1997. "Plant pathogen detection and disease diagnosis." p331.

Nardini, M., D. A. Lang, K. Liebeton, K. E. Jaeger and B. W. Dijkstra, 2000. "Crystal structure of pseudomonas aeruginosa lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases." J Biol Chem 275(40): 31219-31225.

Nawani, N., J. Khurana and J. Kaur, 2006. "A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization." Mol Cell Biochem 290(1-2): 17-22.

Nazina, T. N., D. Sokolova, A. A. Grigoryan, N. M. Shestakova, E. M. Mikhailova, A. B. Poltaraus, T. P. Tourova, A. M. Lysenko, G. A. Osipov and S. S. Belyaev, 2005. "*Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the Geobacillus species." Syst Appl Microbiol 28(1): 43-53.

Olusesan, A. T. A., L. Kamaruzaman Abubakar, Fatimah Hamid, N. Sheikh Abdul Radu, Son Saari, Nazamid, 2009. "Phenotypic and molecular identification of a novel thermophilic *Anoxybacillus* species: a lipase-producing bacterium isolated from a Malaysian hotspring."

Pandey, A., S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger and V. T. Soccol, 1999. "The realm of microbial lipases in biotechnology." Biotechnol Appl Biochem 29 (Pt 2): 119-131.

Panikov, N. S. P., N.A.; Dorofeev, A.G.; Nikolaev, Y.A.; Verkhovtseva, N.V., 2003.

"Growth of the Thermophilic Bacterium *Geobacillus uralicus* as a Function of Temperature and pH: An SCM-Based Kinetic Analysis." Microbiology 72: 277-284.

Rahman, T. J., Marchant, R., and Banat, I. M. 2004. "Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments." Biochem Soc Trans 32(Pt 2): 209-213.

Ramani K, C. E., Sekaran G. 2010. "Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate."

Ramani, K., Chockalingam, E. and Sekaran, G., 2010. "Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate." J Ind Microbiol Biotechnol 37(5): 531-535.

Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L. and Muthukumar, K., 2008. "An overview of enzymatic production of biodiesel." Bioresour Technol 99(10): 3975-3981.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V., 1998. "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases." Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(3): 597-635.

Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler, B. J., Ninet, B., Hirschel, B., and Emler, S., 1998. "16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene." J Clin Microbiol 36(6): 1761-1764.

Rosenstein, R. and Gotz, F., 2000. "Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization." Biochimie 82(11): 1005-1014.

Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L., 2001. "Life in extreme environments." Nature 409(6823): 1092-1101.

Sağ Açıkel, Y., Çelebi, B., 2006. "*R. delemar* ile Lipaz Üretimi." 19.

Sangeetha, R., A. Geetha and I. Arulpandi, 2010. "Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: Production, purification and characterization." Braz J Microbiol 41(1): 179-185.

Sangeetha, R., Geetha, A. and Arulpandi, I., 2010. "Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: Production, purification and characterization." Braz J Microbiol 41(1): 179-185.

Sarkar, P., Yamasaki, S., Basak, S., Bera, A., Bag, P.K., 2012. "Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from Arachis hypogaea rhizosphere." Process Biochemistry 47: 858–866.

Saxena, R. K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. and Gulati, R., 2003. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry.

Schmid, R. D., Verger, R., 1998. "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications." Angewandte Chemie International Edition 37: 1609-1633.

Sekhon, B. S., 2010. "Food nanotechnology - an overview." Nanotechnol Sci Appl 3: 1-15.

Shariff, F. M., Leow, T. C., Mukred, A. D., Salleh, A. B., Basri, M., and Rahman, R. N., 2007. "Production of L2 lipase by *Bacillus* sp. strain L2: nutritional and physical factors." J Basic Microbiol 47(5): 406-412.

Sharma, A., Pandey, A., Shouche, Y.S., Kumar, B., Kulkarni, G., 2008. "Characterization and identification of *Geobacillus* sp. isolated from Soldhar hot spring site of Garhwal Himalaya, India." J. Basic Microbiol 48: 1–8.

Shieh, C. J., Liao, H. F., and Lee, C. C., 2003. "Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology." Bioresour Technol 88(2): 103-106.

Sievert, S. M., Ziebis, W., Kuever, J., Sahm, K., 2000. "Relative abundance of Archaea and Bacteria along a thermal gradient of a shallowwater hydrothermal vent quantified by rRNA slot-blot hybridization." Microbiology 146 1287–1293.

