

***Bacillus cereus* ATA179 SUŞUNDAN LİPAZ ÜRETİMİNİ
ARTIRMAK İÇİN UV MUTAJENEZİYLE SUŞ
GELİŞTİRME, BESİNSEL OPTİMİZASYON, ENZİMİN
KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYON VE
DETERJAN ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYELİ**

Vichi Sicha IRIANTO



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bacillus cereus* ATA179 SUŞUNDAN LİPAZ ÜRETİMİNİ ARTIRMAK İÇİN UV
MUTAJENEZİYLE SUŞ GELİŞTİRME, BESİNSEL OPTİMİZASYON,
ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYON VE
DETERJAN ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYELİ**

Vichi Sicha IRIANTO
0000-0001-6588-0422

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2020
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Vichi Sicha IRIANTO tarafından hazırlanan "*Bacillus cereus* ATA179 SUŞUNDAN LİPAZ ÜRETİMİNİ ARTIRMAK İÇİN UV MUTAJENEZİYLE SUŞ GELİŞTİRME, BESİNSEL OPTİMİZASYON, ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYON VE DETERJAN ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYELİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Başkan : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
0000-0002-5292-9482
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Dilek KUT
0000-0002-9059-0838
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi,
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN
0000-0001-8590-8381
Pamukkale Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi ,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bacillus cereus ATA179 SUŞUNDAN LİPAZ ÜRETİMİNİ ARTIRMAK İÇİN UV MUTAJENEZİYLE SUŞ GELİŞTİRME, BESİNSEL OPTİMİZASYON, ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYON VE DETERJAN ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYELİ

Vichi Sicha IRIANTO

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada, fiziksel mutajen UV ile muamele edilen *Bacillus cereus* ATA179 suşundan lipaz üreten 445 adet mutant elde edilmiştir. Maksimum lipaz üreten mutant suş seçilmiş ve *Bacillus cereus* EV4 olarak adlandırılmıştır. 24. saatte en yüksek enzim üretimi 10,6 U/ml ile elde edilmiştir. Bu mutant ana suştan %60 oranında daha fazla enzim üretmiştir. Besinsel optimizasyon çalışmalarında, en iyi karbon ve azot kaynakları sırasıyla sukroz (10,8 U/mL) ve (NH₄)₂HPO₄ (15,3 U/mL), metal iyonu olarak CuSO₄ (11 U/mL) saptanmıştır. Mutant EV4 besinsel koşulların optimize ederek yaratılan modifiye ortamda enzim üretiminde %32 artış göstermiştir. Kısmen saflaştırılmış enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60°C ve 7.0 olarak saptanmıştır. Termostabilite çalışmalarında enzimin termostabil olduğunu tespit edilmiştir. CuSO₄, CaCl₂, LiSO₄, KCl, BaCl₂ ve Tween 20 enzim aktivitesi üzerine aktivatör etki yaptığı bulunmuştur. V_{max} ve K_m kinetik değerleri sırasıyla 17,36 U/mL ve 0,036 mM olarak saptanmıştır. Moleküler ağırlık yaklaşık 28,2 kDa bulunmuştur. Ham enzimin oda sıcaklığında 60 güne, +4°C'de 75 güne, -20°C'de 90 güne kadar aktivitesinin koruduğunu saptanmıştır. Enzimin deterjan sanayiinde potansiyel gücü araştırılmış ve enzimin deterjan katkı maddelerinden etkilenmediği ayrıca yağlı maddelerle kirletilmiş kumaşlarda yağın çıkarılmasında etkili olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *Bacillus*, UV Mutasyon, Optimizasyon, Kısmi Saflaştırma, Karakterizasyon, Deterjan Uygulaması

2020, x + 145 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

STRAIN IMPROVEMENT BY UV MUTAGENESIS FOR ENHANCED LIPASE PRODUCTION FROM *Bacillus cereus* ATA179 STRAIN, NUTRITIONAL OPTIMIZATION, PARTIAL PURIFICATION OF ENZYME, CHARACTERIZATION AND POTENTIAL IN THE DETERGENT INDUSTRY

Vichi Sicha IRIANTO

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

Supervisor: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, *Bacillus cereus* ATA179 was exposed to UV and total 445 lipase-producing mutants were obtained. The best lipase producing mutant showed the highest enzyme activity at 24th hour (10,6 U/ml). The mutant showed a 60% increase in enzyme production and, named as *Bacillus cereus* EV4. Sucrose (10,8 U/mL) as the best carbon source, (NH₄)₂HPO₄ (15,3 U/mL) as the best nitrogen source, CuSO₄ (11 U/mL) as the best metal ion were obtained. EV4 mutant showed a 32% increase in enzyme production in the modified medium created by optimizing nutritional conditions. Optimum temperature and pH of the partially purified enzyme were 60° C and 7.0, respectively. Thermostability studies showed that the enzyme is thermostable. CuSO₄, CaCl₂, LiSO₄, KCl, BaCl₂ and Tween 20 had an activating effect on enzyme activity. V_{max} and K_m kinetic values were found as 17,36 U/mL ve 0,036 mM, respectively. The molecular weight was determined as about 28,2 kDa. The activity enzyme was found to be stable up to 60 days at room temperature, 75 days at + 4°C and 90 days at -20°C. The potential strength of the enzyme in the detergent industry was investigated and it was found that the enzyme was not affected by detergent additives; and it was found to be effective in removing fat in fabrics contaminated with oily substances.

Key words: Lipase, *Bacillus*, UV Mutation, Optimization, Partial Purification, Characterization, Detergent Application

2020, x + 145 pages.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yürütülmesi sırasında anlayış, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, görüş ve önerileri ile beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a,

Deterjan uygulamalarında kumaş temini ve renk ölçüm spektrofotometresinin kullanımı sağlayan Tekstil Mühendisliği bölümünden değerli hocam sayın Prof.Dr. Dilek KUT'a,

Laboratuvar çalışmalarımda her zaman yardımını gördüğüm Arş.Gör. Dr. Tuba SEVGİ'ye, Dr. Aynur AYBEY'ye ve laboratuvar arkadaşlarım Sarra MSAKNI'ye,

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

Tüm yaşamım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim canım annem Siti CHASANAH'a ve aileme,

Tanıdığım günden itibaren hep yanımda olan ve tezimin daha kısa sürede bitmesinde ve başarıya ulaşmasında büyük katkı sağlayan sevgili nişanlım Ayudya Arum CENDANI'ye en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Vichi Sicha IRIANTO
11/06/2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Lipazların Tarihçesi.....	4
2.2. Lipazların Yapısı.....	4
2.3. Lipaz - Katalizli Reaksiyonlar.....	8
2.3.1. Hidroliz.....	8
2.3.2. Sentez reaksiyonları.....	11
2.4. Lipazların Sınıflandırılması.....	16
2.4.1. Spesifikliğine göre lipazların sınıflandırılması.....	16
2.4.2. Kaynaklarına göre lipazların sınıflandırılması.....	19
2.5. Lipaz - Katalizli Reaksiyonların Endüstriyel.....	28
2.5.1. Deterjanlar.....	30
2.5.2. Gıda endüstrisi.....	32
2.5.3. Sıvı ve katı yağ endüstrisi.....	33
2.5.4. Tekstil endüstrisi.....	34
2.5.5. Kozmetik.....	35
2.5.6. Deri endüstrisi.....	36
2.5.7. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi.....	37
2.5.8. Biyodizel üretimi.....	38
2.5.9. Atık su arıtımı.....	38
2.5.10. Biyosensor.....	39
2.5.11. Organik sentezi.....	40
2.5.12. Tıbbi ve farmasötik endüstrisi.....	40
2.5.13. Çay endüstrisi.....	41
2.6. <i>Bacillus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	41
2.6.1. <i>Bacillus cereus</i>	42
2.6.2. <i>Bacillus</i> lipazının genel özellikleri.....	43
2.7. Mutasyon.....	46
2.8. UV (Ultraviole) Mutasyonu.....	49
2.9. Tamir Mekanizması.....	51
2.9.1. Fotorektivasyon.....	52
2.9.2. Eksisyon tamir mekanizmaları.....	53
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	57
3.1. Materyal.....	57
3.2. Yöntem.....	57
3.2.1. Fiziksel mutajen UV ile yapılan mutasyon çalışması.....	57
3.2.2. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri ve bakteri üretim koşulları.....	58
3.2.3. Bakteri üremesinin ve enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	59

3.2.4. Karbon (C) kaynaklarının etkisi	61
3.2.5. Azot (N) kaynaklarının etkisi	62
3.2.6. Metal iyonu kaynaklarının etkisi	62
3.2.7. Maksimum lipaz üretimi için modifiye ortamın belirlenmesi	62
3.2.8. Lipaz enzimin kısmi saflaştırılması	62
3.2.9. Protein miktarının belirlenmesi	64
3.2.10. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	65
3.2.11. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	65
3.2.12. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi	66
3.2.13. Kinetik parametrelerin saptanması	66
3.2.14. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti	66
3.2.15. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi	70
3.2.16. Enzimin deterjan endüstrisindeki potansiyeli: Lipazın sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi	70
3.2.17. Enzimin deterjan endüstrisindeki potansiyeli: Enzimin deterjandaki raf ömrü ..	70
3.2.18. Enzimin deterjan endüstrisindeki potansiyeli: Kirletilmiş kumaşlara lipaz uygulanması	71
4. BULGULAR	73
4.1. Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi	73
4.2. Mutantların Lipaz Üretim Kapasitesinin Kantitatif Olarak Saptanması	75
4.3. Karbon (C) Kaynaklarının Etkisi	77
4.4. Azot (N) Kaynaklarının Etkisi	79
4.5. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi	81
4.6. Maksimum Lipaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Belirlenmesi	82
4.7. Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	83
4.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	84
4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	86
4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Potansiyel Bileşiklerin Etkisi	88
4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	90
4.12. Enzimin Moleküler Ağırlığının Tespiti	91
4.13. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi	93
4.14. Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanım Potansiyeli: Lipazın sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi	94
4.15. Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanım Potansiyeli: Enzimin deterjandaki raf ömrü	96
4.16. Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanım Potansiyeli: Kirletilmiş kumaşlara lipaz uygulanması	97
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	100
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ	145

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
$(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$	Amonyum nitrat
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Amonyum sülfat
N	Azot
Cu^{2+}	Bakır İyonu
CuSO_4	Bakır sülfat
ZnSO_4	Çinko sülfat
Dk	Dakika
$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	Demir İyonu
FeSO_4	Demir sülfat
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Diamonyum sülfat
gr	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
C	Karbon
kDa	Kilodalton
LiSO_4	Lityum sülfat
MgSO_4	Magnezyum sülfat
V_{max}	Maksimum enzim aktivitesi
MnSO_4	Manganez (II) sülfat
K_m	Michaelis-Menten sabitesi
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
KOH	Potasyum Hidroksit
K^{+2}	Potasyum İyonu
KCl	Potasyum Klorür
KNO_3	Potasyum Nitrat
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
NaCl	Sodyum klorür
[S]	Substrat Konsantrasyonu
U	Ünite
%	Yüzde orantı

Kısaltmalar	Açıklama
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
MTHF	5,10-meteniltetrahidrofolat
6-4 PPs	6-4 pirimidin fotoürünleridir
8-HDF	8-hidroksi-5-deaza -riboflavin
Bp	Baz çifti (Base Pair)
CPD	Cis-syn siklobutan pirimidin dimerler
DNA	Deoksiribonukleik Asit
DAG	Diaçilgliserol
DG	Digliserit
dH ₂ O	Distile Su
Eİ	Enzimatik İndeksi
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
FADH	Flavin adenin dinükleotidi
FMN	Flavin mononükleotidi
His	Histidin
MW	Molecular Weight
NB	Nutrient Broth
OD	Optik Yoğunluk (Optik Dansite)
PZR (PCR)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PES	Polyester lifi
ROS	Reaktif oksijen türlerinin
Rpm	Revolutions Per Minute
RT	Room Temperatur (Oda sıcaklığı)
Ser	Serin
BSA	Sığır serum albümini
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAG	Triaçilgliserol
TBA	Tribütirin Agar
TG	Trigliserit
UV	Ultraviyole
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Molekuler Biyoloji Birliği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Katalitik triad kalıntıları ve kapak yapısı pozisyonu ile gösterilen çeşitli lipazlar. Katalitik triad kalıntıları ve kapak yapısı sırasıyla sarı çubuklar ve mavi renkle gösterilmektedir.	7
Şekil 2.2. Triaçilgliserolün lipaz ile hidrolizi	8
Şekil 2.3. Triaçilgliserol yapısı	9
Şekil 2.4. A. Bir lipaz molekülünün substrat etkileşimli bölgesinin temsili gösterimi B. <i>Rhizopus oryzae</i> 'deki lipaz katalizli hidroliz mekanizması	10
Şekil 2.5. Lipaz katalizli asidoliz reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler serbest yağ asitleri ve yapılandırılmış lipit.....	13
Şekil 2.6. Alkoliz reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler Monoaçilgliserol ve Diaçilgliserol.	14
Şekil 2.7. Lipaz katalizli interesterifikasyon reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler	15
Şekil 2.8. Lipaz katalizli aminoliz reaksiyonu	15
Şekil 2.9. Spesifikliklere ve kaynaklara göre lipazların sınıflandırılması	16
Şekil 2.10. Spesifik olmayan lipaz ve 1,3 spesifik lipaz tarafından katalize edilen reaksiyonlar	19
Şekil 2.11. Mikrobiyal lipaz pazarının yıllara ve bölgelere göre artışı.....	29
Şekil 2.12. (a) Bir siklobutan pirimidin dimerinin yapısı (b) 6-4 fotoürünün yapısı	50
Şekil 2.13. Fotoliyaz enzimin fotoreaktivasyon mekanizması.....	53
Şekil 2.14. Baz eksisyon tamir mekanizması.....	54
Şekil 2.15. <i>E. coli</i> 'de nükleotid eksisyon tamir mekanizması.....	56
Şekil 3.1. UV mutasyonu oluşturma düzeneği.....	58
Şekil 3.2. Protein standart grafiği.....	65
Şekil 3.3. Renk ölçüm spektrofotometresi	72
Şekil 4.1. A. Ana suş (EI = 2,4; hidrolitik zon çapı = 19 mm) ve B. EV4 (EI = 5,6; hidrolitik zon çapı = 17 mm)'nin Tribütirin ortamındaki lipaz hidrolitik zon çapları	74
Şekil 4.2. EV1'in lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	76
Şekil 4.3. EV2'nin lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	76
Şekil 4.4. EV3'ün lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	77
Şekil 4.5. EV4'ün lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	77
Şekil 4.6. Karbon kaynaklarının lipaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri	79
Şekil 4.7. Azot kaynaklarının lipaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri	80
Şekil 4.8. Metal iyonlarının lipaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri	82
Şekil 4.9. Sıcaklığın kısmi saf enzim üzerine etkisi bağıl aktivite.....	85
Şekil 4.10. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın stabilitesi bağıl aktivite.....	86
Şekil 4.11. Kısmi saf enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi bağıl aktivite.....	87
Şekil 4.12. Kısmi saf enzim aktivitesi üzerine pH'nın stabilitesi bağıl aktivite	88
Şekil 4.13. Farklı potansiyel bileşiklerin saf enzim üzerine etkileri	90
Şekil 4.14. Lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği ve Michaelis-Menten grafiği).....	91

Şekil 4.15. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bantlarının görünümü. 1. Marker 2. Ham enzim 3. Konsantre Enzim.....	92
Şekil 4.16. Standart proteinlerin Rf değerleri ve moleköl ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri.....	93
Şekil 4.17. Farklı sıcaklıkta ham enzimin depolanma stabilitesi.....	94
Şekil 4.18. Liyofilize edilmiş lipaz enzimi aktivitesine 60°C’de farklı konsantrasyonlardaki deterjan katkılarının etkisi.....	96
Şekil 4.19. Liyofilize edilmiş lipaz enzimi aktivitesine 70°C’de farklı konsantrasyonlardaki deterjan katkılarının etkisi.....	96
Şekil 4.20. A) Kirletilmemiş kumaş, B) Yemeklik yanmış yağ ile kirletilmiş kumaş...	98
Şekil 4.21. Yemeklik yanmış yağ ile kirletilmiş kumaşlara farklı deterjan, deterjan+enzim uygulaması sonrası elde edilen delta E değerlerinin karşılaştırılması...	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Bakteri kaynaklı lipazlar	25
Çizelge 3.1. Lipaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri (Kumar ve ark. 2012a).....	58
Çizelge 3.2. Lipaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besi ortamı	59
Çizelge 3.3. Lipaz aktivite tayin basamakları	60
Çizelge 3.4. Örnek tamponun içerikleri	67
Çizelge 3.5. Yürütme tamponun içerikleri.....	67
Çizelge 3.6. Yıkama çözeltinin içerikleri.....	68
Çizelge 3.7. Boyama çözeltisi içerikleri	68
Çizelge 3.8. SDS-PAGE için kullanılan %10 ayırma jelin içerikleri	68
Çizelge 3.9. SDS-PAGE için kullanılan %4 yükleme jelin içerikleri.....	69
Çizelge 4.1. 5, 10, 15 ve 20 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve lipaz hidrolitik zon çapları.....	73
Çizelge 4.2. <i>Bacillus cereus</i> ATA179'un hayatta kalma oranı üzerindeki UV radyasyonun etkisi.....	74
Çizelge 4.3. Ana suş <i>Bacillus cereus</i> ATA179 ve mutant EV1, EV2, EV3 ve EV4 suşlarının lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişim değerleri	75
Çizelge 4.4. Farklı karbon kaynaklarının üreme ve lipaz enzimi üretimi üzerine etkileri	78
Çizelge 4.5. Farklı azot kaynaklarının lipaz enzimi üretimi ve üremesi üzerine etkileri	80
Çizelge 4.6. Metal kaynaklarının lipaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri	81
Çizelge 4.7. Kontrol ortamı ile modifiye ortamda üreme ve lipaz enzimi üretim kapasitesinin karşılaştırılması	83
Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat çöktürmesi	84
Çizelge 4.9. Lipaz enziminin saflaştırma basamakları.....	84
Çizelge 4.10. Lipaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	85
Çizelge 4.11. Sıcaklık stabilitesinin lipaz enzimi üzerine etkisi.....	86
Çizelge 4.12. Enzim üzerine pH'nın etkisi	87
Çizelge 4.13. pH stabilitesinin lipaz enzimi üzerine etkisi	88
Çizelge 4.14. Potansiyel bileşiklerin enzim üzerine etkileri.....	89
Çizelge 4.15. Lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	90
Çizelge 4.16. Ham enzimin depolanma stabilitesi	94
Çizelge 4.17. Liyofilize edilmiş lipaz enzimi aktivitesine farklı sıcaklık ve farklı konsantrasyonlardaki deterjan katkılarının etkisi.....	95
Çizelge 4.18. Enzimin deterjandaki raf ömrü	97
Çizelge 4.19. Liyofilize lipaz enziminin uygulandığında elde edilen DE değerleri	98

1. GİRİŞ

Enzimler, spesifik biyokimyasal reaksiyonu gerçekleştirebilmek için bir katalizör olarak canlı bir organizma tarafından üretilen biyolojik substans veya biyolojik makromoleküllerdir. Enzimler hücre içi ve hücre dışı biyolojik/biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokatalizördür. Enzimler oldukça verimli, reaksiyon oranlarını normal kimyasal reaksiyonlardan 100 milyon - 10 milyar kat daha hızlı artırabilmektedir (Gurung ve ark. 2013). Enzimlerin yaklaşık 4.000 biyokimyasal reaksiyonu katalize edebildiği bilinmektedir (Bairoch 2000).

Bugün, yaklaşık 4000 enzim bilinmektedir ve bunlardan yaklaşık 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır (Andualema ve Gessesse 2012). Enzimler, yüksek özgülükleri ve ekonomik avantajları nedeniyle herhangi bir çevresel etki yaratmadan endüstri alanlarında biyolojik katalizörler olarak kullanılmaktadır. Enzimin diğer avantajları, normal sıcaklıklarda ve diğer çevresel koşullarda daha iyi çalışmaktadır. Sert koşullara ihtiyaç olan sert kimyasallar yerine enzimlerin kullanılması ile enerjinin korunması ve kirliliğin önlenmesi sağlamaktadır. Enzimler oldukça spesifiktir, bu nedenle istenmeyen yan ürün oluşturmamaktadırlar. Enzimler immobilize hale getirilebilmekte ve dolayısıyla birçok defa kullanımı olabilmektedir.. Enzimler ayrıca zararlı bileşiklerden oluşan atıkların işleminde de kullanılabilir. Normalde, ayrıştırıcılar yardımıyla doğal olarak enzimler ayrışabildiğinden dolayı enzimlerin tüm kimyasal bileşenleri kolayca doğaya geri dönüştürülmektedir (Gennari ve ark. 1998). Ayrıca, enzimlerin birçok farklı biyotransformasyonu katalize edebildiğinden dolayı, ticari ölçekte kullanılan enzim sayısı oldukça artmıştır (Sharma ve ark. 2001).

Enzimler başta gıda sanayisi olmak üzere hayvan yemi, tekstil endüstrisi, deri işlenmesi, deterjan endüstrisi, kâğıt üretimi, kauçuk, fotoğraf endüstrisi, farmakoloji endüstrisi, biyo-yakıt endüstri gibi diğer endüstriyel alanlarda da kullanıldığı gibi tıpta teşhis ve tedavide de geniş bir kullanım alanına sahiptir (Anonim 2020b).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %75'ini çeşitli polimerlerin doğal yapısını bozulabilen hidrolazlar oluşturmaktadır (Godfrey ve West 1996). Endüstriyel enzimler pazarı karbohidrazlar (Amilazlar, glukozazlar, sellülozazlar, diğer karbohidrazlar), proteazlar, lipazlar ve diğer enzimler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Dünya genelinde

kullanılan ticari enzimlerin %60'ını proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %5'ini lipazlar ve geri kalan kısmını diğer enzimler oluşturmaktadır (Zimmerman ve ark. 2014).

Lipazlar (Triaçilgliserol açilhidrolazlar; EC 3.1.1.3), triaçilgliserolün diaçilgliserol, yağ asitleri ve gliserole hidrolizini katalize eden en önemli hidrolitik enzim sınıflarından biridir (Soleymani ve ark. 2017). Ayrıca lipaz sulu olmayan ortamlarda ters reaksiyonu (Esterifikasyon) katalize edebilmekte ve doğada bolca bulunmaktadır (Singh ve ark. 2017).

Endüstriyel enzimler mantar, maya, bakteri, hayvan ve bitki kaynaklı olabilmektedir. Sayısız endüstriyel uygulama potansiyeli, kültür işleme kolaylığı ve üretim sırasında fazla miktarda elde edilebilme kapasitesine sahip olduğundan dolayı endüstri alanlarında kullanılan lipazlar genellikle mikroorganizma kaynaklıdır (Pratish ve ark. 2013). Diğer yandan mikrobiyal lipazların yüksek seçiciliği ve geniş substrat spesifiklikleri gibi avantajları bulunmaktadır (Dutra ve ark. 2008). Ayrıca, mikrobiyal lipazlar bitkisel ve hayvansal enzimlere göre daha stabil olduğu bildirilmiştir (Mazhar ve ark. 2017). Bu avantajların yanında lipazların çok spesifik kimyasal dönüşüm (biyotransformasyon) yapabilme yeteneğine sahip olduğundan dolayı gıda, deterjan, kozmetik, organik sentezi ve ilaç endüstrilerinde kullanılmaktadır (Park ve ark. 2005). Lipazlar organik kimyasal işleme, biyosülfonat sentezi, kâğıt imalatı ve zirai kimyasal endüstride de büyük bir uygulama alanı bulmaktadır (Sharma ve ark. 2002, Houde ve ark. 2004).

Lipazlar, özellikle deterjan sanayiinde büyük önem taşımaktadırlar. Lipazlar yağ kalıntılarının giderilmesi ve tıkanmış drenlerin temizlenmesi (Vulfson 1994) amacıyla ev ve endüstriyel çamaşırlar için deterjanlara ve bulaşık deterjanlarına eklenmektedir (Kumar ve ark. 1998).

Pseudomonas spp., *Staphylococcus* spp., *Chromobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Achromobacter* spp. ve çeşitli *Bacillus* spp. gibi bakteriler ticari ölçekte lipaz üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Chahinian ve ark. 2000). Mikrobiyal lipazlar çoğunlukla ekstraselülerdir (Veerepagu ve ark. 2013). Bununla *Bacillus* cinsi, büyük miktarda ekstraselüler enzim salgılama kabiliyetine sahip olduğundan lipaz üretimi için iyi bilinen bir kaynaktır (Gupta ve ark. 2004).

Son birkaç yıl içinde lipaz enzimi çeşitli endüstriyel süreçlerde potansiyel uygulamasına sahip olduğundan dolayı lipaz üretimine yönelik araştırmalar artmıştır. Lipaz üretimine yönelik çalışmalar geçmişten günümüze devam etmekle birlikte yeni geliştirilecek tekniklerle üretimin artırılmasına yönelik yeni araştırmalar gerekmektedir. Her bir endüstriyel uygulama spesifik özellikte enzimlere ihtiyaç duyduğu için spesifik özellikte lipaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesi gerekmektedir. Özellikle mikroorganizmaların lipaz üretim kapasitelerinin geliştirilmesi için optimal ortam koşullarının ve üretimi artırıcı etki eden çeşitli faktörlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (Gül 2013). Ayrıca mutajenez yöntemleri yoluyla suş geliştirilebilmektedir. Geliştirilmiş suşlar yüksek enzim üretim kapasitesine ve istenilen yeni özelliklere sahip olabilmektedir (Karanam ve ark. 2008). UV ile indüklenen mutajenez, daha uygun mikrobiyal mutantların geliştirilmesi için kullanılan en basit ve en yaygın uygulanan mutajenez yöntemlerinden biridir (Shakibaie ve ark. 2018).

Bu çalışmada Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında daha önceden lipaz enzimi üretimi için topraktan izole edilmiş ve adlandırılmış olan *Bacillus cereus* ATA179 suşu kullanılarak fiziksel mutajen olan UV ile lipaz üretimi açısından verimli mutant suşların elde edilmesi yoluna gidilmiştir. Çalışmada en verimli bir adet mutant suş seçilerek bu suşun lipaz enzimi üretim koşullarının optimizasyonu, kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve deterjan endüstrisinde potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Lipazların Tarihçesi

Claude Bernard 1856 yılında çözünmez yağ damlacıklarını hidrolize eden ve bunları çözünür ürünlere dönüştüren bir enzim olarak lipazları keşfetmiştir. Uzun yıllar trigliseritleri hidrolize eden enzimler incelenmiş ve enzimin esterlerin sentezini yapma kabiliyeti ve hidrolizi katalizleyebilmesi 1927 yılında tanımlanmıştır (Hossain ve ark. 2010). Hayvan pankreasından elde edilen ekstrat diğer hidrolazlarla (pankreatin) ham bir karışımı ya da saflaştırılmış halinde insan tüketimi için sindirimime yardımcı olmak üzere ticari olarak kullanılmış, ancak lipazların endüstriyel tüketim potansiyeli arttığında hayvansal lipazlar yerine mikrobiyal kaynaklı lipazlar araştırılmasına başlanmıştır (Sangeetha ve ark. 2010). Bakteriyel lipazlar 1901 yılında *Serratia marescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında ilk olarak elde edilmiştir (Hasan ve ark 2006). *Rhizomucor miehei* (Brady ve ark. 1990, Derewenda ve ark. 1992) ve *Geotrichum candidum* (Schrag ve ark. 1991) mantarlarından ilk lipaz kristal yapıları sırasıyla 1990 ve 1991'de çözülmüştür. 1993 yılında, *Pseudomonas glumae*'den bakteriyel lipazın ilk kristal yapısı belirlenmiştir (Noble ve ark. 1999).

Biyoteknoloji alanlarında en yaygın kullanılan *Candida antarctica* lipazın ilk kristalografik çalışması 1994'te sunulmuştur (Uppenberg ve ark. 1994). Aynı yılda Novo Nordisk *Thermomycesl anugiwnosus* mantarından geliştirilen ve *Aspergillus oryzae*'de ifade edilen ilk ticari rekombinant lipaz olarak "Lipolaz"ı bildirmiştir. Bugün en önemli araştırılmış lipaz üreten mikroorganizmaları temsil edenler *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* (Gurung ve ark. 2013), *Mucor*, *Candida*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Humicola*, ve *Rhizopus* olarak verilmektedir (Larios ve ark. 2004).

2.2. Lipazların Yapısı

Lipazlar veya triaçilgliserol açil ester hidrolazlar serin hidrolaz grubunda yer almakta, bunlara karboksilik asit esterazlar adlandırılmakta ve EC 3.1.1.3 olarak numaralandırılmaktadır (Sarmah ve ark. 2017).

Memeli hayvanlar (Winkler ve ark. 1990), bakteriler (Kugimiya ve ark. 1986) ve fungal (Boel ve ark. 1988) kaynaklardan elde edilen lipazların ana yapıları belirlenmiştir. Yapı içlerindeki amino asitlerin sayısının 270-641 arasında olduğunu saptanmıştır (Krishna ve Karanth 2002). Lipazlar genel olarak C ve N olmak üzere iki kısmına ayrılmış bir polipeptit zincirinden meydana gelmektedir. Bunlardan N-kısmı katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır (Akoh ve Min 1998). Lipaz enzimin yapısal özellikler arasında bir α/β hidrolaz katlanmasına sahiptir (Şekil 2.1). α/β hidrolaz katlanması, altı α heliks (A - F) ile bağlanan sekiz paralel β ipliği ($\beta 1 - \beta 8$) içeren merkez β -tabakasının varlığı ve $\beta 2$ ipliğinin antiparalel olmasını ile karakterize edilmektedir. Merkez β -tabakası sol süpersarmal bir bükülmeye sahiptir ve dolayısıyla ilk ve son ipliklerin arasında 90° açı oluşturmaktadır (Jaeger ve ark. 1999, Schrag ve Cygler 1997). Bununla birlikte, β tabakasının organizasyonunun sayısı da farklı kaynaklı lipazlarda değişebilmektedir (Gupta ve ark. 2015). Lipaz enzimin aktif bölgesinde bir nükleofilik serin kalıntısı, bir katalitik asidik kalıntı (aspartik veya glutamik asit) ve bir histidin kalıntısından oluşan yüksek oranda korunmuş bir katalitik triad (katalitik üçlü) bulunmaktadır (Şekil 2.1). Nükleofilik kalıntı, yüksek oranda korunmuş bir pentapeptit G-X1-S-X2-G içinde bulunmakta, buradaki G glisin, S serin, X1 histidin ve X2 glutamik veya aspartik asidi belirlemektedir (Vaquero ve ark 2016). Diğer yandan *Bacillus* lipazlarında ilk glisinin yerinde bir alanin olduğunu belirlenmiştir (Arpigny ve Jaeger 1999). Bu pentapeptit, $\beta 5$ ipliği ve α -sarmal C arasında “nükleofilik dirsek” olarak adlandırılan çok keskin bir γ dönüş oluşturmaktadır (Nardini ve Dijkstra 1999). Nükleofilik dirsek α/β hidrolaz katlanmasının en korunmuş yapısal özelliğidir (Schrag ve Cygler 1997). Tipik bir α/β hidrolaz katlanmasında, katalitik asit (glutamik veya aspartik asidi), $\beta 7$ ipliğinden sonra bulunan bir ters ilmek içinde bulunmakta ve hidrojen bağı ile katalitik histidin’e bağlanmaktadır. Katalitik triad’da sadece histidin tamamen olarak korunmakta ve $\beta 7$ ipliğinden sonra bulunan bir ilmek içinde bulunmaktadır (Ollis ve ark. 1992, Nardini ve Dijkstra 1999).

Lipazın ana yapısal bileşenleri arasında kapak, bağlanma cebi, oksianyon deliği ve disülfür bağı bulunmaktadır (Sarmah ve ark. 2017). Lipaz yapısında substrat moleküllerinin katalitik merkeze erişimini kontrol eden “kapak” olarak bilinen yapısal

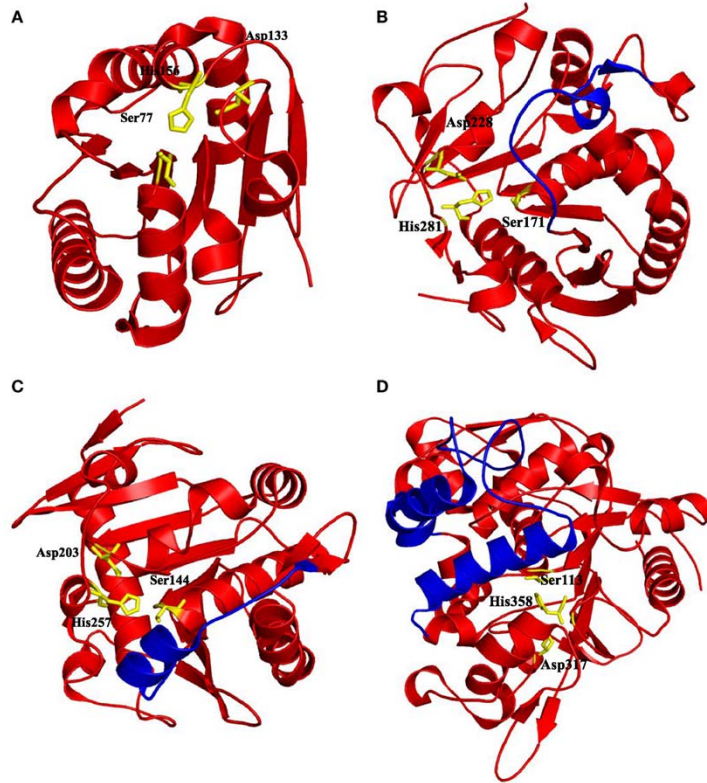
bir bileşen bulunmaktadır (Anobom ve ark. 2014). Kapak amfifilik bir α heliks peptid dizilerden oluşmaktadır (Schmid ve Verger 1998). Üç boyutlu lipaz yapılarının analizinde, bu yapı kapalı ve açık olmak üzere iki farklı konformasyon gösterebilmektedir. Lipaz kapalı konformasyonunda, substrat aktif bölgeye girememektedir. Bu durumda lipaz enzimin yüzeyi esas olarak hidrofildir ve lipazı inaktif hale getirmektedir. Bir lipid-su ara yüzünün varlığında kapak aktif bölgeyi açmakta, enzimi işlevsel hale getiren geniş bir hidrofobik yüzeyi ortaya çıkarmakta ve böylece lipaz enzimi aktif hale gelmektedir. Bu olayına ara yüzey aktivasyon olarak denilmektedir (Bordes ve ark. 2010). Diğer yandan *Pseudomonas glumae* (Noble ve ark. 1993), *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger ve ark. 1993), *Candida antarctica* B (Uppenberg ve ark. 1994) ve koyu (Thirstrup ve ark. 1994) ve kobaydan (Hjorth ve ark. 1993) pankreatik lipazlar gibi bazı lipazlar aktif bölgeyi kaplayan amfifilik bir kapağa sahip olmasına rağmen ara yüzey aktivasyonu göstermemektedirler (Schmid ve Verger 1998).

Lipaz enzim yapısında triaçilgliseroller için merkez β tabaka üzerinde bulunan dört bağlanma cebi tanımlanmıştır, bir oksianyon deliği ve sn-1, sn-2 ve sn-3 pozisyonlarında bağlanan yağ asitleri için üç cep bulunmaktadır. Bu ceplerin boyut farklılıkları ve hidrofilik/hidrofobik özelliklerine göre lipazın özgüllüğünü belirlemektedirler. Bağlanma bölgesinin geometrisine göre üç alt grup tanımlanabilmekte, bunlar çatlak benzeri bağlanma bölgesi (örneğin *Rhizomucor miehei*), huni benzeri bağlanma bölgesi (örneğin *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica* B) ve tünel benzeri bağlanma bölgesidir (örneğin *Candida rugosa*). Çatlak benzeri ve huni benzeri bağlanma bölgeleri büyük substratlar için daha uygun olurken tünel benzeri bağlanma bölgesi ise daha uzun zincirli yağ asitleri olan substratları kabul etmektedir (Krishna ve Karanth 2002). Oksianyon deliği, esas olarak enzimin katalitik verimliliğini etkileyen bir başka önemli bileşendir (Sarmah ve ark. 2017). Oksianyon deliği, lipazın N-terminal bölgesinde ve katalitik serinin C terminal komşusunda bulunan iki omurga amit kalıntıları tarafından oluşmaktadır (Krishna ve Karanth 2002). Hidroliz sırasında, negatif yüklü bir tetrahedral ara madde üretilmekte ve dolayısıyla oluşan oksijen iyonu hidrojen bağı yoluyla stabilize olmaktadır (Gupta ve ark. 2015). Oksianyon deliği kalıntıları, bu oksijen iyonunun stabilize edilmesinde önemli bir rol

oyunmaktadır. Oksianyon deliklerinin kalıntılarından biri nükleofilik serin kalıntısının yanında bulunurken, ikinci kalıntı $\beta 3$ ipliği ile bir α heliks arasında konumlandırılmaktadır (Sarmah ve ark. 2017).

Ek olarak, sistein bakımından zengin protein olan lipazlar yapılarını korumak için bir ile dört disülfür bağı içermektedir. Sistein kalıntıları arasında meydana gelen disülfid köprüleri, proteinin entropisini azaltarak konformasyonel stabiliteye önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Gupta ve ark. 2015).

Tüm lipazlar α/β hidrolaz katlanmasına sahip olmamaktadır. Bazı lipazlar örnek olarak fosfolipaz A₂ (PLA₂), fosfolipaz A-D (PLA-D) ve bazı lizofosfolipazlar farklı yapısal özelliklerine sahip olduğunu belirlenmektedir (Svendsen 2000).



Şekil 2.1. Katalitik triad kalıntıları ve kapak yapısı pozisyonu ile gösterilen çeşitli lipazlar. Katalitik triad kalıntıları ve kapak yapısı sırasıyla sarı çubuklar ve mavi renkle gösterilmektedir. A. Kapak yapısı bulunmayan *Bacillus subtilis* lipazı A (van Pouderoyen ve ark. 2001), B. Thr101-Asp119 kapak yapısına sahip olan *Malassezia globosa* lipazı SMG1, ilmek şeklinde kapak bulunmaktadır (Xu ve ark. 2012), C. Heliks kapak yapısına sahip olan *Rhizomucor miehei* lipazı (Brzozowski ve ark. 1992) ve D. Kapak yapısında iki heliks bulunan *Geobacillus zalihae* lipazı (Matsumura ve ark. 2008).

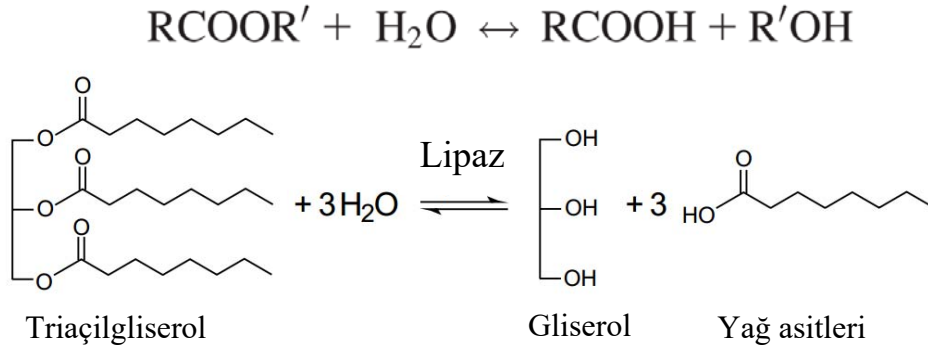
2.3. Lipaz - Katalizli Reaksiyonlar

Lipazlar hidroliz reaksiyonu yanında esterifikasyon ve transesterifikasyon (asidoliz, alkoliz, aminoliz ve interesterifikasyon) olmak üzere sentez reaksiyonları da katalize etmektedirler (Shimada ve ark. 2005). Lipazlar, hem sulu hem susuz ortamlarda katalitik reaksiyonu katalizlemekte ve çeşitli farmasötik ilaçların sentezinde reaksiyonlar gerçekleştirmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer 1998). Bu enzim sınıfı esas olarak enantiyoselektif hidrolitik reaksiyonlar gerçekleştirmekte ve amid ve ester bağlarının oluşumunu katalize etmektedir.

Son birkaç yılda, özellikle organik sentezinde bulunan amilazlar ve proteazlara kıyaslandığında lipazlar daha fazla önem kazanmıştır (Angajala ve ark. 2016).

2.3.1. Hidroliz

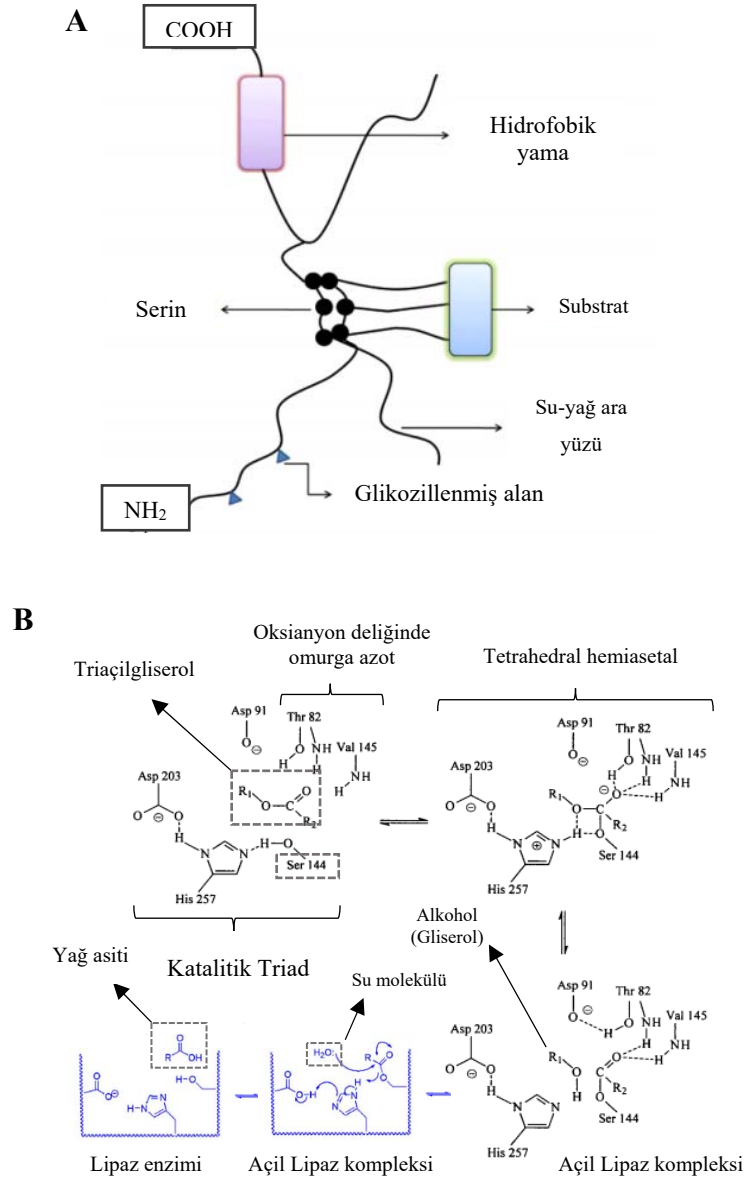
Lipazlar su moleküllerini kullanarak triaçilgliserollerin ester bağlarını katalize etmekte ve bu olaya hidroliz denmektedir (Şekil 2.2). Suda düşük çözünürlüğü olan triaçilgliseroller, lipazlar için ana substratlardır.



Şekil 2.2. Triaçilgliserolün lipaz ile hidrolizi (Jaeger ve Reetz 1998)

Triaçilgliserol (trigliserit veya triaçilgliserit) bir gliserol (gliserin) ve ester bağlarıyla birbirine bağlanan üç yağ asidinden oluşan bir nötral esterdir (Şekil 2.3). Yağ asitleri, hidrokarbon zincirli monokarboksilik organik asitlerdir ve yapılarında 4-36 karbonlu hidrokarbon zincirinin ucunda karboksil grubu (-COOH) bulunmaktadır (Anonim 2020i).

fasulyesi (Stirton 1964) ve *Pseudomonas fluorescens* (Sonntag 1979) 'den elde edilmektedir. *Bacillus pumilus*'ten elde edilen lipaz enzimi gıda ve deterjan endüstrilerinde uzun zincirli triaçilgliserolü hidrolize etmek için kullanılmaktadır (Laachari ve ark. 2015). Bunun yanında *Bacillus thermoleovorans* lipazı yağ endüstrisinde triaçilgliserol parçalanmasında kullanılmaktadır (Patil ve ark. 2011).



Şekil 2.4. A. Bir lipaz molekülünün substrat etkileşimli bölgesinin temsili gösterimi (Angajala ve ark. 2016) B. *Rhizopus oryzae*'deki lipaz katalizli hidroliz mekanizması (Reis ve ark. 2009, Schmid ve Verger 1998)

Yağların enzimatik parçalanmasında lipazların kullanılması ile oluşan yağ asitleri, monogliseritler ve digliseritler, süt ürünleri için aroma maddeleri oluşturulmaktadır. Ayrıca biyolipoliz halihazırda yağsız et üretimi için kullanılmaktadır. Balık işleme sırasında yağ gidermesi (Seitz 1974) ve p-nitrofenil asetat gibi mum esterlerini hidrolize etmek için de lipazlar kullanılabilir (Brahimi-Horn ve ark. 1989).

Çeşitli teknik ürünler için değerli bir ham malzemesi olan risin oleik asit üretiminde dehidratasyon ve enterifikasyon gibi yan reaksiyonlar nedeniyle geleneksel buharlı ayırma işlemi ile hint yağından üretilmemektedir. Burada hint yağının hidrolizi için lipaz enzimi kullanılarak yan reaksiyonlar giderilip risin oleik asit üretilmektedir (Mukherjee 1994).

Lipit hidrolizi ile ilgili uygulamalar arasında beyazlatma bileşiminde (Nakamura ve Nasu 1990), kuru temizleme çözücüleri içinde lipit kirleticilerin ayrışmasında (Abo 1990), sıvı deri temizleyici bileşiminde (Kobayashi 1989), lens üzerindeki kirlilikleri azaltmak için kontakt lens temizleme bileşiminde (Bhatia 1990), gıda işleme veya evsel/endüstriyel atık su arıtma tesislerinde lipitler tarafından tıkanmış drenlerin temizlenmesinde (Bailey ve Ollis 1986) lipazlar kullanılmaktadır.

2.3.2. Sentez reaksiyonları

Lipazlar esterifikasyon ve transesterifikasyon (asidoliz, alkoliz, aminoliz ve interesterifikasyon) olmak üzere sentez reaksiyonları da katalize etmektedirler (Shimada ve ark. 2005).

Esterifikasyon, esterler ve su ile sonuçlanan alkoller ve karboksilik asitler arasında çift yönlü bir reaksiyondur. Bu reaksiyon susuz ortamda (organik çözücüler ve süperkritik sıvılar) yada az sulu ortamda gerçekleşmektedir (Sharma ve ark. 2016). Ortamda su olmaması, rekabet eden hidroliz reaksiyonunu ortadan kaldırmaktadır (Gandhi ve ark. 2000). Ancak esterifikasyon sulu ortamda da gerçekleşebilmektedir. *Candida deformans*'tan 1,3 regiospesifik lipazın, sulu ortamdaki serbest yağ asitlerinin esterifikasyonu katalize edebildiği göstermektedir. Buna ek olarak üç farklı lipaz enziminin (*R. miehei*, *Rhizopus delemar* ve *C. deformans*) sulu ortamda esterifikasyon katalize ettiği de bulunmuştur (Lecoite ve ark. 1996).