Sifour, M., Zaghloul, T. I., Saeed, H. M., Berekaa, M. M., Abdel-Fattah, Y. R., 2010. "Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs." N Biotechnol. 27(4):330-6

Simons, J. W., Kampen, M. D., Riel,S., Gotz, F., Egmond, M. R., and Verheij, H. M., 1998. "Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus* epidermidis--comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases." Eur J Biochem 253(3): 675-683.

Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F. M., Chen, S. T., 2001. "Optimization of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification, and Characterization." Protein Expr Purif. 22(3):388-98

Skirnisdottir, S., 2000. Phylogenetic characterization of microbial mats and isolation of Thermus spp. and sulfur-oxidizing bacteria from Icelandic hot springs. Department of Biotechnology Lund University,Sweeden, Fjölritunarstofa Daniels Halldorssonar: 3-6.

Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G.O., Hjorleifsdottir, S., Marteinsson, V.T., Petursdottir, S.K., Holst, O., Kristjansson, J.K., 2000. "Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats." Appl. Environ. Microbiol 66: 2835–2841.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G., (editors) 1986. "Bergey s Manual of Systematic Bacteriology." 2.

Son, Ç. D., 1999. "Isolation and optimization of growth conditions of thermophilic bacteria from Turkish soils and hot springs ".

Sterner, R. and Liebl, W. 2001. "Thermophilic adaptation of proteins." Crit Rev Biochem Mol Biol 36(1): 39-106.

Takacs, C. D., Ehringer, M., Favre, R., Cermola, M., Eggertsson, G., Palsdottir, A., Reysenbach, A.-L., 2001. "Phylogenetic characterization of the blue filamentous bacterial community from an Icelandic geothermal spring." FEMS Microbiol. Ecol. 35: 123–128.

Tarakçıoğlu, Y., 1979. "An Amylase Producing Maltotriose From *Bacillus suptilis*." Agric.Biol.Chem. 49(4): 1901-1907.

Tayyab, M., N. Rashid and M. Akhtar, 2011. "Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: cloning and characterization of the lipase." J Biosci Bioeng 111(3): 272-278.

Tekiner, R., 2011. "*Bacillus megaterium* M22'den lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu."

Tenreıro, S., Nobre, M.F. ve DA Costa, M.S., 1995. "Thermus silvanus sp.nov. and T. chliarophilus sp. nov., two new species related to Thermus ruber but with lower growt theperature,." IJSB 45: 633-639.

Topal, Ş., 1985. "Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknoloji de rennin'in yeri." 12: 25-37.

Ülker, S., Karaoğlu, Ş.A., 2012. "Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. corticola* isolated from soil." Journal of Bioscience and Bioengineering 114(4): 385-390.

Velu, 2012. "Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation."

Wang SL1, L. Y., Liang TW, Chio SH, Ming LJ, Wu PC., 2009. "Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate."

Welch, S. G., ve Williams, R.A.D., 1995. "Taq52 I, a novel and thermostable type II restriction endouclease from the genus Thermus, recognising the pentanucleotide sequence GV(A or T) GC and celeaving DNA between the first and second bases of the recognition sequence: G ↓C(A or T)GC." Nucleic Acid Research 23: 4573-4575.

Wosse, C. R., Kandler, O. ve Wheelis, M.L., 1990. "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, an Eucarya." Poc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4576-4579

Yanmis, D., Adiguzel, A., 2014. "Molecular typing of thermophilic bacilli isolated from different hot springs of Turkey." Research Journal of Biotechnology 9: 83-88.

Yapaşan, E., 2008. "Partial purification and characterization of lipase enzyme from a *Pseudomonas* strain ". Iztech Research,

Zeikus, J. G. and Wolfe, R. S. 1972. "*Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile." J Bacteriol 109(2): 707-715.

Zheng, X., X. Chu, W. Zhang, N. Wu and Y. Fan, 2011. "A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: gene cloning and characterisation." Appl Microbiol Biotechnol 90(3): 971-980.

Zouaoui, B., Bouziane,A., 2011. " Isolation, Optimisation and Purification of Lipase Production by *Pseudomonas aeruginosa*." Biotechnology & Biomaterials(7).

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sabancı İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini ise Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen lisesinde tamamladı. 2010 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü 2014 yılında bölüm üçüncüsü olarak tamamladı. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında yüksek lisans ve 2015 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi'nde İlköğretim Matematik Öğretmenliği bölümünde eğitimine devam etmektedir.