Lipaz tarafından katalize edilen esterifikasyonun mekanizması, serin proteazlar gibi iki tetrahedral ara ürün kapsamaktadır. Birinci tetrahedral ara ürün, katalitik triadın serin kalıntısının asit üzerine nükleofilik saldırısı ile oluşturulmaktadır. Ara ürün, bir açilenzim kompleksi oluşturmak için bir su molekülünü kaybetmektedir. Bir alkol molekülü, başka bir tetrahedral ara ürün oluşturmak üzere açilenzim kompleksine (nükleofilik saldırı) saldırmakta, bu da sonunda bir ester molekülünü kaybetmekte ve enzimi doğal formuna dönüşmektedir. Her iki tetrahedral ara ürün bir oksianyona sahip ve bunu hidrojen bağları ile oksianyon deliğinin protein atomlarına bağlanarak stabilize edilmektedir (Gandhi ve ark. 2000).

Esterlerin çok çeşitli kullanımlarına sahip olduğundan dolayı esterifikasyon son derece önemlidir. Lipazlar emülsiyonlaştırıcılar, yüzey aktif cisimleri, mum esterleri, kiral moleküller, biyopolimerler, modifiye edilmiş katı ve sıvı yağlar, yapılandırılmış lipitler ve aroma esterleri gibi endüstriyel olarak önemli ürünler üretmek için esterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmaktadır (Krishna ve Karanth 2002).

Lipaz katalizli esterifikasyon, organik ester üretimi alanında, yan ürün olarak sadece su elde edildiği ve konvansiyonel kimyasal sentez işlemlerinin aksine herhangi bir tehlikeli çözücü kullanımını içermemesi nedeniyle büyük önem kazanmaktadır (Stergiou ve ark. 2013). Bazı önemli örnekler arasında, laktik asitleri veya karboksilik asitleri ile alkol esterifikasyonu katalize etmek için *C. antarctica*'dan lipaz enzimi kullanılmaktadır. *R. meihei* ve *C. antarctica*'dan üretilen lipazlar kullanılarak dihidroksi stearik asidin esterifikasyonu gerçekleştirilmektedir (Phuah ve ark. 2015).

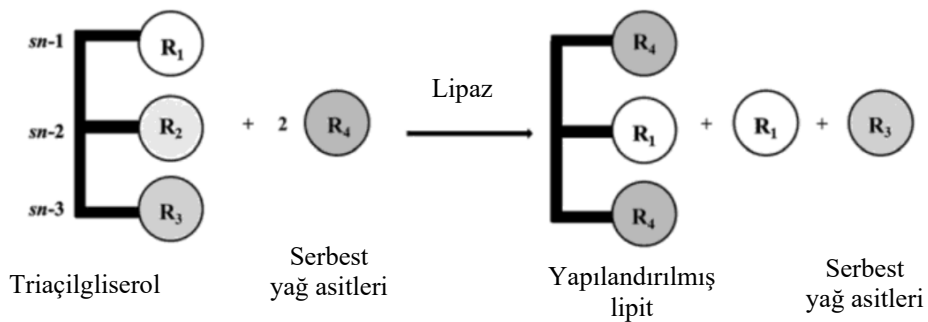
Lipaz ile katalize edilen esterifikasyon reaksiyonları çoğu gıda endüstrisinde, özellikle katı ve sıvı yağlardan gliseritlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlar, insan kullanımı için bitkisel yağların geliştirilmesi ve saf kimyasalların üretimi gibi uygulamalara sahip olduğunu göstermişler. Lipazla katalize edilmiş şekerlerin ve şeker alkollerinin sentezi, biyolojik olarak bozunabilirlikleri ve düşük toksisiteleri nedeniyle konvansiyonel yöntemlere göre daha avantajlı bulunmaktadır (Sharma ve Kanwar 2014)

Oleik asit, bitkisel yağ ve mikroalgler, lipaz katalizli esterifikasyonu ile biyodizel üretiminde iyi bilinmekte (Madalozzo ve ark. 2015) ve üretilen biyodizelin petrol dizel

yakıtına benzer özelliklere sahip olduğu ve mükemmel yağlama özelliği gösterdiğini bulunmaktadır (Sarmah ve ark. 2017).

Transesterifikasyon, iki veya daha fazla bileşik arasında asit grubu değişimini kapsamaktadır. Substrat tipine göre, lipazlar, asidoliz (bir ester ve karboksilik asit), alkoliz (bir ester ve bir alkol), aminoliz (bir ester ve bir amin) ve interesterifikasyon (iki ester arasında) katalize edebilmektedir (Balcao ve ark. 1996).

Asidoliz reaksiyonu, bir asit ve bir ester arasında açıl grup değişiminin gerçekleştiği reaksiyonudur (Şekil 2.5) (Lee ve Akoh 1998). Reaksiyon, reaktanların ve ürünlerin bir denge karışımını üretebilmekte veya reaksiyon ürünlerinden birini fiziksel olarak çıkarılarak reaksiyonu tamamlanmaktadır. Örneğin, hindistancevizi yağının kısa zincirli yağ asidinin daha yüksek erime sıcaklığı ile değiştirilmesi için hindistancevizi yağı ve stearik asit reaksiyona sokulabilmektedir (Going 1967). Ayrıca asidoliz reaksiyonu, bir serbest yağ asidinin triaçilgliserol molekülüne bağlanması için son derece etkili bir yöntemdir. Serbest veya etil ester formundaki yağ asitlerinin yağlara inkorporasyonu asidoliz reaksiyonunda söz konusudur (Willis ve Marangoni 2002). Belirli fonksiyonlara sahip serbest yağ asitlerini asidoliz ile bitkisel yağlara bağlanarak, bu yağların besin değerleri yükseltilmektedir (Senanayake ve Shahidi 2002). Diğer yandan asidoliz yöntemi ile balık yağlarından yapılandırılmış yağ üretilmektedir (Willis ve Marangoni 2002).

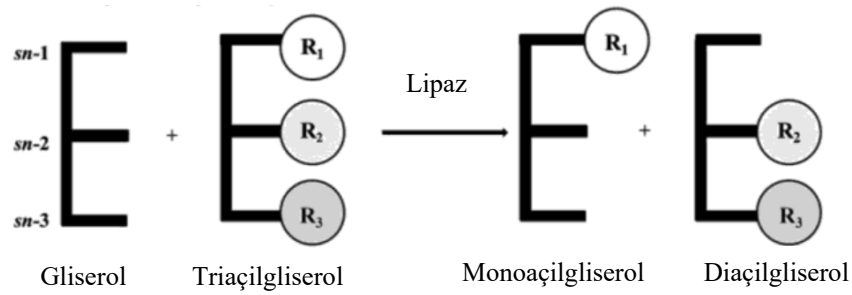


Şekil 2.5. Lipaz katalizli asidoliz reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler serbest yağ asitleri ve yapılandırılmış lipit (Lopes ve ark. 2019)

Alkoliz reaksiyonu, gliserol (gliseroliz) veya etanol (etanoliz) gibi bir alkol ile bir ester arasında alkoksi grubu değişimini gerçekleştirdiği reaksiyonudur (Şekil 2.6) (Lee ve Akoh 1998). Reaksiyon sonucunda yeni bir ester ve alkol oluşmaktadır. Alkoliz reaksiyonun

sırasında triaçilgliserol moleküllerin hidrolizi ile monoaçilgliserol ve diaçilgliserol oluşabilmektedir. Bitkisel yağlar ve hayvansal yağlar alkoliz ile mükemmel bir dizel yakıt alternatifi olan metil ve etil esterleri ve yağ kimyasında değerli bir ara ürün olan yağ asidi alkil esterleri üretilmektedir (Basri ve ark. 1997).

Alkolizin en temel uygulamalarından biri gliseroliz reaksiyonu, gliserol ve triaçilgliserol arasındaki açıl grup değişimi sonucunda yeni triaçilgliserol, diaçilgliserol ve monoaçilgliserol oluşmaktadır. Alkoliz reaksiyonu bir denge reaksiyonudur ve alkol fazlası reaksiyonu ürün lehine döndürmektedir Alkoliz reaksiyonlarında genellikle metanol, bütanol, propanol gibi basit alkoller kullanılmaktadır. Metanol kısa zincirli bir alkol ve polar bir bileşik olduğundan dolayı en çok kullanılmaktadır (Willis ve Marangoni 2002).

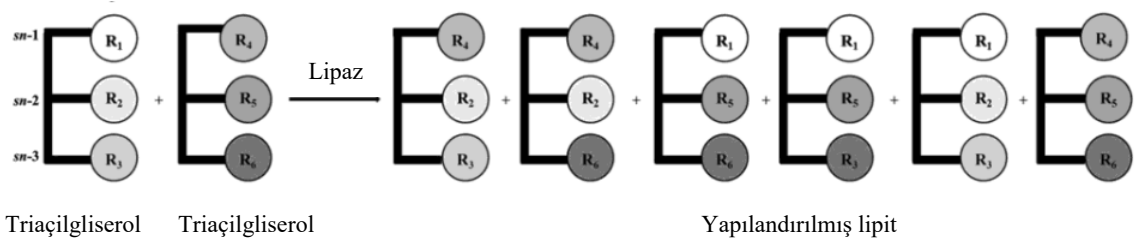


Şekil 2.6. Alkoliz reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler monoaçilgliserol ve diaçilgliserol (Lopes ve ark. 2019).

İnteresterifikasyon reaksiyonu, iki veya daha fazla triaçilgliserol molekülü arasında yağ açıl gruplarının değişimini gerçekleştirdiği reaksiyonudur (Şekil 2.7) (Idris ve Mat Dian 2005). Reaksiyon, triaçilgliserol hidrolizi yoluyla serbest yağ asitlerin oluşması ile başlamakta ve daha sonra bu serbest yağ asitlerin gliserole yeniden esterleştirilmesi gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon ile ticari yağlar olarak Betapol (lipid beslenmesi) ve Salatrim (kısa ve açıl triaçilgliserol molekülleri) elde edilmektedir (Farfan ve ark. 2013).

İnteresterifikasyon yağ endüstrisinde triaçilgliserol moleküllerin fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini modifiye etmek için kullanılmaktadır. Yemeklik yağları daha kullanışlı hale getirmek ve bu yağların diğer gıda maddelerinde de geniş bir kullanım alanı

bulmasını sağlamak amacıyla interesterifikasyon tek başına veya diğer reaksiyonlarla beraber kullanılmaktadır (Gryglewicz 2001).



Şekil 2.7. Lipaz katalizli interesterifikasyon reaksiyonu ve reaksiyon sonu ortaya çıkan ürünler (Lopes ve ark. 2019).

Aminoliz bir esterin bir amin ile reaksiyona girmesi gerçekleştiği reaksiyonudur (Şekil 2.8) (Balcao ve ark. 1996). Reaksiyon esas olarak bir molekülün bir amin veya amonyak ile reaksiyona girmesini kapsamaktadır (Sarmah ve ark. 2017).

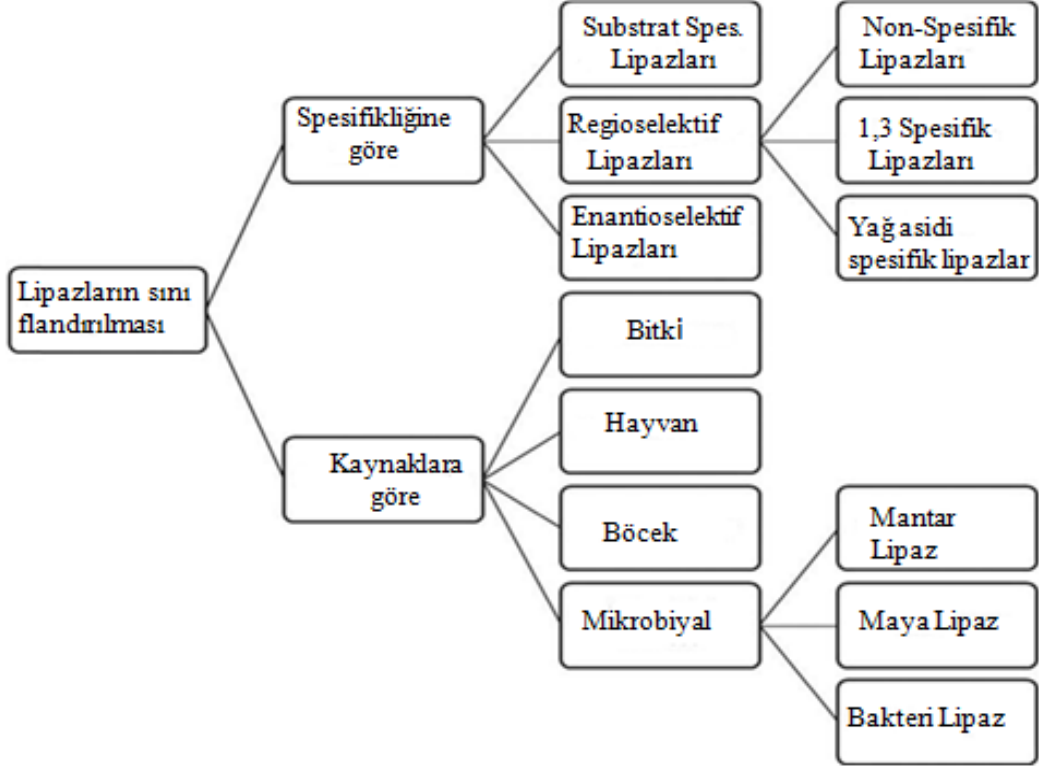
Lipaz ile katalize edilen aminoliz reaksiyonları, çeşitli anahtar kiral olarak saf ürünlerin doğrudan sentezini kolaylaştırdığından dolayı farmasötik endüstrisinde önemli endüstriyel uygulamalara sahiptir. Farmasötik uygulamaların bazıları, domuz pankreatik lipaz ve *C. cylindracea* lipazı ile üretilen olağan ve olağandışı amino asitleri içeren peptit sentezlerini kapsamaktadır (Hassan 2014). Diğer örnekler, birçok ilacın ana bileşeni olan β -amino asit esterlerinin sentezi (Xu ve ark. 2015), fibromiyaljinin klinik tedavisinde yardımcı olan milnasipran gibi ilaçların sentezi (Sanfilippo ve ark. 2014), anti-sıtma ilaçlarının sentezi (Linares ve ark. 2014) ve hormon reseptörlerin sentezidir (Hassan ve ark. 2015). Bu reaksiyonun ilaç alanında yaygın kullanımı, moleküllerin etkili kinetik çözünürlüğündeki potansiyelinden kaynaklanmaktadır (Linares ve ark. 2014). Lipaz katalizli aminolizin diğer uygulama alanlarının arasında kozmetikler ve agrokimyasal ürünler yer almaktadır (Couturier ve ark. 2009).



Şekil 2.8. Lipaz katalizli aminoliz reaksiyonu (Paques ve Macedo 2006)

2.4. Lipazların Sınıflandırılması

Lipazlar geniş bir reaksiyonu katalize etmekte (Gupta 2015) ve aynı zamanda her yerde bulunmaktadır. Sarmah ve arkadaşlarına (2017) göre lipazlar genel olarak spesifikliklerinin (özelliklerinin) ve kaynaklara göre sınıflandırılmaktadır (şekil 2.9). (Sarmah ve ark. 2017)



Şekil 2.9. Spesifiktiklere ve kaynaklara göre lipazların sınıflandırılması (Sarmah ve ark. 2017)

2.4.1. Spesifiktliğine göre lipazların sınıflandırılması

Spesifiktlik (özellik), lipazların endüstriyel uygulamalarının tanımlanmasında önemli bir kriterdir, bunlar substrata özgü, regioselektif (bölgesel seçicilik) ve enantioselektif (enantiyo seçicilik) olmak üzere üç ana kategoriye ayrılabilir (Sarmah ve ark. 2017).

Lipazların doğal substratları gliserol esterlerdir. Bu enzimler triaçilgliseroller (TAG) dışında, aynı zamanda diaçilgliserollerin ve monoaçilgliserollerin hidrolizini de katalize etmektedirler. Ayrıca fosfolipazlar fosfolipitlerin hidrolizini katalize edebilmektedirler.

Substat spesifikliği lipazın bir tip gliserol esteri spesifik olarak hidrolize etme kabiliyeti ile belirlenmektedir (Villeneuve 2003).

Substrat spesifik lipazlar reaksiyonlarda etkili bir şekilde kullanılabilmekte çünkü işlenmemiş hammaddelerin bir karışımında belirli bir substrat üzerinde seçici olarak etki ettiğinden dolayı istenen ürün sentezini kolaylaştırmaktadırlar. Bunu biyodizel üretiminde (Ribeiro ve ark. 2011) ve yüksek saflıktaki diaçilgliserol üretiminde göstermektedir (Borza ve ark. 2015). Genel olarak, substrata spesifik lipazlar tarafından etki edilebilen substratlar arasında yağ asitleri ve alkol bulunmaktadır (Kapoor ve Gupta 2012).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmalarda, çeşitli endüstriyel işlemlerde lipazların kullanılmasında enzim stabilitesi ile birlikte substrat spesifikliğinin de önemli olduğunu bildirilmiştir (Brigida ve ark. 2014).

Regioselektif lipazlar, reaksiyonları diğer yan reaksiyonlardan daha uygun bir yönde yönlendirmektedir. Lipazların bu özelliği, özellikle spesifik konfigürasyon altında optimum fonksiyon gösteren izomerik bileşiklerin üretiminde, kimyasal ve farmasötik endüstrileri için büyük önem taşımaktadır (Sarmah ve ark. 2017).

Regioselektif lipazlar ile ilgili son çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında, flavonoid türevlerini sentezlemek için *Rhizopus oryzae* lipazı kullanılarak ferulik asit ile quercetin açılması (Kumar ve ark. 2016), 3'-OH-5'-O-Athymidine üretmek için *C. rugosa* lipaz kullanılarak per-O-asetillenmiş timidin'in koruyucu grubun uzaklaştırılması (Rivero ve Palomo 2016), *C. antarctica* lipazı (Novozym 435) ve *Burkholderia cepacia* lipazı (Amano PS-IM) kullanılarak akasetin ve resveratrol 3,5-di-O-beta-glukopiranositin sentezlenmesi kapsamaktadır (Hanamura ve ark. 2016).

Regioselektif lipazlar, seçici fonksiyonelliklerine göre spesifik olmayan lipazlar, 1,3 spesifik lipazlar ve yağ asidi spesifik lipazlar olmak üzere sınıflandırılabilir (Sarmah ve ark. 2017).

Spesifik olmayan lipazlar, triaçilgliserollerin yağ asitlerine ve gliserole tam hidrolizini rastgele bir şekilde katalize etmekte ve reaksiyon sonucunda monoaçilgliseroller ve diaçilgliseroller ara ürün olarak elde edilmektedir (Şekil 2.10) (Barros ve ark. 2010).

Kozmetik endüstrisinde veya biyodizel üretiminde *Mucor meihei* lipazları tarafından çok çeşitli reaksiyonların katalize edilmesi ile gösterildiği gibi spesifik olmayan lipazlar çok sağlam ve çok sayıda substrat üzerinde etkili olabilmektedirler (Ribeiro ve ark. 2011).

Yüksek saflıktaki yapılandırılmış lipitler üretmek için kanola yağının kaprilik asit ile asidoliz reaksiyonunda spesifik olmayan *C. antarctica* lipazın uygulanması üzerine bir çalışma rapor edilmiştir (Savaghebi ve ark. 2012).

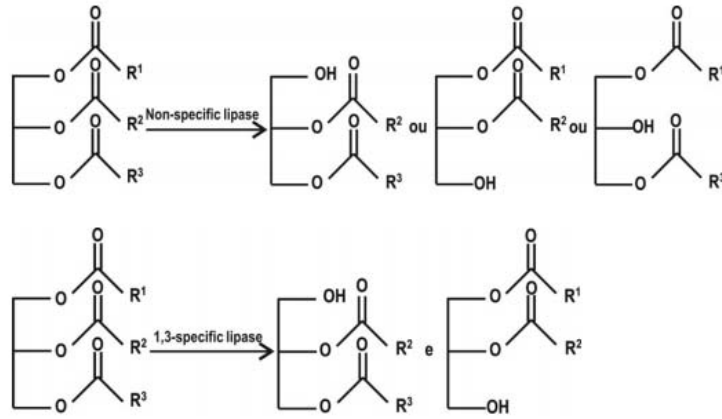
1,3 spesifik lipazlar, yağ asitleri, 2-monoaçilgliseroller ve 1,2 veya 2,3 diaçilgliseroller üreten C1 ve C3 pozisyonlarında triaçilgliserollerin hidrolizini katalize etmektedirler. Son iki bileşiğin (2-monoaçilgliseroller ve 1,2 veya 2,3 diaçilgliseroller) kararsızlığı nedeniyle, 1,3 diaçilgliserol ve 1- veya 3-monoaçilgliserol oluşumuna yol açan açıl transferi meydana gelmektedir (Barros ve ark. 2010). Triaçilgliserollerden monoaçilgliserollere kıyasla diaçilgliserol oluşumu çok daha hızlıdır (Ribeiro ve ark. 2011). *Carica papayalatex*'den elde edilen 1,3 spesifik lipaz kullanılarak spesifik konformasyona sahip ürünler üretilebilmektedir (Rivera ve ark. 2017).

Son zamanlarda, uzun zincirli yağ asitlerini sentezlemek için ceviz yağının kaprilik asit ile asidolizinde *Rhizomucor miehei* (Lipozim) ve *R. delemar* (PPRhDL) 1,3 spesifik immobilize lipazları kullanılmıştır (Todorova ve ark. 2015). Ayrıca biyodizel üretimi için *Pichia pastoris*'te eksprese edilen 1,3 spesifik immobilize *R. oryzae* lipazı kullanılmıştır (Clementz ve ark. 2016).

Yağ asidi spesifik lipazlar, belirli bir tip yağ asidi veya belirli bir grup yağ asidi için spesifik olabilmektedirler. Herhangi bir triaçilgliserol pozisyonunda bulunan yağ asidi esterlerini hidrolize etmektedirler (Barros ve ark. 2010). Yağ asidi spesifik lipazlar ile ilgili yapılan çalışmalarda, farklı karbon zincir uzunlukları, doygunluk derecesi ve farklı yan zincirlere sahip olan farklı substratlara karşı yağ asidi spesifikliğini gösteren birkaç lipaz tanımlanmıştır (Sarmah ve ark. 2017). *Penicillium citrinum* S3, *A. Niger* MJ1, *A. Oryzae* MJ2, *Bacillus* YM, *Geotrichum candidum* S9 ve *C. Lyolytica* S11 suşlarından elde edilen lipazların kısa zincirli esterlere en güçlü spesifikliği gösterdiğini bulunmuş, diğer lipazlar ise orta veya uzun zincirli ve dallı esterler üzerinde güçlü seçicilik göstermiştir (Song ve ark. 2008).

Enantiyoselektif lipazlar prokiral öncüllerinden diğerinden spesifik olarak bir rasematın izomerlerinden birini hidrolize etmektedirler. Bu lipazlar, rasemik bir karışımdaki enantiomerleri ayırt edebilmektedirler (Barros ve ark. 2010). Lipazların enantio spesifiklikleri substrata göre değişebilmekte ve bu varyasyon esterin kimyasal özelliklerine bağlanmaktadır (Castro ve ark. 2000).

Enatiospesifik lipaz katalizli işlemlerin arasında, sekonder alkollerin farmasötik ürünlere transesterifikasyonu (Borza ve ark. 2015), kozmetik/gıda ürünleri için mentol benzoatın hidrolizi (Dhake ve ark. 2013) ve tıbbi/sağlık bakım ürünleri için glisidik asit metil esterinin hidrolizini yer almaktadır (Su ve ark. 2014).



Şekil 2.10. Spesifik olmayan lipaz ve 1,3 spesifik lipaz tarafından katalize edilen reaksiyonlar (Paques ve Marcedo 2006)

2.4.2. Kaynaklarına göre lipazların sınıflandırılması

Lipazlar yaygın olarak bitkiler, hayvanlar, böcekler ve mikrobiyal organizmalar tarafından üretilmektedir (Patil ve ark. 2011, Ray 2012, Maldonado ve ark. 2014).

Çeşitli lipaz kaynakları arasından muazzam endüstriyel potansiyellerine sahip, kolay üretilmesi ve pek çok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizlemesinden dolayı en fazla kullanım bulan ise mikrobiyal kaynaklı lipazlardır (Patil ve ark. 2011).

Bitkisel lipazların oluşumu ve lipid biyotransformasyonları için biyokatalizörler olarak potansiyelleri Huang (1984) ve Mukherjee (1995) tarafından yapılan çalışmalarda ayrıntılı olarak rapor edilmiştir. Lipazlar, tohum veya fasulye, meyve, lateks, yapraklar

ve kepek gibi bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilebilmektedir. Bitki lipazlarının hint fasulyesi, afrika fasulyesi, karaağaç, ayçiçeği, fizik fındık, lupin, keten tohumu, hindistan cevizi, badem, siyah kimyon, buğday tanesi, pirinç, mısır, yulaf, arpa, susam, sorgum olmak üzere çoğunluğu tohum kaynaklarından elde edilebilmektedir. Yüksek konsantrasyonda triaçilgliserol içerdikleri ve dolayısıyla bitkilerin büyümesi için enerji kaynağı olduklarından dolayı tohumlarda diğer kaynaklardan daha yüksek lipaz aktivitesi görülmektedir (Sarmah ve ark. 2017).

Çoğu durumda, lipaz aktivitesi çimlenmemiş tohumda bulunmamaktadır (Villeneuve 2003). Bitki tohumlarında çimlenme sırasında triaçilgliseroller lipazın etkisiyle çözünerek şekere dönüştürmektedir (Patil ve ark. 2011). Yağlı tohum lipazları genellikle kendi bitki tohumlarının yağ asitlerine karşı tiposeçiciliği göstermektedir. Örnek olarak vernolik aside spesifik olduğu gösteren *Vernonia galamensis* lipazı (Ncube ve ark. 1995) veya *Cuphea*'dan lipazı kaprik aside spesifik olduğu gösterilmektedir (Hellyer ve ark. 1999).

Birçok farklı yağ bitkisi, çeşitli lipolitik aktivitelere sahip lipazlar içermekte ve yulaf, kolza tohumu veya hint fasulyesi en çok araştırıldığını bulunmaktadır. Hint fasulyesi lipazın durgun tohumlarda aktif olduğunu göstermektedir. Bu lipaz lipid cisimlerin zarında bulunmakta ve optimum pH 4.1 ile asidik koşullar altında aktiftir. Yapılan bir çalışmada, bu lipaz, hint fasulyesi yağının yaklaşık %90'ını oluşturan risinoleik asidin hidrolizini tercih ettiği ve regioselektif özelliğine sahip olmadığı göstermiştir (Lin ve ark. 1986).

Bitkisel lipazların çoğu, bitkisel yağların hidrolizi (Salaberria ve ark. 2017), tohum ve yağ işleme (Lampi ve ark. 2015, Zin ve ark. 2017), yapılandırılmış yağ üretimi (da Silva ve ark. 2017), içecek üretimi (Moreau ve ark. 2016), farmasötik sentezi ve terapötik olarak önemli bileşiklerde uygulamalarında bulunmaktadır (Hamden ve ark. 2017). Meyve kaynakları dikkate alındığında, palmiye meyvesinin mezokarp kısmından elde edilen lipaz enzimin çeşitli farmasötik, deterjan, gıda ve kozmetik ürünleri imalatında etkili olduğu bildirilmektedir (Suwanno ve ark. 2017).

Mikrobiyal kaynaklı lipazlarla karşılaştırıldığında, bugüne kadar, yapılandırılmış yağların üretimi için bitkisel lipazlarının kullanımı fazla gelişmemiştir. Bununla birlikte,

bitkisel enzimleri, bazı durumlarda, mevcudiyetleri, daha düşük maliyetleri, belirgin saflaştırma kolaylıkları ve özel tiposeçicilikleri nedeniyle hayvan ya da mikrobiyal enzimlere göre birkaç avantaja sahip olabilmektedir (Villeneuve 2003).

Hayvan hücrelerin yağların ve lipitlerin sindirimini sağlayan lipaz enzimi sentezlemesini görülmektedir (Patil ve ark. 2011). Kültür işleme ve ürün ayrımı gibi karmaşık faktörler nedeniyle hayvan lipazları ticari üretimden daha klinik teşhisler için kullanılmaktadır. Bitkisel ve mikrobiyal lipazlarla karşılaştırıldığında, bu lipazlar üzerinde daha az araştırma yapılmıştır (Sarmah ve ark. 2017).

İnsan pankreas, domuz pankreas, *Dasyatis pastinaca*, kobay pankreas (Borrelli ve Trono 2015), insan mide hücreleri, *Cyprinion macrostomus*, tavuk yağ hücreleri, akrep (Patil ve ark. 2011), gökkuşuğu alabalığı (Kittilson ve ark. 2011), levrek karaciğeri gibi hayvansal kaynaklardan çeşitli çalışmalarda lipaz elde edilemektedir (Sae-leaw ve Benjakul 2018).

Çeşitli hayvansal lipazlar arasında, pankreatik lipaz, birincil alkol esterlerin hidrolizini etkili bir şekilde katalize ettiğinden dolayı lipit kimyası ve biyokimya alanlarındaki araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Pahoja ve Sethar 2002). Ayrıca, denizyıldızlarından elde edilen lipazların, gıda işleme endüstrilerinde kullanılan domuz pankreas lipazları için bir alternatif olduğunu bulunmaktadır (Sarmah ve ark. 2017).

Lipazlar böcek dokularından da elde edilebilmektedir. Bu lipaz, böceklerin larva evresinin gelişiminde rol oynadığı ve bağırsaklarında bulunduğu belirtilmiştir (Sakate ve Salunkhe 2013, Rong ve ark. 2014). Bununla birlikte, yapılan son çalışmalarda, diaçilgliserollere karşı aktif lipazların, birçok böceğin uçuş kaslarında ve sindirim kanalı hariç tüm vücut dokusunda gözlendiğini bildirilmiştir (Pahoja ve Sethar 2002).

Birçok mikroorganizmalar arasında bakteri, maya ve mantarlar, potansiyel ekstraselüler lipaz üreticileri olarak bildirilmektedir (Abada 2008). Mikrobiyal lipazlar stabiliteyi, seçicilikleri ve geniş substrat spesifikliğini nedeniyle endüstriyel uygulamalar için daha çekici görünmektedir (Dutra ve ark. 2008, Griebeler ve ark. 2009).

Mikrobiyal lipazın özel spesifikliğini, biyoteknolojik uygulamalar için güçlü bir araç haline getirmektedir. Üretimleri, sıcaklık, pH ve çözülmüş oksijen gibi fizikokimyasal

faktörlerin yanı sıra ortam kompozisyonundan da büyük ölçüde etkilenmektedir (Thakur 2012).

Ayrıca, yapılan son çalışmalarda, mikrobiyal lipazların tarımsal atık (Zubiolo ve ark. 2015) ve süt atığının fermantasyonu yoluyla elde edilebildiğini belirtilmiş ve burada çevre koruması için katkıda bulunmakta ve gelecekteki biyo-katalitik uygulamalar için de kullanılabilir (Marques ve ark. 2014).

Mikrobiyal lipazlar arasında, mantar lipazları, termal ve pH stabilitesi, substrat spesifikliğini, düşük ekstraksiyon maliyeti ve organik çözücülerdeki etkin aktiviteleri gibi benzersiz özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Patil ve ark. 2011). Mantar lipazlar ortamın karbon ve azot bileşimine bağlı olarak hem ekstrasellüler hem de intrasellüler olmaktadır (Sharma ve ark. 2011). Bu lipazlar hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon, deasetilasyon, alkoliz, asidoliz, saponifikasyon, etanoliz, hidrolitik kinetik çözünürlük gibi çok çeşitli reaksiyonlar katalize edebilmektedir (Sarmah ve ark. 2017).

Mantarlar arasında *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. ve *Rhizomucor* sp. gibi ticari olarak en önemli lipaz üreten mantarlardır (Treichel ve ark. 2010). Ayrıca *Geotrichum*, *Beauveria*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Eurotrium* ve *Ophiostoma* olmak üzere başka cinsler de önemlidir (Singh ve Mukhopadhyay 2012).

Mantar lipazların üretimi katı hal fermantasyonunda, batık fermantasyona kıyasla genellikle daha fazla verimlilik göstermektedirler (Ramos-Sanchez ve ark. 2015).

Ozturkoglu-Budak ve ark. (2016) tarafından Divle obruk peynirinden izole edilen çeşitli mantar suşlarından en iyi lipaz üreticisi olan *M. racemosus* suşu bulunmuş ve bu suş peynir endüstrisinde potansiyel uygulamaya sahip olduğunu bildirilmiştir.

Ayrıca, Fleuri ve ark. (2014) çeşitli mantar suşlarını taramışlar ve lipaz üretim aktivitelerini buğday kepeği, soya kepeği ve şeker kamışı küspesi olmak üzere farklı substratlarla incelemişlerdir. Vaquero ve ark. (2015) *A. niger*, *Nectria haematococca* ve *Trichoderma reesei* gibi mantar kaynaklarından üretilen lipazların klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu üzerinde çalışmışlar ve katalitik aktivitelerini

karşılaştırmışlardır. Khasanov ve ark. (2015) *Oospora lactis*, *Penicillium* sp. ve *R. microsporus*'tan üretilen mantar lipazlarının katalitik aktivitesi üzerine bir çalışma rapor etmişlerdir.

Maya lipazları, benzersiz özellikleri ve kültür kolaylıkları olduğundan dolayı farmasötik, kimyasal, biyodizel gibi birçok endüstriyel alanlarda çok önemli bir lipaz kaynağı oluşturmaktadır (Sarmah ve ark. 2017).

Candida rugosa, *Candida tropicalis*, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida parapsilopsis*, *Candida deformans*, *Candida curvata*, *Candida valida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula pilimornae*, *Pichia bispora*, *Pichia mexicana*, *Pichia sivicola*, *Pichia xylosa*, *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis crataegensis*, *Torulasporea globosa* ve *Trichosporon asteroidleri* olmak üzere çeşitli karasal maya türlerinin lipaz üretebildiğini belirlenmektedir (Vakhlu ve Kour 2006). Bunlardan önemli lipaz üreticileri olan *C. antarctica*, *C. rugosa*, *C. utilis* ve *Saccharomyces* türleri, geniş reaksiyonları katalize eden lipazlar ürettiğinden dolayı çeşitli endüstriyel alanlarda uygulama bulmaktadır (Sarmah ve ark. 2017).

C. rugosa'dan elde edilen lipazlar, organik bir çözücü ilave edilerek konjuge linoleik asit l-metil esterin hidrolizi (Kobayashi ve ark. 2012), palmiye yağının metanol ve etanol ile transesterifikasyonu (Moreno-Pirajan ve ark. 2011), mentol benzoatın enantiyoselektif hidrolizi gibi çeşitli reaksiyonların katalizinde en önemli biyokatalizörler olduğu bildirilmektedir (Dhake ve ark. 2013). *C. antarctica*'dan elde edilen lipaz enzimi değerli yağ asitlerinin sentezi (Santos ve ark. 2015), *Simarouba glauca* yağının transesterifikasyonu ile biyodizel üretimi (Garlapati ve ark. 2013), asilasyon ve alkoliz ile farmasötik ürünlerin üretimi (Baldessari ve Iglesias 2012), tereyağ konjuge linoleik asit ile asidoliz yoluyla kozmetik ve deterjan ürünlerinin sentezi (Garcia ve ark. 2001) ve açıl gliserollerin asidolizi için etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Senanayake ve Shahidi 2002). Ayrıca *Rhodotorula mucilaginosa* lipazları palmiye yağının esterleştirilmesi (Nuylert ve Hongpattarakere 2013), *T. lanuginosus* lipazları soya fasulyesi yağının hidroesterifikasyonu (Cavalcanti-Oliveira ve ark. 2011) ve kolza tohumu yağının transesterifikasyonu gibi biyodizel üretiminde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Price ve ark. 2014).

Bakteriyel lipazlar ekstrasellüler, intrasellüler veya zara bağlı olabilmektedir. Bu lipazların çoğu glikoproteinlerdir, ancak bazı ekstrasellüler olanlar lipoproteinlerdir. Bakteriyel lipazlar çoğu substrat spesifik olmayan ve termostabil olduğu bildirilmektedir (Dhake ve ark. 2013).

Ekstrasellüler bakteriyel lipazlar, toplu üretimleri çok daha kolay olduğu için önemli ticari öneme sahiptir. Lipaz üreten bakteri kaynağı fazla mevcut olmasına rağmen, sadece birkaç tanesi yabancı veya rekombinant suşlar halinde ticari olarak kullanılmaktadır (Jaeger ve ark. 1994, Palekar ve ark. 2000). Bunlardan *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* ve *Pseudomonas* cinsleri önemli bakteriyel lipaz kaynaklarıdır (Gupta ve ark. 2004) (Çizelge 2.1).

Son yapılan çalışmalarda, *B. licheniformis* ekstrasellüler lipazları (Rashid ve ark. 2013) ve tabakhane sularından izole edilen *B. pumilus* lipazları gibi bakteriyel lipazlar çoğu termofilik olduğu ve endüstriyel uygulama için ümit verici biyokatalizör olduğu tespit edilmiştir (Laachari ve ark. 2015). *Serratia marcescens* N3 lipazı, farklı çeşitlerde yemeklik yağları hidrolize etmek için kullanılmakta ve susam yağı ile maksimum aktivite gösterdiğini belirlenmiştir. Fasiyel sebasöz deriden izole edilen *Staphylococcal* lipazları kozmetik, tıbbi, gıda veya deterjan endüstrilerinde biyokatalizör olarak uygulamalarını bulmaktadırlar (Xie ve ark. 2012).

Geobacillus thermodenitrificans AV-5 lipazı (Christopher ve ark. 2015), *Pseudomonas fluorescens* lipazı (Salis ve ark. 2009) ve *Staphylococcus haemolyticus* L62 lipazı biyodizel üretiminde potansiyel uygulama gösteren bakteriyel lipazlardır (Jo ve ark. 2014).

Mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu yüksek su aktivitesi nedeniyle genellikle bakteriyel lipaz üretimi batık kültür fermentasyonunda daha verimlidir. Ancak katı hal fermentasyonunda üretilen bakteriler için birkaç istisna vardır. Ayrıca bakteriler bu katı ortama iyice uyum sağladığında da üretim normalde yüksek olmaktadır (Treichel ve ark. 2010).

Çizelge 2.1. Bakteri kaynaklı lipazlar

Bakteriyel Kaynak	Kaynakça	Bakteriyel Kaynak	Kaynakça
<i>Acinetobacter</i> EH28	Ahmed ve ark. (2010)	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	Kapoor ve Gupta (2012)
<i>Acinetobacter</i> XMZ-26	Zheng ve ark. (2011)	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	Christopher ve ark. (2015)
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Uttatree ve ark. (2010)	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	Abol-Fotouh ve ark. (2016)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Cherif ve ark. (2011)	<i>Geobacillus zalihae</i>	Lee ve ark. (2015)
<i>Aeribacillus</i> 096201	Lokre and Kadam (2015)	<i>Janibacter</i> sp.	Castilla ve ark. (2017)
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	Mandepudi ve ark. (2013)	<i>Lactococcus chungangensis</i>	Konkit ve ark. (2016)
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	Masomian ve ark. (2016)	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	Tambekar ve Dhandale (2012)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Saengsanga ve ark. (2016)	<i>Microbacterium luteolum</i>	Tripathi ve ark. (2014)
<i>Bacillus aerius</i>	Saun ve ark. (2014)	<i>Micrococcus luteus</i>	Akbar ve ark. (2014)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> ve <i>Bacillus licheniformis</i>	Ashfaq (2015)	<i>Pelosinus fermentans</i>	Biundo ve ark. (2016)

Çizelge 2.2. Bakteri kaynaklı lipazlar (devam)

<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	Khoramnia ve ark. (2011)	<i>Pseudoalteromonas</i> N J 70	Wang ve ark. (2012)
<i>Bacillus</i> DH4	Bora ve Kalita (2008)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mobarak-Qamsari ve ark. (2011)
<i>Bacillus cereus</i>	Akanbi ve ark. (2010), Ananthi ve ark. (2014)	<i>Pseudomonas SPSU B3</i>	Mandepudi ve ark. (2013)
<i>Bacillus DOD9</i>	Mahale ve ark. (2015)	<i>Pseudomonas ADT3</i>	Dey ve ark. (2015)
<i>Bacillus J33</i> ve <i>Bacillus A30-1</i>	Tripathi ve ark. (2014)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bisht ve ark. (2012)
<i>Bacillus pumilus</i>	Faouzi ve ark. (2015)	<i>Pseudomonas putida</i>	Ananthi ve ark. (2014)
<i>Bacillus smithii</i>	Chandrasekaran (2013)	<i>Pseudomonas BUP6</i>	Priji ve ark. (2015)
<i>Bacillus sonorensis</i>	Nerurkar ve ark. (2013)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Zheng ve ark. (2012)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Joseph ve Ramteke (2013)	<i>Pseudomonas fluorescence</i>	Kumar ve ark. (2012b), Kumar ve ark. (2012c)

Çizelge 2.3. Bakteri kaynaklı lipazlar (devam)

<i>Bacillus stratosphericus</i>	Gricajeva ve ark. (2016)	<i>Pseudomonas gessardii</i>	Ramani ve ark. (2010), Veerapagu ve ark. (2013)
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	Tripathi ve ark. (2014)	<i>Pseudomonas luteola</i>	Ribeiro ve ark. (2011)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Liu ve ark. (2011)	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Khoramnia ve ark. (2011)
<i>Burkholderia multivorans</i>	Treichel ve ark. (2010)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Thakur ve ark. (2014)
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Ooi ve ark. (2011)	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	Novototskaya-Vlasova ve ark. (2013)
<i>Burkholderia ubonensis</i>	Yang ve ark. (2016)	<i>Ralstonia</i>	Yoo ve ark. (2011)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Bajaj ve ark. (2010)	<i>Staphylococcus</i>	Kumar ve Singh (2012)
<i>Colwellia psychrerythraea</i>	Do ve ark. (2013), Maiangwa ve ark. (2015)	<i>Staphylococcus Lp12</i>	Pogaku ve ark. (2010)
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	Maiangwa ve ark. (2015)	<i>Staphylococcus sp.</i>	Daoud ve ark. (2013)
<i>Enterobacter Bn12</i>	Farrokh ve ark. (2014)	<i>Staphylococcus warneri</i>	Yele ve Desai (2015)

Çizelge 2.4. Bakteri kaynaklı lipazlar (devam)

<i>Enterococcus durans</i>	Ramakrishnan ve ark. (2012), Salihu ve Alam (2015)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Li ve ark. (2016)
<i>Enterococcus faecium</i>	Ramakrishnan ve ark. (2016)	<i>Streptomyces lividans</i>	Wang ve ark. (2016)
<i>Geobacillus EPT9</i>	Zhu ve ark. (2015)	<i>Thalassospira permensis</i>	Kai ve Peisheng (2016)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Dror ve ark. (2015)	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Mo ve ark. (2016)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Ekinci ve ark. (2015)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ji ve ark. (2015)

2.5. Lipaz - Katalizli Reaksiyonların Endüstriyel

Küresel enzim pazarı 2019 yılında 10,0 milyar ABD doları olarak değerlendirilmiş ve 2025'ten 14,7 milyar ABD doları olacağı tahmin edilmektedir ve enzim pazarının 2019 ile 2025 yılları arasında %6,7'lik bir CAGR (The compound annual growth rate: Bileşik yıllık büyüme oranı)'da büyüyeceği düşünülmektedir. Enzim mühendisliğin ve diğer teknolojilerin gelişmeleri, enzim pazarının büyümesine yol açmaktadır. Ayrıca enzimlerin endüstriyel alanlarda çeşitli işlevsel yararları ve kimyasalların tüketiminin azalması gibi faktörler, küresel enzim pazarının büyümesine katkıda bulunmaktadır. (Anonim 2020a).

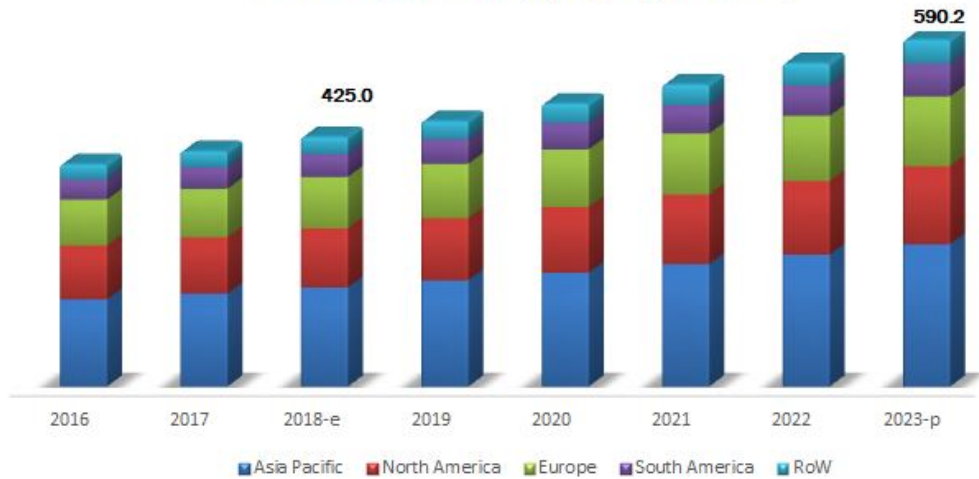
Endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin %75'ini hidrolazlar oluşturmaktadır (Godfrey ve West 1996). Endüstriyel enzimler pazarı karbohidrazlar (amilazlar, glukanaazlar, sellülazlar, diğer karbohidrazlar), proteazlar (tripsinler (API ve API olmayan), diğer proteazlar), lipazlar ve diğer enzimler şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Karbohidrazlar en büyük pazar payına sahiptir, arkasından proteaz ve lipaz gelmektedir (Anonim 2020b).

Küresel lipaz pazarın 2026 yılında 1000,0 milyon ABD dolarına ulaşacağı (Anonim 2020c) ve 2020 ile 2025 yılları arasında % 8.8'lik bir CAGR'ye ulaşacağı beklenmektedir (Anonim 2020d).

Küresel lipaz pazarında faaliyet gösteren şirketler arasında Novozymes (Danimarka), DSM (Hollanda), Chr. Hansen (Danimarka), Amano Enzimler (Japonya), Associated British Foods (İngiltere), DowDuPont (ABD), Advanced Enzymes (Hindistan), Enzyme Development Corporation (ABD), Aumgene Biosciences (Hindistan), Biocatalysts (İngiltere), Meito Sangyo Co., Ltd (Japonya) ve Creative Enzymes (ABD) kapsamaktadır (Anonim 2020g).

Kaynak tipine göre mikrobiyal lipaz pazarının 2023 yılına kadar 590,2 milyon ABD dolarına ulaşacağı ve 2018 ile 2020 yılları arasında % 6,8'lik bir CAGR değerinde büyüyeceği tahmin edilmektedir (Şekil 2.11). Lipaz enzimi endüstriyel boyutta en çok Asya Pasifik, Kuzey Amerika, Avrupa, Güney Amerika, ve dünyanın geri kalanında (Rest of the World, RoW) üretilmektedir (Anonim 2020g).



Şekil 2.11. Mikrobiyal lipaz pazarının yıllara ve bölgelere göre artışı (Anonim 2020e)

2.5.1. Deterjanlar

Deterjan üretiminde enzimlerin kullanılması, deterjanların sert lekeleri çıkarma kabiliyetini arttırmaktadır. Günümüzde lipazlar, selülozlar, proteazlar, ve amilazlar kombinasyon halinde birçok çamaşır deterjanı ürününde bulunmaktadır (Jeon ve ark. 2009). Bu karışım enzimler, nişastayı, pamuk tüylerini ve proteinleri parçalayabildikleri için deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadır (Sharma ve ark. 2016). Enzimler ayrıca biyolojik olarak parçalanabilmesi olduklarından deterjanın çevresel yükünü azaltarak zararlı kalıntı bırakmamaktalar, kanalizasyon arıtma prosesleri üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur ve sucul yaşam için bir risk oluşturmamaktadır (Andualema ve Gessesse 2012).

Lipazlar, deterjanların formülasyonunda önemli bir fonksiyonel bileşik oluşturmakta ve üretilen toplam lipazların yaklaşık %32'si deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır (Barros ve ark. 2010).

Deterjan endüstrilerinde lipazların uygulanması hızla artmakta ve termofilik (30-60°C), alkalofilik (pH 10-11), suda çözünür, çeşitli kompozisyonlardaki yağları hidrolize etmek için düşük substrat spesifikliğini gibi özelliklerine sahip ve ayrıca deterjan proteazlarına ve diğer yüzey aktif maddelere (sümfaktanlar) toleranslı olan lipazın sıvı deterjanlarda ve yıkama tozlarında kullanıma uygun olduğu bulunmuştur (Chauhan ve ark. 2013, Sharma ve ark. 2016).

Bazı spesifik lipazlar, ruj, kızartmış yağlar, tereyağı, soslar gibi yağlı lekeleri çıkarabilmektedir (Jaeger ve Reetz 1998). Lipaz kumaş yüzeyine adsorbe olabilmekte ve kumaş üzerine emilen lipaz, yağ lekesinin çıkarılması için bir kumaş-lipaz kompleksi oluşturmaktadır. Lipaz, bir yağ lekesinden önce veya sonra kumaş üzerine emilebilmekte ve lipaz kuru kumaş ya da çamaşır yıkama çözeltilerinde bulunan kumaş üzerindeki bir yağ lekesini hidrolize etmek için aktiftir. Emilen lipaz, yüzey aktif maddeleri tarafından denatürasyona ve ısı deaktivasyonuna karşı stabiliteye sahiptir, yıkama sırasında kumaştan çıkarılmaya karşı dayanıklıdır. Ayrıca lipaz, kumaşı yüksek sıcaklıkta kurutduktan sonra önemli aktiviteyi korumakta ve kumaş depolama veya aşınma sırasında aktiviteyi de korumaktadır. Kumaşın yıkanması sırasında yağ hidrolizin yan ürünlerinin lipaz tarafından yeniden çıkarılmaktadır (Anonim 2004).

Deterjanların formülasyonunda aktif soğuk lipazın kullanılması, enerji tüketimi ve tekstil lifleri aşınması ve yıpranması azaltarak soğuk yıkama için büyük avantaj sağlamaktadır (Feller ve Gerday 2003). Sıvı deri temizleyici olarak ve beyazlatıcı bileşiminde bir bileşen olarak soğuk aktif lipazın kullanıldığı rapor edilmiştir (Nakamura ve Nasu 1990). Benzer bir şekilde kuru temizleme çözücülerinde lipit kirleticilerin ayrışması (Abo 1990), egzoz boruları ve klozetler yüzeyindeki organik atıkların parçalanması (Moriguchi ve ark. 1990) ve kontakt lens temizliği için lipaz kullanıldığı bildirilmiştir (Bhatia 1990).

İlk rekombinant lipaz olan "Lipolaz", ticari kullanım için 1994 yılında Novo Nordisk (Danimarka) tarafından geliştirilmiştir. Burada lipaz üretimi için gereken genler *Thermomyces lanuginosus* mantarından izole edilmiş ve *Aspergillus oryzae* içinde klonlanmış ve ifade edilmiştir. Benzer bir şekilde, Genenco (ABD) tarafından ticari kullanım amacıyla *Pseudomonas* spp. suşundan elde edilen bir rekombinant lipaz olan "Lumafast" da geliştirilmiştir. Bugünlerde bu ticari enzimlerin deterjan lipazları olarak en çok kullanıldığı bildirilmektedir (Sharma ve ark. 2016). Bununla birlikte, piyasadaki başka en önemli lipaz *Humicola lanuginosa*'dan elde edilmektedir. *Humicola* genini *Aspergillus oryzae*'ye klonladıktan sonra büyük ölçekte üretilmektedir. *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes*'den izole edilmiş lipazlar deterjan endüstrisinde de kullanılmaktadır. *Acinetobacter radioresistens* tarafından üretilen alkalik lipazın optimum pH'sı 10'dur ve 6-10'luk bir pH aralığında stabildir, bu nedenle deterjan endüstrisindeki uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptir (Chen ve ark. 1998). Benzer çalışmalarda, pasifik beyaz karides hepatit pankreasından izole edilen lipaz enzimi hem katı hem de sıvı çamaşır deterjanlarına karşı önemli bir uyumluluk ve stabil olduğunu göstermiştir (Kuepethkaew ve ark. 2017). Ayrıca, bazı lipazların geniş bir pH aralığında (7.0-12.0 pH) aktif olduğunu ve 9.0 pH'da en yüksek aktivite gösterdiğini bildirilmiştir (Ji ve ark. 2015).

Deterjan endüstrisinde kullanılan başka yaygın lipaz kaynaklarından bazıları *Staphylococcus arlettae*, *Burkholderia cepacia*, *P. fluorescens* ve *Candida* türlerini kapsamaktadır (Ahmed ve ark. 2010, Phuah ve ark. 2015, Su ve ark. 2015). Ayrıca *Talaromyces thermophilus*, *P. aeruginosa* ve birçok mikroorganizmadan elde edilen

lipazların deterjan endüstrisindeki kullanım potansiyellerini araştırılmıştır (Kanjanavas ve ark. 2010).

Genel olarak, ticari deterjanlardaki şelatlama ajanları enzimin inaktivasyonuna yol açmakta, ancak *B. licheniformis* lipazın uygulamasında enzim-deterjan kompleksine kalsiyum klorür ilavesi, aktivitenin geri kazanılmasına yardımcı olmuştur (Romdhane ve ark. 2010). Benzer şekilde, anyonik sürfaktanlar üzerine yapılan son çalışmalardan birinde, lipazın stabilitesinin ve aktivitesinin, iki etilen oksit birimi ile sodyum loril eter sülfat varlığında korunduğu rapor edilmiştir (Magalhaes ve ark. 2016).

2.5.2. Gıda endüstrisi

Bir triaçilgliserolün beslenme değerleri ve fiziksel özellikleri, yağ asitlerinin gliserol omurgasındaki konumu, yağ asitlerinin zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi gibi faktörlerden büyük ölçüde etkilenmektedir. Lipaz enzim ile gliserol içindeki yağ asitlerinin yerini ve bir veya daha fazla yağ asidinin yeni yağ asitlerle değiştirerek lipitlerin özelliklerini geliştirilebilmektedir (Pabai ve ark. 1995, Undurraga ve ark. 2001).

Regiospesifik ve yağ asitlerine spesifik mikrobiyal lipazlar büyük önem taşımakta ve endüstriyel bitkisel yağlar için kullanılabilir. Ucuz yağlar ayrıca geliştirilerek besin açısından önemli yapılandırılmış triaçilgliseroller, düşük kalorili triaçilgliseroller ve oleik asitle zenginleştirilmiş yağlar sentezlemek için kullanılmaktadır. Lipaz ile modifikasyonlar, yağ endüstrisinde yapılandırılmış lipitlerin üretimi için oldukça önemlidir, çünkü enzimatik modifikasyonlar spesifiktir ve normal reaksiyon koşullarında gerçekleştirilebilmektedir (Gupta ve ark. 2003).

Lipazlar ayrıca gıda endüstrisinde lezzet değiştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Burada lipaz esterifikasyon reaksiyonu katalize ederek lezzet verici ve koku bileşikleri olarak kısa zincirli yağ asitleri ve alkollerin sentezlemektedir (Macedo ve ark. 2003). Genel olarak, mikrobiyal lipazlar, yağ triaçilgliserollerin seçici olarak hidrolizi yoluyla serbest yağ asitlerinin bırakması ile süt ürünlerin (peynir, tereyağı, margarin, alkollü içecekler, sütlü çikolata ve tatlılar) lezzeti gelişimi gibi farklı

alanlarda da yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu yağ asitleri, lezzet maddeleri veya lezzet öncüleri olarak kullanılmaktadır (Andualema ve Gessesse 2012).

Lipazlar, yağsız et üretmek amacıyla et ve balık ürünlerinden yağları uzaklaştırmasında da kullanılmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer 1998). Yağ, balık etinin işlenmesi sırasında lipaz eklenerek çıkarılmakta ve bu işleme biyolipoliz denmektedir. Lipazlar ayrıca, sosis imalatının fermentasyon işleminde ve olgunlaşma sırasında serbest kalan uzun zincirli yağ asitlerindeki değişikliklerini sağlamasında önemli bir rol oynamaktadır. Eskiden beri, pirinç aromasını geliştirmek, soya sütünün aromayı iyileştirmek ve elma şarabının fermantasyonunu hızlandırmak için farklı mikrobiyal kökenli lipazlar kullanılmıştır (Seitz 1974).

Pseudomonas P38 suşundan elde edilen soğuk aktif lipaz, lezzet verici bileşik olan bütül kaprilatın n-heptanı sentezi için susuz biyotransformasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır (Tan ve ark. 1996). *C. antarctica* CAL-B, *C. cylindracea* AY30, *H. lanuginosa*, *Pseudomonas* sp. ve *Geotrichum candidum* immobilize lipazları, ayçiçek yağında lipofilik antioksidanların sentezi için fonksiyonelleştirilmiş fenollerin esterifikasyonunda kullanılmıştır (Buisman ve ark. 1998).

2.5.3. Sıvı ve katı yağ endüstrisi

Sıvı ve katı yağ endüstrisinde enzimlerin kullanımı yeni olarak uygulanmakta ve bunu hem endüstri sorunlarına hem de yeni sıvı ve katı yağlar üretmesine çeşitli çözümler sunmaktadır. Lipazlar, normal koşullar altında reaksiyonları katalize edebildiği (katı ve sıvı yağların endüstriyel hidrolizi veya yağ asidi amidlerinin üretimi) ve yüksek spesifisikliğine sahip olduğundan dolayı gıda ve endüstriyel kullanımlar için daha düşük üretim maliyetlerinde yüksek değerli kimyasallar elde etmesinde uygulanmaktadır. Çikolata üretimi için gerekli olan kakao yağı çoğu zaman yetersizdir ve fiyat büyük ölçüde yükselebilmektedir. Bununla birlikte daha ucuz yağ olan palmye yağların lipaz katalizli transesterifikasyonu yoluyla kakao yağı üretebilmektedir (Andualema ve Gessesse 2012).

Organik çözücülerde lipaz katalizli transesterifikasyon, kakao yağı ikamesi sentezi, insan sütü yağı ikamesi sentezi, farmasötik açıdan önemli poli doymamış yağ asidi

sentezi ve bitkisel yağlardan biyodizel üretimi gibi yeni bir endüstriyel uygulama ortaya çıkartmaktadır (Nakajima ve ark. 2000). Lipaz enzimin uygulamaları arasında, immobilize *Rhizomucor miehei* lipazı transesterifikasyon reaksiyonu katalize ederek palmiye yağı yapısındaki palmitik asidin stearik asit ile değiştirmesi ve tereyağın lipaz katalizli interesterifikasyonu ile uzun zincirli doymuş yağ asitlerini azaltması kapsamaktadır (Pabai ve ark. 1995).

Hayvan ve bitki lipitlerinden elde edilen polidoymamış yağ asitlerini (PUFA'lar) zenginleştirmek için lipazlar uygulanmaktadır. Serbest PUFA'lar ve bunların monoaçilgliserolü ve diaçilgliserolü daha sonra çeşitli farmasötikler (anti-enflamatuarlar, trombolitikler, vb.) üretmek için kullanılmaktadır (Jaeger ve Reetz 1998, Belarbi ve ark. 2000). Metabolik etkileri nedeniyle PUFA'lar daha fazla ilaç, nutrasötik ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Belarbi ve ark. 2000). PUFA'ların çoğu, lipit membranların ve prostaglandinlerin normal sentezi için gerekli olduğunu belirlenmiştir. Mikrobiyal lipazlar, menhaden balık yağı, ton balığı yağı ve hodan yağı gibi hayvan ve bitki lipitlerinden PUFA elde etmek için kullanılmaktadır (Andualema ve Gessesse 2012).

İmmobilize *M. miehei* lipazı, mısır yağı, ayçiçek yağı, yerfıştığı yağı, zeytinyağı ve soya fasulyesi yağı gibi omega-3 polidoymamış yağ asitleri içeren bitkisel yağların üretimi için organik cözücüde enzimatik interesterifikasyon reaksiyonlarını katalize etmesinde kullanılmaktadır. Lipazlar, önemli endüstriyel uygulamalara sahip olan yağ asitleri ve gliserol elde etmek için lipitleri hidrolizinde de kullanılmaktadır. Yağ asitleri sabun üretiminde kullanılmaktadır (Hoq 1985). Gliserol ise ilaç endüstrileri için hammadde olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Andualema ve Gessesse 2012).

2.5.4. Tekstil endüstrisi

Lipazlar, tekstil endüstrisinde, kumaş daha iyi boyanması amacıyla daha fazla emiciliğe sahip bir kumaş sağlamak için haşıl yağlarının giderilmesinde kullanılmaktadır. Lipaz kullanımı aynı zamanda denim aşınma sistemlerindeki çizgi ve çatlakların sıklığını da azaltmaktadır. Denim ve diğer pamuklu kumaşların haşıl sökülmesi için kullanılan ticari maddeler, hem alfa amilaz hem de lipaz enzimlerini içermektedir (Anonim 2000b).

Tekstil endüstrisinde, polyester yüksek dayanım, yumuşak, gerilme direnci, leke direnci, makinede yıkanabilirlik, kırışıklık direnci ve aşınma direnci gibi bazı önemli avantajlara sahiptir. Sentetik elyaflar, iplik, kumaş, tekstil, kilim ve diğer tüketici ürünlerinin üretiminde kullanılmak üzere enzimatik olarak modifiye edilmiştir (Anonim 2000a).

Patent İşbirliği Anlaşması (PCT) Yayını No. WO 97/43014 (Bayer AG), poliesteramidin enzimatik parçalanması için uygulanan sulu bir çözeltinin içeriklerinde bir esteraz, lipaz veya proteaz içerdiğini açıklamaktadır. Amano Pharmaceutical KK Yayın No. JP 5344897 A, alifatik bir polyester ile çözelti içinde çözülen ve bunun sonucunda lif dokusunun mukavemetini kaybetmeden geliştirildiği ticari bir lipaz bileşimini tanımlamaktadır. Alifatik polietilen polimerleri de *Pseudomonas* spp. suşundan elde edilen lipas ile parçalanabildiğini bildirilmektedir. PCT Yayını No. 97/33001 (Genencor International, Inc.), bir lipaz ile muamele edilerek bir polyester kumaşın ıslanabilirliğini ve emilimini arttırmasına yönelik bir yöntemi açıklamaktadır (Anonim 2000a).

2.5.5. Kozmetik

Unichem International (İspanya), cilt ve güneş kremleri ve banyo yağları gibi kişisel bakım ürünlerinde yumuşatıcı olarak kullanılmak üzere izopropil miristat, izopropil palmitat ve 2-etilheksilpalmitat üretimini başlatmıştır. Burada, *Rhizomucor meihei*'den immobilize lipaz biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Şirket, enzimin konvansiyonel asit katalizörü yerine kullanılmasının, çok daha yüksek kalitede ürünler sağladığını ve minimum arıtma süreci gerektirdiğini bildirmektedir (Hasan ve ark. 2006).

Balmumu esterleri (yağ asitleri ve yağ alkolleri esterleri) kişisel bakım ürünlerinde benzer uygulamalara sahiptir ve ayrıca enzimatik olarak üretilmektedir (Croda Universal Ltd.). Şirket, toplu bir biyoreaktörde *C. cylindracea* lipazı kullanmaktadır. Üreticiye göre, toplam üretim maliyeti konvansiyonel yönteminkinden biraz daha yüksektir, ancak son ürünün kalitesini geliştirdiği için anlaşılabilir (Hasan ve ark. 2006).

Retinoidler (A vitamini ve türevleri) cilt bakım ürünleri gibi kozmetik ve farmasötiklerde büyük ticari potansiyele sahiptir. Suda çözünür retinol türevleri, immobilize lipazın katalitik reaksiyonu ile hazırlanmıştır (Maugard ve ark. 2002). Lipazlar dalgalı saçlar hazırlamasında kullanılmıştır (Saphir 1967). Lipazlar ayrıca topikal anti-obez kremlerin bir bileşeni olarak (August 1972) veya oral uygulama olarak kullanılmıştır (Smythe 1951).

2.5.6. Deri endüstrisi

Lipazlar, deri işlenmesinde yağın uzaklaştırılması için kullanılması daha çevre dostu bir yöntemdir. Sığır derileri için, lipazlar yüzeyaktif maddelerin yerine tamamen kullanılabilir. %40'a kadar yağ içeren koyun derileri için, çözücülerin kullanımı çok yaygındır ve bunların yerine lipazlar ve yüzey aktif maddeler de kullanılabilir. Ancak yüzey aktif maddeler koyun derisi için kullanımı, genellikle fazla etkili değil ve çevreye zararlı olabilmektedir. Maps (Hindistan) şirketi, yağ gidermesi için farklı pH koşullarında çalışan bir dizi lipaz piyasaya sunmaktadır. Bunlar, Palkodegreaz, nötr ila alkalın pH koşullarında yağ giderici olan lipaz ve Palkodegreaz AL, asidik pH koşullarında yağ giderici olan lipazdır (Anonim 2005).

Yağ gidermesi, küçük hayvan derileri ve yoğun beslenen sığırların derileri gibi yağlı hammaddelerin işlenmesinde önemli bir aşamadır. Konvansiyonel yöntemler, uçucu organik bileşik (VOC) emisyonları gibi çevresel sorunlara yol açabilecek organik çözücüler ve yüzey aktif maddeler kullanımı kapsamaktadır. Lipaz enzimleri, özellikle orta derecede yağ içeriğine sahip derilerden yağ ve gresi temizleyebilmektedir. Hem alkalın hem de asit ortamlarda aktif lipazlar deri endüstrisinde yağ giderici olarak kullanımı çok önemlidir. Deri işlenmesinde lipazlar, gliserol ve serbest yağ asitlerine trigliseritin (hayvan derilerinde depolanan yağın ana formu) hidrolizini katalize etmektedir. İşlemi geliştirmek için, yağ hücresi zarlarının ve yağ bezi bileşenlerinin parçalanması amacıyla alkalın kararlı proteazlar kullanılmaktadır. Kireç giderme ve yatırma, lipazların kullanımı için en uygun işlem aşamalarıdır. Asit aktif lipazlar, pikle derinlerin işlenmesinde uygulanabilmektedir (Hasan ve ark. 2006).

Deri işlenmesinde lipaz kullanımı ana avantajları arasında daha düzgün bir renk ve daha temiz bir görünüm kapsamaktadır. Lipazlar ayrıca hidrofobik (su geçirmez) deri

üretimini geliştirmekte ve araba döşemeleri için ugulanan derinin sislemenin azaltıldığını sağlamaktadır (Hasan ve ark. 2006).

Novozyme (Danimarka), kürk ve yünün asitle işlenmesi için bir asit lipaz ve bir asit proteaz kombinasyonu olan NovoCor ABL ve NovoCor ADL, derilerin enzim ile kireçlenmesi için bir proteaz ve lipaz karışımı olan NovoLime, derilerin yağ gidermesi için bir asit lipazı olan NovoCor AD üretmektedir (Anonim 2001).

Başka uygulamada, lipazların ve proteazların karışımı, derideki saçları gevşetmekte ve çıkarmaktadır. Elde edilen son ürün, konvansiyonel yöntemler kullanılarak üretilen deri ile karşılaştırıldığında daha yüksek kalitede olduğunu bildirmiştir. *Rhizopus nodosus* lipazı, yünlü koyun derilerinden süet giysi derilerinin yağının giderilmesi için kullanılmıştır (Muthukumaran ve Dhar 1982).

2.5.7. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde her yıl çok miktarda lignoselülozik biyokütle işlenmektedir. Kağıt hamuru üretimi için teknoloji oldukça çeşitlidir ve mikrobiyal enzimlerin uygulanması için çok sayıda fırsat mevcuttur. Tarihsel olarak, enzimler kağıt endüstrisinde bazı kullanımlar bulmuş, ancak bunlar esas olarak ham nişastanın modifikasyonları gibi alanlarla sınırlanmıştır. Lipaz kullanan enzimatik zift kontrolü yöntemi, 1990'ların başından beri rutin bir işlem olarak büyük ölçekli bir kağıt yapım işleminde uygulanmıştır (Bajpai 1999).

Geri dönüşümlü kağıt üretiminde atık kağıtların mürekkep giderme işlemleri için lipaz kullanımı, hamurun kalitesini, beyazlığı ve yoğunluğu artırabilmesi, kimyasal kullanımı ve atık suyun kirlilik seviyesini azaltabilmesi, üretim cihaz ömrünü uzatabilmesi, enerji ve zaman kaybetmemesi ve kompozit maliyeti azaltabilmesi gibi birkaç adjantajlar sağlamaktadır (Hasan ve ark. 2006).

Etilen oksit-propilen oksit katkılı stearat için bir mürekkep giderme bileşime *Pseudomonas* KWI-56 lipazı ilavesi, kağıdın beyazlığını arttırmakta ve kalan mürekkep lekelerini azaltmaktadır (Fukuda ve ark. 1990).

2.5.8. Biyodizel üretimi

Fosil yakıtların sınırlı ve hızla azalan kaynakları, artan ham petrol fiyatları ve çevresel kaygılar nedeniyle bitkisel yağların alternatif yakıt olarak kullanılmasının araştırılmaktadır (Shah ve ark. 2004). Bitkisel yağdan elde edilen biyodizel yakıt, sülfür oksit üretmemekte ve kurum partikülünü petrolden mevcut olana kıyasla üçte bir kez en aza indirmektedir (Iso ve ark. 2001).

Soya fasulyesi yağının metanol ve etanol ile transesterifikasyonu için immobilize *P. cepacia* lipazı kullanılmıştır (Noureddini ve ark. 2005). Hint yağından, çözücü olarak n-heksan ve katalizörler olarak iki ticari lipaz, Novozym 435 ve Lipozim IM kullanılarak yağ asidi etil esterleri sentezlenebilmektedir (de Oliveira ve ark. 2004). Novozyme 435 ayrıca, çözücü içermeyen bir ortamda biyodizel üretimi için ham soya fasulyesi yağlarının transesterifikasyonunu katalize etmesinde de kullanılmıştır (Du ve ark. 2004).

Restoran gres yağının basit alkil ester türevleri hazırlamak için *Thermomyces lanuginosa* ve *C. antarctica*'dan immobilize lipazlar biyokatalizörler olarak kullanılmıştır (Hsu ve ark. 2002). Nijeryalı laurik yağ, palmiye çekirdeği yağı ve hindistancevizi yağının farklı alkollerle transesterifikasyonu PS30 lipazı kullanılarak yağ asitleri esterleri üretilmektedir (Abigor ve ark. 2000).

2.5.9. Atık su arıtımı

Lipazlar aktif atık ve diğer aerobik atık işlemlerinde kullanılmaktadır. Burada oksijen taşınmasına izin vermek için (biyokütlenin yaşam koşullarını korumak için) ince yağ tabakaları, havalandırılmalı tankların yüzeyinden sürekli olarak uzaklaştırılmalıdır. Bu yağlı tabakaları, *C. rugosa* lipazı gibi lipazlarla parçalanmaktadır (Bailey ve Ollis 1986).

Kesimevleri, gıda işleme endüstrisi ve deri endüstrisi gibi endüstriyel işlem birimlerinde lipit açısından zengin atık su arıtımında *P. aeruginosa* LP602 hücrelerinin ve lipazın kullanılabilirliğini bildirilmiştir (Dharmstithi ve Kuhasuntisuk 1998). Ayrıca trigliserit içeren atık su arıtma tesislerindeki yağlar, esas olarak immobilize lipaz kullanılarak hidrolize edilmektedir (Tschocke 1990).

Bakteriyel lipazlar, evsel kanalizasyon ve anaerobik çürütücülerdeki yağların parçalanması gibi çevresel sorunların çözümünde yer almaktadır (Godfrey ve Reichelt 1983).

Lipazlar ayrıca endüstriyel atık suların özellikle gıda atığının (Meng ve ark. 2015), gübrenin (Rodrigues ve ark. 2014), yünden gres yağının (Saravanan ve ark. 2014) ve petrol fabrikalarındaki atık suların arıtılmasında yaygın olarak uygulanmaktadır (Kanmani ve ark. 2015).

Bacillus subtilis, *Serratia marsescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakteri lipazları (Prasad ve Manjunath 2011) ve marine *Aspergillus awamor* lipazı, ağır lipit içeren olan atıkların temizlenmesinde kullanıldığını belirlenmiştir (Basheer ve ark. 2011).

2.5.10. Biyosensor

Biyosensörler kimyasal, biyokimyasal ve elektronik olarak sınıflandırılabilir. Lipazlar, biyokimyasal biyosensörler sınıfında yer almaktadır. Bu biyosensörler, biyolojik sinyali elektrik sinyaline dönüştüren bir dönüştürücüye bağlı bir matris üzerinde immobilize edilen enzimler veya proteinler içermektedirler (Zehani ve ark. 2015). Lipaz temelli biyosensörler klinik tanı, gıda endüstrisi, böcek ilacı ile kontaminasyon kontrolü ve ilaç endüstrilerinde triaçilgliserollerin kantitatif tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır. Burada, lipaz ile triaçilgliserolün hidrolizi sonucunda üretilen gliserol miktarının belirlenmesiyle lipit içeriğinin dolaylı olarak ölçülmektedir (Solanki ve ark. 2016).

Glikoz oksidaz ile kombinasyon halinde pH/oksijen elektrotları üzerinde immobilize edilen lipazlar, lipit biyosensörleri olarak işlev görebilmekte ve trigliserit ve kan kolesterol belirleyicileri olarak kullanılabilir (Choudhury ve Bhunia 2015). Ek olarak, mezoporöz bir silis matrisi üzerinde immobilize edilen lipaz, potansiyometrik biyosensörlerin yapımında kullanılmaktadır (Setzu ve ark. 2007).

2.5.11. Organik sentezi

Günümüzde endüstriyel olarak önemli lipazlar organik reaksiyonlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipazlar çok çeşitli regioselektif ve stereoselektif dönüşümleri katalize etmek için kullanılmakta (Berglund ve Hutt 2000, Kazlauskas 1994) ve organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların çoğu mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Enantiyopür bileşiklerinin sentezinde lipazların kullanımı Berglund ve Hutt (2000) tarafından rapor edilmiştir. *Pseudomonas* lipazları endüstride, özellikle farmasötiklerin, pestisitlerin ve insektisidlerin sentezinde temel yapı taşları olarak işlev gören kiral kimyasalların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Andualema ve Gessesse 2012).

Genellikle, lipazlar organik sentezlerdeki uygulamaları için en önemli enzim gruplarından biri haline gelmiştir. Lipazlar önemli biyolojik olarak bozunabilir bileşiklerin üretiminde biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Örnek olarak yağlayıcılar olan trimetilolpropan esterleri lipaz kullanılarak sentezlenmektedir. Lipazlar organik çözücü sistemlerindeki transesterifikasyon reaksiyonları katalize edebilmekte ve biyolojik olarak parçalanabilen poliester lipaz biyokataliziyle sentezlenebilmektedir (Bailey ve Ollis 1986).

2.5.12. Tıbbi ve farmasötik endüstrisi

Lipazlar tıp ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örnek olarak lipaz katalizli enantiyoselektif entererifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonu, farmasötik endüstrisinde seçici asilasyon ve deasilasyon reaksiyonu için büyük öneme sahiptir (Stinson 1995). Lipazlar, özel lipitler ve sindirim yardımcılarının üretimi için kullanılmaktadır (Vulfson 1994). Esterifikasyon reaksiyonu sırasında sıcaklığın değiştirilmesi enantiyomerik değerleri ve stereo tercihini büyük ölçüde değiştirmektedir. Lipazlar, farmasötik uygulamalarda emülgatörler olarak kullanılmak üzere monogliseritlerin modifikasyonunda önemli rol oynamaktadır (Sharma ve ark. 2001).

Candida rugosa'dan elde edilen lipaz, serum kolesterol seviyesini düşüren bir ilaç olan lovastatini sentezlemek için kullanılmaktadır. *S. marcescens* lipazı, diltiazem

hidroklorür sentezinde anahtar bir ara madde olan 3-fenilglisidik asit esterinin asimetrik hidrolizi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Matsumae ve ark. 1993).

2.5.13. Çay endüstrisi

Lipazlar, siyah çay imalat sanayiinde kullanılmaktadır. Siyah çay üretimi sürecinde, lipaz, membran lipitlerinin hidrolitik reaksiyonu indüklemek ve lipitin aroma gelişimindeki önemini vurgulayarak, benzersiz aroma özelliklerine sahip uçucu ürünlerin sentezine başlamaktadır. *R. miehei* tarafından salgılanan lipaz lipitlerin hidrolizini katalize ederek polidoymamış yağ asidi (PUFA) vermektedir (Latha ve Ramarethinam 1999).

2.6. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Bacillaceae ailesinde yer alan *Bacillus* cinsi, muhtemelen en eski ve en çeşitli bakteri cinsidir (Gopal ve ark. 2015). Bu bakteri cinsi oksijen varlığında dirençli endospor üretimi ile karakterize edildirler. Endosporlar genellikle oval veya bazen yuvarlak veya silindriktir ve olumsuz koşullara karşı çok dirençlidir (Holt ve ark. 1994). Morfolojik olarak *Bacillus* vejetatif hücrelerin 3-5 x 1 µm çapındadır. *Bacillus* bakterileri Gram pozitif veya Gram-değişken olmaktadır. Gram-değişken bazı *Bacillus* türleri gençken Gram pozitifdir, ancak yaşlandıkça Gram negatif değişebilmektedir (Turnbull 1996). Bu bakterinin diğer özellikleri, saprofit, aerobik veya fakültatif anaerobik, mezofilik, çubuklar halinde tek başına veya çiftler halinde olmaktadır. Bazı *Bacillus* bakterileri hareketli, fakat diğerleri değildir. Agar ortamında *Bacillus* bakterileri genellikle büyük ve düzensiz koloniler oluşturduğundan tanınması için kolaydır (Prod'hom ve Bille 2017).

Bacillus'ların ana yaşam alanları toprak olmasına rağmen birçok fizyolojik özelliğe sahip olduğundan dolayı hava, göl sedimanları, su ve yem gibi bir çok ortamda ve ayrıca termal asit suyu, tuzlu bataklıklar, kaplıcalar, subantartik toprağı ve hastalıklı arı larvaları gibi ekstrem koşullara sahip ortamlarda da yaşayabilmektedirler (Gopal ve ark. 2015).

Bugüne kadar yayınlanmış 280'den fazla türden oluşan bu cinsin sadece *B. anthracis* ve *B. cereus* hariç çoğu üyesi nonpatojenik olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, De

Jonghe ve ark. (2010) tarafından *Bacillus* cinsine yönelik bir analizlerde *B. cereus* dışındaki türlerin gıda zehirlenmesine neden olmamasına rağmen, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentus*, *B. subtilis* (Beattie ve Williams 1999), *Bacillus licheniformis* (Beattie ve Williams 1999, Lindsay ve ark. 2000), *Bacillus pumilus* (Lindsay ve ark. 2000) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (Phelps ve McKillip 2002) hücresel deneylerle ısıya dayanıksız toksinlerin üretimini ve işlevselliğini gösterdiğini rapor edilmişlerdir. Ayrıca bu analizlerde, *B. licheniformis* (Beattie ve Williams 1999, From ve ark. 2005), *B. pumilus* (Suominen ve ark. 2001), *B. amyloliquefaciens* (Mikkola ve ark. 2004), *Bacillus mojavensis* (From ve ark. 2007), *B. subtilis* (Beattie ve Williams 1999, From ve ark. 2005), *Bacillus simplex*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium* (Taylor ve ark. 2005), *B. circulans* ve *B. lentus* (Beattie ve Williams 1999) türlerin sereulide benzeyen toksinlerin sentezini de saptanmıştır.

Çok çeşitli fizyolojik özellikleri ve çok sayıda enzim, antibiyotik ve metabolit üretme kabiliyetleri nedeniyle *Bacillus* türleri birçok tıbbi, farmasötik, tarımsal ve endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır. Farklı türler vitaminler (Riboflavin, kobalamin ve inositol) ve karotenoidler gibi nutrasötikler üretmekte ve insan tüketimine yönelik çeşitli sağlık takviyelerinin sentezi için de kullanılmaktadır (Mohammed ve ark. 2014, Tanaka ve ark. 2014). Buna ek olarak, *Bacillus* sporlarının uzun bir tüketim geçmişi ve probiyotik olarak güvenli kullanımı bulunmaktadır (Elshagabee ve ark. 2017).

Bacitracin ve polimiksin, *Bacillus* türlerinden elde edilen iyi bilinen iki antibiyotiktir. Tıbbi ve farmasötik deneylerde standart olarak çeşitli *Bacillus* türleri kullanılmaktadır. Zorunlu termofil *B. stearothermophilus*'un sporları, ısı sterilizasyon prosedürlerini test etmek için kullanılır ve ısı, kimyasallar ve radyasyona dirençli olan *B. subtilis* subsp. *globigii*, alternatif sterilizasyon ve fümigasyon prosedürlerini kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri, atık ürünlerin doğal veya yapay olarak parçalanmasında önemlidir. Ayrıca *Bacillus* bakterileri de böcek patojenleri, insektisitlerin aktif bileşenleri olarak da kullanılmaktadır (Turnbull 1996).

2.6.1. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus 1 x 3-4 µm boyutundadır. Kare uçlu düz veya hafif kavisli ince basiller olarak tek başına veya kısa zincirlerde bulunmaktadır. Bu bakteriler fakültatif

anaeroblardır ve *Bacillus* cinsinin diğer üyeleri gibi koruyucu endosporlar üretebilmektedirler. Kapsüller bulunmamakta, ancak spor ve sporangial morfolojisi *B. anthracis*'inkine benzemektedir (Anonim 1997).

Bacillus cereus, peritriköz kamçı (tüm yüzeyde kamçılı) vasıtasıyla hareketli olmakta ve çevreye bağlı olarak yüzme ve oğullaşma (swarming) dahil olmak üzere iki tür motilite göstermektedirler. Ayrıca gama fajı ile oluşan lizise karşı dirençli olmaktadır. Bu bakteri türleri kanlı agar plakasında, zayıf veya kuvvetli bir β -hemolitik zonlarla düz veya hafif dışbükey, düzensiz, hafif yeşil bir renk tonu ile donuk gri koloniler olarak ve yaklaşık 2-5 mm çapında görünmektedir (Drobniewski 1993). Bazı durumda, pürüzsüz koloniler tek başına veya kaba kolonilerin ortasında gelişmektedir (Bottone ve ark. 2010). 5-50 °C arasındaki sıcaklıklarda optimum olarak büyümektedirler ve çok çeşitli çevresel koşullara uyum sağlayabilmektedirler (Drobniewski 1993).

Karbohidratlar, proteinler ve amino asitleri metabolize etmek için pozitifirler ve nitratları nitritlere indirgeyebilmektedirler. Anaerobik durumlarda, *B. cereus* fermantasyonu yoluyla enerji üretmektedir. Bu bakteri, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus thuringiensis* türleri ile grup oluşturmaktadırlar. Bu grubun özelliklerin arasında lesitinaz üretmesi ve mannitoldan asit sentezlememesi ve dolayısıyla diğer gruplardan ayırmaktadır (Fritze 2004).

Bazı *B. cereus* suşları insanlar için zararlıdır ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olmakta, ancak diğer suşlar endüstriyel alanlarda büyük çapta öneme sahiptir ve dikkatleri üzerine çeken mikroorganizmalardır (Anonim 2018).

2.6.2. *Bacillus* lipazının genel özellikleri

Arpigny ve Jaeger (1999), amino asit dizilerini ve bakteriyel lipolitik enzimlerin temel biyolojik özelliklerini karşılaştırarak sekiz aileye ayırmışlardır. Gerçek lipazlar, sekiz alt aile kapsayan I. ailede yer almaktadır (Jaeger ve Eggert 2002, Yu ve ark. 2010). Bunların arasında, *Bacillus* ve *Geobacillus* lipazları I.4 ve I.5 alt familyalarına aittir ve bu alt ailedeki lipaz enzimin yapısında korunmuş pentapeptit olan AXSXG'deki ilk glisin yerine bir alanin kalıntısı bulunduğu göstermektedir (Cho ve ark. 2000). Ayrıca,

Bacillus ve *Geobacillus*'tan, dizilerinde %90'dan fazla benzerliğe sahip termostabil lipazlar, alt familya I.5'e yerleştirilmektedir (Masomian ve ark. 2016).

Bacillus subtilis, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus licheniformis* kaynaklı lipolitik enzimler gerçek lipazların I.4 alt familyasında gruplandırılmıştır (Eggert ve ark. 2002). Bu grubun lipazları, koruyucu peptit Ala-His-Ser-Met-Gly'ye ve nispeten düşük molekül ağırlığına (yaklaşık 19-20 kDa) sahiptir. *B. subtilis*'ten lipaz A'nın X-ışını yapısı, proteinin genel konformasyonunun göstermiştir. Burada katalitik triad kalıntıları, Ser77, Asp133 ve His156 ve oksianyon deliğini oluşturan kalıntılar (Ile12 ve Met78'in omurga amid grupları), bilinen yapıya sahip diğer lipazlarınkine çok benzer pozisyonlardadır. Bununla birlikte, "kapak" denilen bir yapı mevcut değildir ve aktif bölge nükleofil Ser77 açık durumdadır (van Pouderoyen ve ark. 2001). Ayrıca katalitik bölgenin yakınında Ca^{2+} bağlanma bölgesini bulunmamakta ve dolayısıyla aktiviteleri ve termostabilitesi Ca^{2+} 'dan bağımsızdır (Laachari ve ark. 2015).

B. subtilis lipazdaki oksianyon deliği, enzimin kapalıdan açık konformasyona geçişi üzerine katalitik sistemi ayarlandığı diğer lipazların aksine önceden oluşturulmaktadır. Ek olarak, *B. subtilis*, *B. pumilus* ve *B. licheniformis* lipazlarının stabilize edici disülfür köprülerinden yoksun oldukları bulunmuş ve dolayısıyla bu proteinlerin esnek bir tersiyer yapıya sahip olduklarını göstermektedir (Nthangeni ve ark. 2001).

I.4 alt familyasından lipazlar termostabil değildir. 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktiviteleri önemli ölçüde azalmaktadır. Bu lipazlar 9.5 ve 12 arasındaki pH değerlerinde maksimum lipaz aktiviteleri ve aşırı alkalın toleransı göstermektedirler (Guncheva ve Zhiryakova 2011).

I.5 alt familyasından lipazlar 40-45 kDa ve daha yüksek moleküler ağırlığa sahip proteinlerdir (Guncheva ve Zhiryakova 2011). Bazı mezofilik *Bacillus* bakteriler 112 kDa (Dosanjh ve Kaur 2002) ve 60 kDa (Nawani ve ark. 2006) gibi çok yüksek molekül ağırlıklı lipazlar ürettiğini rapor edilmiş, bu da *Bacillus* lipazlarının moleküler ağırlık bakımından oldukça çeşitli olduğunu göstermiştir (Saengsanga ve ark. 2016). Korunmuş pentapeptidleri Ala-His-Ser-Gln-Gly olarak göstermektedirler. Nötr veya orta derecede alkalın pH'da (pH = 8.0-10.0) ve 60-75°C'de maksimum aktivite göstermektedirler (Jeong ve ark. 2002). Bu enzimler, kalsiyum bağlama bölgesine ek olarak bir hidrofobik

kapağa ve bir Zn^{2+} bağlanma alanına sahiptir (Choi ve ark. 2005, Karkhane ve ark. 2009). I.5 alt familyasındaki lipazlar sistein kalıntılarına sahip olduğu ve bu kalıntı proteini termal inaktivasyona karşı stabilize edebilen disülfid bağlarının oluşumuna yardımcı olmaktadır (Nthangeni ve ark. 2001).

Bacillus lipazları esas olarak batık kültür fermantasyonu ile üretilmektedir. Lipaz sekresyonu hücre büyümesi ile ilişkilidir ve maksimum lipaz üretimi oranı geç üstel fazda görülmektedir (Chakraborty ve Raj 2008, Shariff ve ark. 2007).

Genellikle, durağan faz sırasında lipaz aktivitesinde bir azalma gözlenmekte ve bunun enzimin termal kararsızlığı ve kültür ortamında proteaz bulunması ile kaynaklanabilmektedir (Lee ve ark. 1999). *Bacillus* sp. DH4 ve H1 suşları, fermantasyonun durağan fazında ekstrasellüler lipazlar üretebildiğini bildirilmiştir (Handelsman ve Shoham 1994).

Bacillus bakterileri, organizmaya spesifik olan karbon, azot ve fosfor kaynakları ve mineral tuzları içeren bir besin ortamında üretilmektedir (Ebrahimpour ve ark. 2008). Doğal yağlar (zeytin, pamuk tohumu, hardal, susam, soya fasulyesi, balık, pirinç kepeği ve mısır yağları), trigliseritler (triolein, tributyrin) veya serbest yağ asitleri (oleik asit) gibi yağlar çoğunlukla tek başına veya poli- ve oligosakkaritler (nişasta, maltoz, mannoz, glikoz, ksiloz) veya polioller (gliserol veya mannitol) ile kombinasyon halinde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. *Bacillus halodurans* LBB2 hücreleri, bir karbon kaynağı olarak metanol kullanılarak üretilmiştir (Ramchuran ve ark. 2006). Maya ekstraktı, pepton, casamino asit veya tripton, yaygın olarak kullanılan organik azot kaynaklarıdır (Kim ve ark. 1994, Wang ve ark. 1995). Pepton ve tripton, lipaz salgılanmasında katkıda bulunan kofaktörler ve amino asitler içeren kompleks karışımlardır (Shariff ve ark. 2007). Genellikle, amonyum nitrat, sodyum nitrat, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum fosfatlar ve üre gibi inorganik azot tuzları *Bacillus* bakterinin üretim ortamına eklenmektedir (Dutta ve Ray 2009). Bununla birlikte, *Bacillus* sp. 42 suşun üretimin ortamına sodyum nitrat ve di-amonyum ortofosfat eklenmiştir (Eltaweel ve ark. 2005).

Lipaz üretimi çoğunlukla indükleyiciye bağımlıdır ve çoğu durumda yağlar iyi indükleyiciler olarak işlev görmektedir (Takaç ve Marul 2008). Bazı diğer bileşiklerin

safla tuzları, SDS, Tween 80, Triton X-100 gibi *Bacillus* lipazlarının salgılanmasını uyardığı bildirilmiştir (Nthangeni ve ark. 2001). Tween 80'in *B. subtilis* ve *B. alcalophilus* B-M20 suşlarında lipaz üretimi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı bildirilmiş (Ghanem ve ark. 2000) ve ayrıca *Bacillus* sp. L2 suşu lipaz üretimi üzerinde engeleyici bir etki gösterdiğini saptanmıştır (Shariff ve ark. 2007).

Genel olarak, *Bacillus* lipazları kolayca üretilmekte ve organik çözücülere karşı yüksek tolerans göstermektedir. Bu da gıda endüstrisi, kozmetikler ve biyodizel üretimi için esterlerin sentezinde kullanılmaktadır (Guncheva ve Zhiryakova 2011).

2.7. Mutasyon

Mutasyon, nükleotid dizisinde veya nükleotidlerin yapısında oluşan, genetik şifrede değişikliğini sağlayan, dolayısıyla sentez edilecek polipeptidin yapısını ve işlevini bozan kalıcı değişimler olarak tanımlanmaktadır. Mutasyon sonucu oluşan yeni tip organizmaya mutant adlandırılmaktadır (Yeşilbağ 2002).

Mutasyonlar, genel olarak eşey hücresinde oluşan germ hattı mutasyonları ve doku hücreleri içinde gerçekleşen bir somatik mutasyonlar olmak üzere ikiye ayrılabilir. Bedensel (somatik) mutasyonlar, kalıtsal olamayacağı için kuşaktan kuşağa aktarılmamakta ve bu anlamda kalıtsal değildir. Germ hattı mutasyonları ise kalıtsal ve dolayısıyla bir sonraki nesillere aktarılmaktadır (Knippers 1997).

Mutasyonlar medana gelen değişimlerin büyüklüğüne ve lokalizasyonu göre nokta mutasyonlar ve kalıp değiştirme mutasyonları olarak ikiye ayrılmaktadır. Nokta mutasyon, sadece bir veya birkaç baz çiftini kapsayan değişimlerdir. Genellikle baz değişimleri şeklinde meydana gelmekte ve moleküler ağırlıkta herhangi bir değişiklik gerçekleşmemektedir (Dahle ve ark. 1994). Bu tür mutasyonlar, sonuçta yapısal ve işlevsel olarak önemli değişiklikler sağlamamaktadır. Kalıp değiştirme mutasyonları daha geniş çaplı olmakta ve baz dizinine bir veya bir kaç bazın girmesi veya çıkmasıyla gerçekleşmekte (Ersoy ve Bayşu 1986) ve dolayısıyla mutasyon noktasını takip eden bölgede baz dizilimi değişmekte ve böylece oluşacak polipeptidin yapısı veya fonksiyonu değişmiş olmaktadır. Bu tür mutasyonda genellikle mutasyon noktasına

yakın bir bölgede terminasyon kodonu oluşmakta ve daha kısa zincire sahip anormal polipeptid sentezi ile sonuçlanmaktadır (Krauzer 1988).

Mutasyonları oluşum şekillerine göre doğal yaşamda kendiliğinden meydana gelen spontan mutasyon ve yapay şartlarında uyarılmak suretiyle oluşturulan indüklenmiş mutasyonlar olarak ikiye ayrılabilir (Yeşilbağ 2002).

Spontan mutasyonlar, DNA replikasyonundaki hatalar, spontan lezyonlar, ve transposable genetik elementler gibi çeşitli kaynaklardan gerçekleşmektedir (Griffiths ve ark. 2000). Spontan mutasyonların meydana gelme olasılığı düşük, genellikle 10^5 ila 10^8 arasında bir hücre aralığındadır. İndüklenmiş mutasyonlar, mutajen adı verilen mutasyon oranını arttırdığı bilinen çevresel ajanlarla oluşan mutasyonlardır. En yaygın olarak kullanılan mutajenler yüksek enerjili radyasyon (fiziksel) veya spesifik kimyasallardır (Griffiths ve ark. 1999).

Kimyasal mutajenler, baz analogları, DNA tabanlarını değiştiren ajanlar, alkilleyici ajanlar, asilleyici ajanlar ve interkelasyon yapan ajanlar gibi mutajenler kapsamaktadır. Baz analogları, moleküler yapıları nükleotid bazlara çok benzemekte ve DNA kopyası çıkarılırken bazların yerine girerek kimyasal yanılmalara neden olmaktadır (Ramig 1990). Bu mutajenlerin örneği, 2-aminopurin adenin analogu iken 5-bromourasil bir timin analogudur. DNA tabanlarını değiştiren ajanlar, çoğalma sırasında olmayan genomlara etkileyen bu ajanlardan nitroz asiti bazları deamine ederken hidroksilamin, sitozin ile reaksiyona girmekte ve hidroksilaminositozin oluşumuna sebep olmaktadır (Ersoy ve Bayşu 1986). Alkilleyici ajanlar grubunda bulunan nitrojen mustard, nitrosoguanidin ve etilmetan sulfonat gibi bileşikler bazlardaki azot molekülüne bir alkil grubu eklemektedir (Günalp ve ark. 1986, Flint ve ark. 2000). Asilleyici ajanlar, asetik, süksinik ve maleik anhidrit gibi mutajenler kapsamakta ve bu mutajenler amino ve karboksil gruplarını etkilemektedir (Flint ve ark. 2000). İnterkelasyon yapan ajanlar, akridin boyaları (akriflavin, proflavin, acridin orange) kapsamaktadır. Bu ajanlar çift iplikli DNA üzerine etkili ve çoğalma sırasında tek iplikcik halindeki DNA molekülünde baz dizinleri arasına katılmaktadır (Akman 1983).

Fiziksel Mutajenler ısı, pH ve ışınlar gibi mutajenler olmaktadır. Isı ve pH depurinasyon adı verilen purin bazlarının giderilmesini sağlamaktadır. X ve gama ışınları gibi iyonize

ışınlar, DNA molekülünde delesyon veya inzersiyonlara yol açmaktadır. İyonize olmayan radyasyon olan Ultraviyole (UV) ise DNA molekülünde yan yana bulunan pirimidin bazları arasında dimerleşmelere neden olmaktadır (Akman 1983, Arda 1985).

Mutajenez, termostabilite, optimum pH ve spesifik aktivite gibi özellikleri değiştirmek veya hedef proteinlerin yapı-işlev ilişkilerini anlamak için protein mühendisliğinde önemli bir tekniktir. Rasyonel tasarım ve rastgele mutajenez olmak üzere iki temel yaklaşım mevcuttur (Tachioka 2016). Rasyonel tasarım yaklaşım, protein mühendisliğinde en klasik yöntem ve proteinlerin Bölge hedefli mutajenez (Site-directed mutagenesis) kapsamaktadır. Bölge hedefli mutajenez yöntemi kullanarak, yabani tip diziler bilinen bir gendeki herhangi bir spesifik bölgede mutasyonlar oluşturulabilmektedir (Griffiths ve ark. 2000). Bölge hedefli mutasyon yönteminde nükleotidlerin analogları ve diğer kimyasallar ilk önce lokalize nokta mutasyonları oluşturmak için kullanılmaktadır (Shortle ve ark. 1981). Bu kimyasallar arasında AT'den GC'ye değişim indükleyen aminopurin (Caras ve ark. 1982), GC'den AT'ye değişime sağlayan nitrosoguanidin (McHugh ve Miller 1974), bisülfid (Shortle ve Nathans 1978), ve N4-hidroksisitidin kapsamaktadır (Flavell ve ark. 1975, Müller ve ark. 1978).

Bölge hedefli mutajenez yönteminde genellikle mutajenik oligonükleotitlerin, DNA polimeraz ile bir primer uzatma reaksiyonunda kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle, nokta mutasyonu veya belirli bölgelerde küçük DNA dizilerini delesyon ve inzersiyonu yapılabilmektedir. Yöntemin gelişmeleri, bu tür mutajenezi nispeten basit ve etkili bir süreç haline getirmiştir (Doering ve ark. 2018).

Rastgele Mutajenez Tekniklerinde, hücreler veya organizmalar UV radyasyonu veya mutajenik kimyasallar gibi mutajenlere maruz bırakılmakta ve daha sonra istenilen özelliklere sahip olan mutantlar seçilmektedir. Hermann Muller 1927'de X-ışınlarının meyve sineklerinde genetik mutasyonlara neden olduğunu tespit etmiştir (Muller 1927) ve genetik çalışmalarında yarattığı mutantları kullanmaya devam etmiştir (Crow ve Abrahamson 1997). *Escherichia coli* için, UV radyasyonuna maruz bırakıldıktan sonra mutantlar seçilmekte ve agar ortamın üzerinde üretilmektedir. Oluşturulan kolonilerin biri zengin bir ortamda, diğeri minimal bir ortamda olmak üzere replika plate yöntemi

uygulanmakta ve spesifik besinsel gereksinimlerine sahip olan mutantlar daha sonra minimal ortamda gelişim için yetersizlik düzeyi sayesinde saptanabilmektedir. Benzer prosedürler, diğer hücre tipleri ve seçim için farklı ortamlar ile denenebilmektedir (Anonim 2020h).

Daha iyi özelliklere sahip mutantları taramak amacıyla spesifik proteinlerde rastgele mutasyonların elde edilebilmesi için bir dizi yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, katkılı nükleotitlerin oligonükleotit sentezinde kullanılmasını veya nükleotitlerin yanlış birleştirilmesini (hata eğilimli PCR) geliştiren koşullarda bir PCR reaksiyonu yapılmasını kapsamaktadır. Mutasyon içeren PCR ürünleri daha sonra bir ekspresyon vektöründe klonlanmakta ve üretilen mutant proteinler karakterize edilebilmektedir (Blackburn 2006).

Hayvan çalışmalarında, mutant fareler elde etmek için N-etil-N-nitrosourea (ENU) gibi alkilleyici ajanlar kullanılmıştır (Justice ve ark. 1999, Hrabé de Angelis ve Balling 1998). Etil metansülfonat (EMS) da çoğunlukla hayvan ve bitki mutantları elde etmek için kullanılmıştır (Bökel 2008, Flibotte ve ark. 2010).

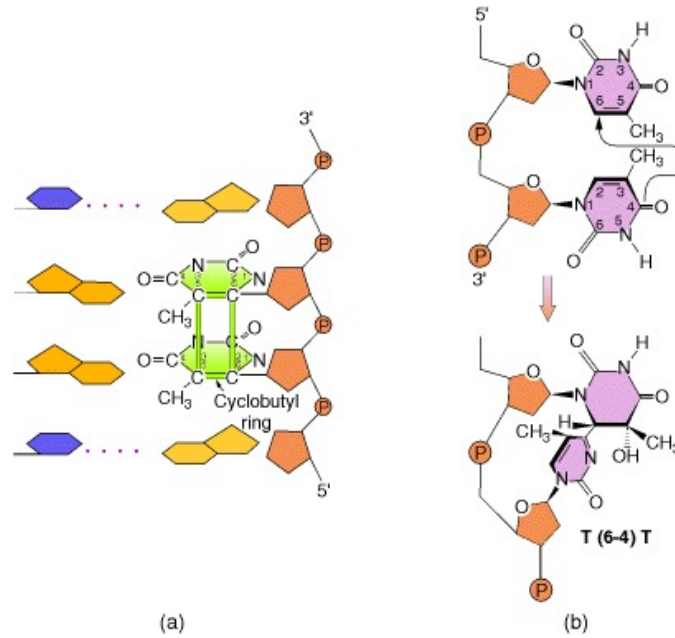
2.8. UV (Ultraviole) Mutasyonu

DNA veya hücrelerin ultraviyole (UV) ile ışınlanması, çeşitli mutajenik DNA lezyonlarının oluşumuna neden olmaktadır. UVB veya UVC radyasyonunun neden olduğu en sık görülen lezyonlar cis-syn siklobutan pirimidin dimerler (CPD'ler) ve (6-4) pirimidin fotoürünleridir (6-4 fotoürünlerdir; 6-4 PPs) (Pfeifer ve ark. 2005). Ayrıca pürin dimerleri ve pirimidin mono-eklentileri gibi birkaç küçük fotoürün de meydana gelmektedir (Pfeifer 1997).

CPD'ler, iki komşu pirimidin bazının 5,6 bağları arasında oluşmaktadır. 6-4 fotoürünler, iki komşu pirimidinin 6 ve 4 pozisyonları arasındaki kararlı bir bağ ile karakterize edilmekte ve çoğunlukla 5'-TC ve 5'-CC dizilerinde meydana gelmektedir (Şekil 2.12). CPD'lerinkinden oldukça düşük seviyelerde oluşmaktadırlar (Yoon ve ark. 2000). UVA ışınlanması DNA'da (Rochette ve ark. 2003), CPD'leri indükleyebilmekte ve bir dolaylı mekanizma ile okside DNA bazlarının oluşumuna yol açmaktadır (Cadet ve ark. 1997). Bu UV lezyonları, etkinliği dalga boyu ve bunu takiben DNA bazları tarafından

doğrudan UV enerji emilimine bağlı olarak gerçekleşen bir fotokimyasal reaksiyonla oluşmaktadır (Markovitsi ve ark. 2010).

CPD'ler ve 6-4 fotoürünlerin oluşumunu yaklaşık 260 nm'de en yüksek olduğunu ve oluşumlarının etki spektrumları DNA'nın emilim spektrumuna paralellik göstermektedir. Ayrıca 6-4 fotoürünlerin, 325 nm civarında UVA dalga boylarının emiliminden sonra bir izomerik ikincil ürün olan Dewar değerlik izomerine dönüşebildiği de görülebilmektedir (Matsunaga ve ark. 1991). Bu fotolesiyonların CPD, 6-4 fotoürün ve Dewar'ın UV spesifik mutasyonlara neden olduğunu kabul edilmektedir (Ikehata ve Ono 2011).



Şekil 2.12. (a) Bir siklobutan pirimidin dimerinin yapısı. Ultraviyole ışını, 5,6 çift bağ üzerinde etkili olarak aynı DNA dizisi üzerindeki iki bitişik pirimidin arasında dört üyeli bir siklobutil halkasının (yeşil) oluşumunu uyarmaktadır. (b) 6-4 fotoürünün yapısı. Yapı en yaygın olarak iki bitişik pirimidinin C-6 ve C-4 konumları arasında 5'-C-C-3' ve 5'-T-C-3' ile çift sarmalın lokal yapısında önemli bir hasara neden olmaktadır (Griffiths ve ark. 1999)

UV ayrıca riboflavin, triptofan ve porfirin (Peak ve Peak 1987) gibi bazı küçük molekülleri aktive ederek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla ışınlanmış hücrelerde oksidatif stresi indüklemekte ve bu da hücrel oksijeni aktive

edebilmektedir. ROS DNA'ya saldırmakta ve DNA'da 8-hidroksiguanin (8OH-G) ve timin glikol gibi oksidatif baz hasarı üretebilmekte veya iplik kopmasını neden olabilmektedir (Kino ve Sugiyama 2005). ROS ayrıca hücrel nükleotit havuzlarına saldırmakta ve dolayısıyla DNA sentezi için yine de nükleotit öncüleri olarak kullanılabilen 8-hidroksideoksifonanosin-trifosfat (8OH-dGTP) gibi oksitlenmiş nükleotidler üretilmektedir (Sekiguchi ve Tsuzuki 2002). Bu tip oksidatif DNA ve nükleotit hasarlarının bazılarının mutajenik olduğu bilinmektedir (Kino ve Sugiyama 2005). Bu nedenle UV, dolaylı bir mekanizma yoluyla hücrel genomda oksidatif stres aracıyla mutasyonlara neden olabilmektedir (Ikehata ve Ono 2011).

UV spesifik mutasyon tiplerini indüklemektedir. Bunlar, dipirimidin bölgelerindeki sitozin (C) → timin (T) baz değişimi ve çok düşük seviyede oluşan CC → TT tandem baz değişimidir. Bu iki mutasyon tipine UV signatürü olarak isimlendirilmekte (Brash 1991) ve bu mutasyonların algılanmaları UV'ye maruz kaldığını göstermektedir. Bu UV spesifik mutasyonların oluşum mekanizmalarından birinde, bir CPD'de sitosin bazlarının deaminasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir (Tessman ve Kennedy 1991, Tessman ve ark. 1992).

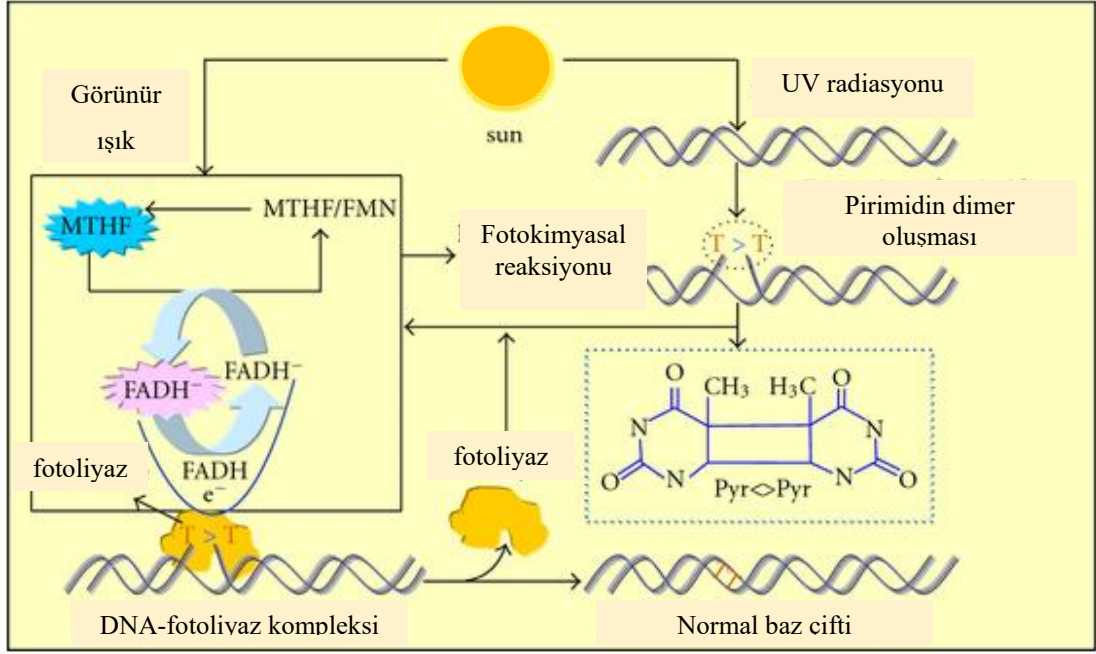
2.9. Tamir Mekanizması

Canlıların UV radyasyonunun ölümcül etkilerinin gidermesi yeteneği ile ilgili fikirler 1930 yılında ortaya çıkmış (Hollaender ve Curti 1935), ancak canlı organizmada onarım mekanizmalarının varlığını Kelner (1949) ve Dulbecco (1949) tarafından bağımsız olarak saptanmıştır. Hücre içindeki belirli bir onarım mekanizması belirlenmesi esas olarak genomdaki lezyonların tipine ve yerine bağlıdır (Essers ve ark. 2006). Onarım mekanizması üzerindeki biyokimyasal ve moleküler çalışmalar, *E. coli*, *S. cerevisiae* ve insan gibi bazı model organizmalarda kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve burada özelleşmiş onarım proteinleri, genomu sürekli olarak taradığı ve fotoreaktivasyon, eksizyon onarımı (BER ve NER), ve uyumsuzluk onarımı (MMR) gibi birkaç farklı onarım mekanizmasını tetikleyerek DNA lezyonlarıyla karşılaştığı görülmektedir (Rastogi ve ark. 2010).

2.9.1. Fotorektivasyon

Fotoreaktivasyon işlemi, iyi korunmuş ve arkebakteri, bakteri, virüs ve bazı ökaryotlar gibi organizmalarda bulunan, "fotoliyaz" olarak bilinen enzim aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.13). Enzim spesifik olarak CPD'lere (CPD fotoliyaz) veya 6-4 fotoürünlere (6-4 fotoliyaz) bağlanmakta ve görünür/mavi ışığın enerjisini kullanarak siklobutan halkasını doğrudan monomerize etmekte ve genomu UV radyasyonunun zararlı etkilerinden korumaktadır (Kim ve ark. 1992, Essen ve Klar 2006). Her mavi ışığın fotonu absorpsiyonunda yaklaşık bir dimeri monomerik pirimidinlere dönüştürülmektedir (Britt 1996). CPD fotoliyazlar, arkea, bakteri, mantar, virüs, bitkiler, omurgasızlar ve aplasental memeliler dahil birçok omurgalı gibi çeşitli gruplarda bulunmaktadır. Diğer yandan, *Drosophila*, ipekböceği, *Xenopus laevis* ve çingiraklı yılanlar gibi bazı organizmalarda 6-4 fotoliyaz tanımlanmaktadır (Sinha ve Hader 2002). Fotoliyazlar, insan gibi plasental memelilerde bulunmamakta veya fonksiyonel değildir (Todo 1999). Bununla birlikte Sutherland (1974), Sutherland ve Bennett (1995) ve Harm (1980), insanlar, öküz, kedi ve fare gibi çeşitli plasental memelilerin beyaz kan hücreleri (WBC) dahil olmak üzere hücreler ve dokularda fotoliyaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir.

420-616 amino asit kalıntısına sahip olan DNA fotoliyazlar (45-66 kDa) (Essen ve Klar 2006), bir katalitik kofaktör ve bir ışık hasat kofaktöründen oluşan monomerik flavine bağımlı onarım enzimleridir. Bugüne kadar, 5,10-meteniltetrahidrofolat (MTHF) (Johnson ve ark. 1988), 8-hidroksi-5-deaza-riboflavin (8-HDF) (Eker ve ark. 1990) ve FMN (Ueda ve ark. 2005), ışık hasat kofaktörleri olarak bilinmektedir. Bu kofaktörler ışık enerjisini verimli bir şekilde absorbe etmekte ve $FADH^+$ 'a aktarmaktadırlar (Saxena ve ark. 2004). İndirgenmiş flavin adenin dinükleotidi ($FADH^+$) katalitik kofaktör olarak bilinen tüm fotolizlerde bulunmaktadır. Enzimin $FADH^+$ kofaktörü aracılığıyla bir elektron olarak enerjyi CPD'ye transfer ettikten sonra siklobutan halkasını bölerek iki monomerik baz vermektedir (Kao ve ark. 2005).



Şekil 2.13. Fotolizaz enzimin fotoreaktivasyon mekanizması (Rastogi ve ark. 2010)

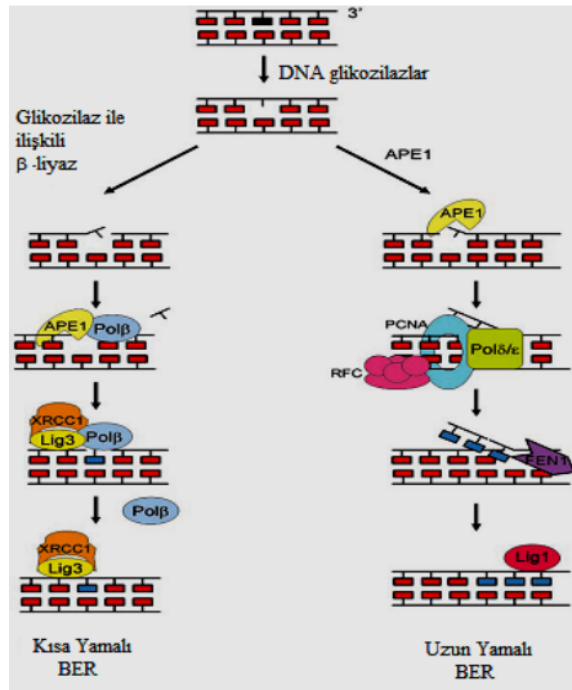
2.9.2. Eksizyon tamir mekanizmaları

Fotoreaktivasyonun aksine, eksizyon onarımı daha karmaşık ve ışıktan bağımsız bir onarım mekanizmasıdır. Burada anormal veya hasarlı olan nükleotidler, baz eksizyon tamiri (BER) ve nükleotit eksizyon tamiri (NER) olmak üzere iki ana onarım mekanizmasıyla uzaklaştırılmaktadır (Rastogi ve ark. 2010).

Baz eksizyon tamiri (BER) deaminasyonun, alkilasyonun, oksidasyonun ve DNA replikasyon hatalarının kaynaklanan küçük DNA modifikasyonları tamir etmektedir (Jeppesen ve ark. 2011). BER mekanizması DNA polimeraz, DNA glikozilaz, AP endonukleaz ya da AP DNA lizaz ve DNA ligazı kapsayan enzimlerin fonksiyonunu gerektirmektedir (Robertson ve ark. 2009).

BER'de, kısa yamalı BER (short-patch BER, SP-BER) ve uzun yamalı BER (long-patch BER, LP-BER) olmak üzere iki alt yolak bulunmaktadır (Robertson ve ark. 2009). Kısa yamalı yolakta tek nükleotit değişimi gerçekleşmektedir. Uzun yamalı yolakta ise 2 ile 8

arası nükleotidin kesip çıkarılması gerçekleşmektedir (Sancar ve ark. 2004, Weissman ve ark. 2007). Bu iki yolağın, hataya özgü tek fonksiyonlu (urasil-DNA glikozilaz ve N-metilpürin-DNA glikozilaz) ya da birden fazla fonksiyona sahip DNA glikozilazlar (8-oksoguanin DNA glikozilaz, mutY homolog) tarafından ilk basamağındaki tamir başlatılmaktadır (Jeppesen ve ark. 2011). DNA glikozilazlar, abazik (AP) bir bölgenin oluşturması ve bazın serbest bırakması için modifiye baz ve şeker arasındaki N-glikozidik bağın hidrolizini katalize etmektedir (Kaina ve ark. 2007, Weissman ve ark. 2007). Ayrıca AP bölgesi, radyasyon ve kimyasallar tarafından spontan olarak da oluşturulabilmektedir (Weissman ve ark. 2007). Daha sonra, uzun yamalı BER’de APE1 endonükleaz (APEX1) veya kısa yamalı BER’de ise glikozilaz ile ilişkili β -liyaz tarafından bu bölgede bir çentik oluşturularak AP bölgesine komşu bir 3’-OH ucu sağlanmaktadır (Robertson ve ark. 2009). Oluşturulan boşluklar, kısa yamalı BER yolağında DNA polimeraz β tarafından, uzun yamalı BER yolağında ise Pol β ve/veya Pol ϵ veya δ tarafından doldurulmaktadır. Ligasyon işlemi, kısa yamalı BER yolağında XRCC1 ve Ligaz III kompleksi tarafından, uzun yamalı BER yolağında ise Ligaz I tarafından gerçekleştirilmektedir (Slupphaug ve ark. 2003, Sancar ve ark. 2004) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Baz eksisyon tamir mekanizması (Sancar ve ark. 2004).

Nükleotit eksizyon tamiri (NER), UV kaynaklı DNA lezyonlarının onarımında kritik öneme sahiptir ve en çok yönlü ve esnek onarım sistemlerinden biridir. Bu onarım mekanizması çoğu organizmada bulunmakta, ancak ökaryotlarda yüksek oranda korunmaktadır (Rastogi ve ark. 2010).

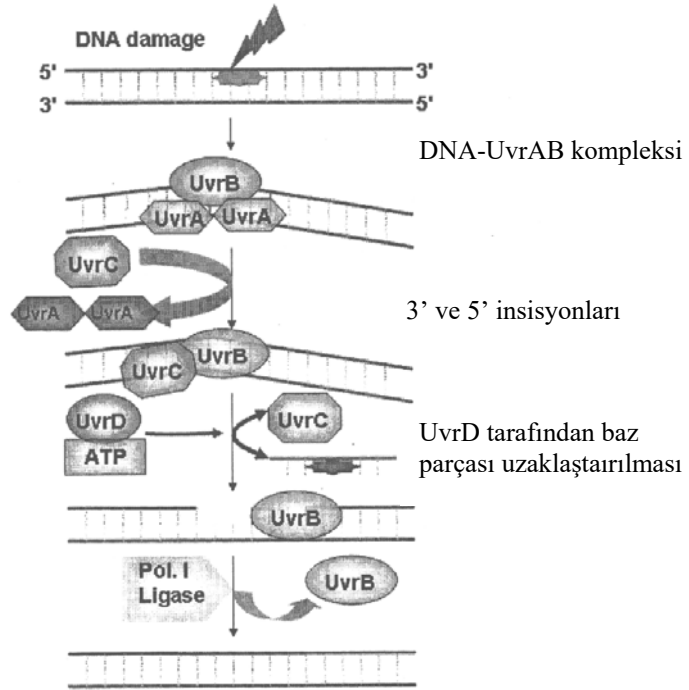
NER mekanizması, çift zincir DNA'nın normal heliks yapısını bozan, UV ile indüklenmiş pirimidin dimerlerini ya da çoğunlukla mutajenik kimyasalların ve kemoterapötik ajanların oluşturduğu DNA eklentilerinden kaynaklanan hasarların tamir etmektedir (Hoeijmakers 2009, Morita ve ark. 2010, Iyama ve Wilson 2013).

Her ne kadar 6-4 fotoürünler ve CPD'ler aynı NER proteinleri tarafından çıkarılsa da, bu lezyonların her ikisinin de göreceli onarım etkinliği memeli hücrelerinde önemli ölçüde değişmektedir. İnsan ve hamster hücrelerinde 6-4 fotoürünlerinin eliminasyonu CPD'lerden en az beş kat daha hızlı olduğu tespit edilmiştir (van Hoffen 1995).

NER ilk olarak *E. coli*'de gözlemlendiğini tespit edilmiştir (Pettijohn ve Hanawalt 1964). Bu mekanizmada onarımı gerçekleştirmek için UvrA, B ve C (eksinükleaz aktivitesi gösteren ABC kompleksi olarak bilinir), UvrD (helisaz II), DNA polimeraz I (pol. I) ve DNA ligazı olmak üzere altı protein gerekmektedir (Lin ve Sancar 1990).

NER mekanizmada, UvrA, UvrB ve UvrC proteinlerinin etkisiyle başlatılmaktadır. UvrA proteini, UvrB'yi hasarlı bir bölgeye yüklemektedir. Ardından UvrC, UvrB'ye bağlanmakta ve bu da UvrBC-DNA insizyon kompleksi ile sonuçlanmaktadır. Bu komplekste, önce hasarın 3' ucundaki dördüncü veya beşinci fosfodiester bağında bir kesik yapılmakta ve ardından hasarın 5' ucundaki sekizinci fosfodiester bağında da bir kesik yapılmaktadır. Her iki kesik, her bir kesik için birer tane olmak üzere iki farklı aktif bölge içeren UvrC proteini tarafından katalize edilmektedir (Lin ve Sancar 1992, Verhoeven ve ark. 2000). UvrD (helikaz II) daha sonra hasarlı bazlık parçayı uzaklaştırmakta ve DNA polimeraz I (PolI) oluşan boşluğu doldurmaktadır. Son olarak, zincir DNA ligazı tarafından kapatılmaktadır (Goosen ve ark. 1998) (Şekil 2.15).

Ökaryot organizmalarda NER mekanizması kullanılan biyokimyasal strateji açısından prokaryotlardakine benzer olduğu belirlenmektedir. Ancak kullanılan proteinlerin doğası ve sayısı bakımından büyük farklılıklar göstermektedir (Costa ve ark. 2003).



Şekil 2.15. *E. coli*'de nükleotit eksisyon tamir mekanizması (Rastogi ve Rajeswarp 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvar'ında daha önceden lipaz enzimi üretimi için topraktan izole edilmiş ve adlandırılmış olan *Bacillus cereus* ATA179 suşu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fiziksel mutajen UV ile yapılan mutasyon çalışması

UV ile yapılan denemeler, Ultraviyole lambası (UltraViole 254 nm, Intensity ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) 60, Lamba-VL-130.G, 1x30W Germination Lamp, Vilber) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.1). Kültür saklama ortamından alınan bakteri kültürü 24 saat süre ile ön inkübasyona tabii tutulmuştur. Bu süre sonunda steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile uygun dilüsyonlar kullanılarak katı besiyeri içeren petrilere yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Bakterilerin lipaz üretme kapasitelerinin katı besiyerde belirlenmesi amacıyla Tribütirin agar (TBA) kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Bakterilerin üreme ortamına adaptasyonu için petrilere belirli sürede (10 saat) inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda petri kaplarının kapakları açılarak farklı zaman aralıklarında (0.5, 1, 5, 10, 15 ve 20 dakikalarda) UV ışınları besiyeri yüzeyindeki bakterilere direkt olarak uygulanmıştır. UV lambasının besiyeri üzerine olan uzaklığı her bir deneme için 5, 10, 15 ve 20 cm olarak seçilmiştir. UV mutasyonu sırasında fotoreaktivasyonun önlenmesi amacıyla UV çalışmaları karanlıkta yapılmıştır ve tüm petrilere karanlık odada bulunan inkübatörde 48 saat süre ile inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyon sonucunda petri kapında canlılık gösteren koloniler ve etrafında açık renkli zon oluşturan koloniler lipaz pozitif mutant olarak seçilmiştir. Hidrolitik zonların genişliği cetvel ile ölçülmüştür (mm). Aşağıdaki formül kullanılarak enzimatik indeks (EI) hesaplanmıştır (Florenco ve ark. 2012).

$$E.I = \frac{\text{Hidrolitik zon çapı}}{\text{Kolon çapı}}$$

Her bir deneme için 2 paralel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada hidrolitik zon çapı en geniş olan mutant suş seçilip ve diğer çalışmalarda kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Lipaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri (Kumar ve ark. 2012a).

Tribütirin Agar İçeriği (g/L)	
Pepton	5
Meat ekstrakt	3
Tribütirin	10
Agar	20
pH	7.0



Şekil 3.1. UV mutasyonu oluşturma düzeneği

3.2.2. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri ve bakteri üretim koşulları

Çalışmada mutant bakterilerin saklanması (kültür saklama), geliştirilmesi (ön inkübasyon) ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde farklı içerikli besiyerleri kullanılmıştır. Tüm besiyerleri pH'ları 7.0'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışmada bakteriden lipaz üretimini belirlemek üzere Çizelge 3.2'deki temel besi ortamı kullanılmıştır.

Kültür saklama ortamı olan Nutrient agarlı ortamdan steril öze ile alınan bakteri kültürü, içerisinde 30 mL NB bulunan 100 mL'lik erlene aşılansmış, 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 24 saat süre ile üretilmiştir. Bakterinin enzim üretim

kapasitesini saptamak amacıyla 24 saatlik bakteri kültürlerinin 600 nm'deki optik yoğunlukları (O.D) spektrofotometre (Beckman Coulter-DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3'e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür çözeltilisinden içerisinde 150 mL enzim üretim besiyeri bulunan 500 mL'lik erlenlere %5 oranında aşılınmış ve 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 72 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

Çizelge 3.2. Lipaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besiyeri ortamı

Ortam İçeriği (Kumar ve ark. 2005) (g/L)	
Pepton	5
Yeast ekstrakt	5
NaCl	0,5
CaCl ₂	0,05
Zeytinyağı (olive oil)	10
pH	7.0

3.2.3. Bakteri üremesinin ve enzim aktivitesinin ölçülmesi

Besiyerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile bakteri üremesinin belirlenmiştir. 3.2.2'de belirtildiği şekilde inkübasyona bırakılan besiyerlerinden belirlenen saatlerde örnek alınarak 600 nm dalga boyunda okunmuştur. Lipaz üretiminde kullanılan besiyeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir (Sarıkaya 1995). Elde edilen OD değişimleri zamana karşı grafiklenerek bakteri üreme eğrisi çıkarılmıştır.

Lipaz enzim aktivitesinin tayini için Sugihara ve ark. (1991)'nin yöntemine göre titrimetrik analiz metodu kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle belirlenen saatlerde bakteriler 10 dakika süre ile +4 °C' de santrifüj edilerek (6000 devir/dk) bakteri hücrelerinin bulunduğu alttaki pelet kısmı ile enzim içeren üstteki sıvı kısım (süpernatant) birbirinden ayrılmıştır. Süpernatant ham enzim kaynağı olarak

kullanılmıştır. Çizelge 3.3.'de lipaz aktivite tayin basamakları verilmiştir. Enzim aktivitesi ölçmek amacıyla inkübasyon ortamına 1 mL zeytinyağı (olive oil), 4.5 mL 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0,5 mL 0,1 M CaCl₂ ve 1 mL ham enzim konulmuştur. Kör olarak kullanıldığı tüpe diğer tüpteki tüm kimyasallar konularak, ham enzim yerine tampon konulmuştur. Tüpler vorteks ile iyice homojenize edilmiş ve tüpler 37°C'de 150 rpm hızda 30 dakika çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda reaksiyonun durulması amacıyla ortama %99,8 etanolden 20 mL eklenmiştir. Daha sonra 50 mM KOH içeren büret kullanılarak inkübasyon ortamının pH'sı 10.5'e kadar titre edilmiştir.

Çizelge 3.3. Lipaz aktivite tayin basamakları

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek Tüpü	Kontrol (Kör) Tüpü
Substrat çözeltisi (zeytinyağı)	1 mL	1 mL
50 mM Tris-HCl (pH 7.0),	4,5 mL	4,5 mL
0.1 M CaCl ₂	0,5 mL	0,5 mL
İnkübasyon sıcaklığına getirmek üzere 37 °C' de su banyosunda 5 dakika bekletilmektedir		
Enzim çözeltisi	1 mL	-
50 mM Tris-HCl (pH 7.0),	-	1 mL
Vorteksle karıştırılmakta ve 37 °C' de çalkalamalı su banyosunda 30 dakika bekletilmektedir		
Etanol (%98,8)	20 mL	20 mL
Vorteksle karıştırılmaktadır		
50 mM KOH pH 10.5 'e kadar titre edilmektedir		

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

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

Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan solusyonların hazırlanması;

- a. 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH: 7.0)

6,01 gr Tris Base (C₄H₁₁NO₃) tartılmış ve 900 mL distile su ile seyreltilmiştir. Çözelti HCl ile pH: 7.0'a getirilmiştir. Son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

- b. 50 mM KOH (pH: 10.5)

2,8 gr Potasyum Hidroksit (KOH) tartılmış ve 1 L distile su ile seyreltilmiştir.

- c. 0,1 M CaCl₂

11,1 gr Kalsiyum Klorür (CaCl₂) tartılmış ve 1 L distile su ile seyreltilmiştir.

3.2.4. Karbon (C) kaynaklarının etkisi

Mikroorganizmaların üremelerine etki eden karbon kaynaklarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı karbon kaynakları ile çalışılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.2'de içeriği verilen besiyerindeki karbon kaynağı çıkarılarak yerine aynı oranda glukoz, sukroz, nişasta, maltoz, mısır yağı, hint yağı, ayçiçek yağı, soya yağı ve hindiştan cevizi yağı kullanılarak lipaz enzimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.2'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.5. Azot (N) kaynaklarının etkisi

Azot kaynaklarının bakteri üreme kapasiteleri ve enzim üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla çeşitli organik ve inorganik azot kaynakları denemeye alınmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.2’de içeriği verilen besiyerindeki azot kaynağı çıkarılarak yerine aynı oranda organik azot kaynakları olarak pepton, yeast ekstrakt, tripton, corn steep liquer ve inorganik azot kaynakları olarak $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 , kullanılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.2’te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir

3.2.6. Metal iyonu kaynaklarının etkisi

Besiyerinde bulunan metal iyonlarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırılmak amacıyla, Çizelge 3.2’de içeriği verilen besiyerindeki metal iyonu çıkarılarak yerine aynı oranda LiSO_4 , FeSO_4 , KCl , BaCl_2 , MnSO_4 , CaCl_2 , NaCl , CuSO_4 kullanılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.2’te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim zamanına göre üreme ve lipaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.7. Maksimum lipaz üretimi için modifiye ortamın belirlenmesi

Maksimum lipaz sentezinin gözlemlendiği karbon, azot ve metal iyonları biraya getirilmesi ile yeni oluşturulan modifiye ortamda enzim üretim veriminin artırılması yoluna gidilerek temel besi yerindeki verim ile karşılaştırılmıştır.

3.2.8. Lipaz enzimin kısmi saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesi;

En yüksek lipaz aktivitesine sahip bir adet mutant suş’un lipaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu amaçla, modifiye besiyerinde maksimum

enzim üretim süresi ile inkübe edilmiş ve inkübasyon sonucu kültür ortamı +4°C' de, 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Kısmi saflaştırma basamağında ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Ham enzimin en iyi çökelme gösterdiği tuz konsantrasyonun belirlenmesi için süpernatant +4°C de farklı konsantrasyonlardaki (%20, %30, %40, %50 %60, %70 ve %80) amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Buz dolu kap içerisinde ham enzim çözeltisi içeren behere havanda toz haline getirilmiş % amonyum sülfat çok yavaş bir şekilde eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan örnek manyetik karıştırıcıda karıştırılarak bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Çöktürme sonrası oluşan karışım 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiş, pellet ve süpernatant birbirinden ayrılmıştır. Pellet 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözülüp diyaliz için kullanılmış ve enzim aktivite ve protein tayinleri de yapılmıştır.

Diyaliz;

Yarı geçirgen bir membrana sahip diyaliz tüpü (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16 mm) uygun boyutlarda kesilmiş, gözeneklerin temizlenmesi ve kirleticilerin giderilmesi amacıyla distile sudan geçirilmiştir. Diyaliz tüpü yumuşayınca bir ucu sıkıca iple bağlanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen pellet içeren tampon hazırlanan diyaliz tüpüne alınmış ve tüpün diğer ucu da ip yardımı ile sıkıca bağlanmıştır. Diyaliz tüpü, 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponu içeren 1 L'lik beherin içine alınmış ve 4°C'de bir gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Tampon çözeltisi tuzun tamamen giderilmesi amacıyla birkaç kez değiştirilerek diyalize devam edilmiştir. Amonyum sülfat tuzlarının ortamdan tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığını saptamak amacıyla tampondan birkaç damla alınmış ve üzerine 0,1 N HCl ve doygun BaCl₂ çözeltisinden 1-2 damla damlatılmıştır. Diyaliz işlemi bulanıklık görülmediği zamana kadar devam ettirilmiştir (Trautwein ve Kuhlmann 1982). Diyalizatın enzim aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır.

Ultrafiltrasyon ile diyalizatın konsantre edilmesi;

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

3.2.9. Protein miktarının belirlenmesi

Her bir saflaştırma basamağında elde edilen örneğin Lowry Metodu kullanılarak protein miktarlarının tayin edilmiştir (Lowry ve ark. 1951). Protein standart grafiğinin oluşturulması için 0,005 gr BSA 10 mL distile suda çözülmüştür. Konsantrasyonu 0-500 µg/mL olacak şekilde uygun sulandırma yapılarak hazırlanan örneklerin absorbansları 546 nm'de ölçülmüş (Beckman Coulter-UD 700) ve standart eğri grafiği hazırlanmıştır.

Ayıraç A: % 3'lük Na₂CO₃ (0.1 N NaOH'da çözülmüş)

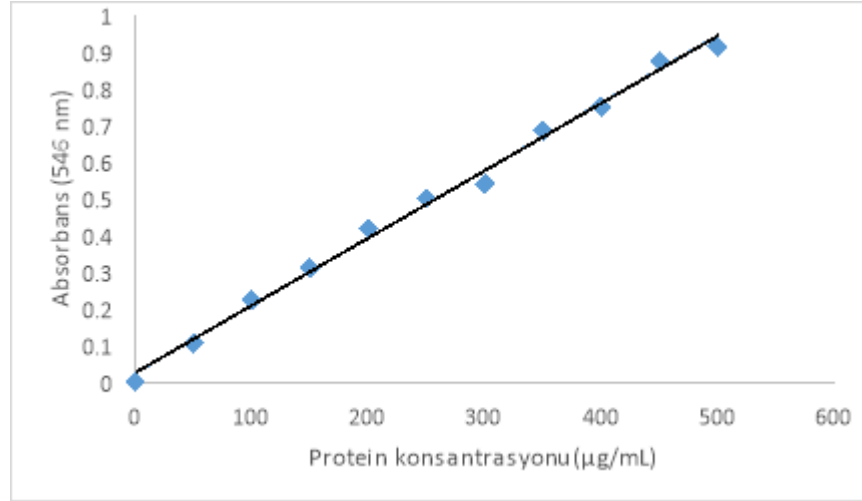
Ayıraç B: % 1'lik CuSO₄ (% 1'lik K-Na- tartarat'da çözülmüş)

Ayıraç C: % 2'lik K-Na-tartarat

Ayıraç D: İhtiyaca göre günlük A, B ve C ayıraçlarından hazırlanır (25:1:1 oranında).

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

1 mL örneğinden alınmış ve üzerine 5 mL D ayıracından eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Kör için ise 1 mL distile su ve D ayıracından 5 mL konularak aynı işlemler uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerlerine 0,5 mL E çözeltisi eklenerek vortekslendikten sonra karanlık bir ortamda 20 dakika boyunca bekletilmiştir. 546 nm'de köre karşı, absorbansları okunarak sonuçlar elde edilmiştir. Okunan bu absorbanslar standart protein konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Protein standart grafiği

3.2.10. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

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

3.2.11. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Farklı pH değerlerinin lipaz enzimin aktivitesine olan etkilerinin araştırılması amacıyla 0.1 M sodyum asetat (pH 4.0-6.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0 ve 8.0), 0.1 M glisin-NaOH (pH 9.0 ve 10) kullanılarak pH 4.0-10.0 arasında aktivite ölçümü yapılmıştır. Lipaz enzimin optimum pH değeri saptanmıştır. Enzimin pH stabilitesi belirlenmek için enzim optimum pH değerinde belirli saatlerde inkübe edilerek aktivite tayinleri yapılmıştır. Aktivite değerleri, kontrol olarak kullanılan pH 7.0'dan elde edilen değer (%100) ile kıyaslanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.2.12. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

Lipaz enzimin aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisini tespit etmek amacıyla enzim 1 ve 5 mM MnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, CaCl₂, LiSO₄, BaCl₂, NaCl, KCl, SDS, EDTA, Tween 20 ve Triton X-100 ile inkübe edilerek aktivite tayini yapılmıştır. Aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.2.13. Kinetik parametrelerin saptanması

Lipaz enziminin V_{max} ve K_m değerleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan tribütirin kullanılarak çizilen Lineweaver–Burk grafiği ile saptanmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

3.2.14. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti

Lipaz Enzimin moleküler ağırlığı belirlenmesi için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Laemmli 1970).

SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması;

a. %30 Akrilamid

Polimer matriksi kurmak için akrilamid ve N, N'-metilen-bisakrilamid kullanılmıştır. Bu amaçla 28,8 gr akrilamid ve 1,2 gr bis akrilamid tartılıp distile su ile toplam 100 mL içerisinde çözdürülmüş ve Whatman No. 1 filtre kağıdından süzülerek, kahverengi bir şişede 0-5°C' de muhafaza edilmiştir. Bu çözelti 2 ay süreyle bozulmadan saklanabilmektedir (Sarıkaya 1995).

b. 1 M Tris-HCl (pH 6.8) Tamponu

12,11 gr Tris Base (C₄H₁₁NO₃) tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra pH 6.8'e ayarlanmış ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır

c. 1 M Tris-HCl (pH 8.8) Tamponu

12,11 gr Tris Base ($C_4H_{11}NO_3$) tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra pH 8.8'e ayarlanmış ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

d. %10'luk Amonyum Per Sulfat (APS)

10 gr APS tartılmış ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

e. Örnek Tamponu

SDS-PAGE için Çizelge 3.4'teki örnek tamponu hazırlanmıştır.

Her bir örnek için 100 μ l stok solüsyondan alınmış ve üzerine 5 μ l β -mercaptoetanol eklenmiştir. Spatül ucu kadar Bromfenol Mavisi eklenip vortekslenmiştir.

Çizelge 3.4. Örnek tamponun içerikleri

Tampon İçeriği	
1 M Tris-HCl pH 6.8	6,5 mL
Gliserol	10 mL
SDS	2 gr
Distile H ₂ O	100 mL

f. Yürütme tamponu

Yürütme tamponu Çizelge 3.5'e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Yürütme tamponun içerikleri

Yürütme Tampon İçeriği	
Tris Base	0,3 gr
Glisin	14,4 gr
SDS	1 gr
Distile H ₂ O	100 L

g. Yıkama çözelti

Yıkama çözelti Çizelge 3.6'e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.6. Yıkama çözeltinin içerikleri

Yıkama Çözelti İçeriği	
İzopropil alkol	25 mL
Asetik asit	10 mL
Distile H ₂ O	65 mL

h. Boyama çözeltisi

Boyama çözeltisi Çizelge 3.7'e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7. Boyama çözeltisi içerikleri

Boyama Çözelti İçeriği	
Commassie-brilliant R-250 mavisi	0,15 gr
İzopropil alkol	25 mL
Asetik asit	10 mL
Distile H ₂ O	65 L

SDS-PAGE yönteminde kullanılan jelin hazırlanması;

SDS PAGE için %10 ayırma jeli (Çizelge 3.8) ve %4 yükleme jeli (Çizelge 3.9) olmak üzere iki tip jel hazırlanmıştır

Çizelge 3.8. SDS-PAGE için kullanılan %10 ayırma jelin içerikleri

Ayrırma Jelin İçeriği (20 mL için)	
1M Tris-HCl (pH 8.8)	5 mL
%30 Akrilamid	6,8 mL
Distile H ₂ O	8 mL
%20 SDS	100 µL
APS (100 mg/mL)	100 µL
TEMED	10 µL

Çizelge 3.9. SDS-PAGE için kullanılan %4 yükleme jelin içerikleri

Yükleme Jelin İçeriği (5 mL için)	
Distile H ₂ O	3,05 mL
0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1,25 mL
%10 SDS	50 µL
%30 Akrilamid	650 µL
APS (100 mg/mL)	25 µL
TEMED	5 µL

Jellerin hazırlanmasında TEMED polimerleştirici ajan olduğundan dolayı karışıma eklendikten sonra pipet ile iyice karıştırılmış ve çözelti hemen cam plakalar arasına dökülmüştür. Örnekler hazırlandıktan sonra, cam plakalar elektroforez (Bio-Rad) mandalına yerleştirilmiş ve sızma olmayacak şekilde iyice sabitlenmiştir. Ayırma jeli, mikropipet yardımıyla cam plakaların arasına yavaşça dökülmüş ve üzerine isopropil alkol dökülerek, polimerleşmesi beklenmiştir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra alkol uzaklaştırılmış ve distile su ile üst kısım yıkanmıştır. Kurutma kağıdı ile kalan su uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yükleme jeli de aynı yöntemle plakaların arasına dökülmüş, elektroforez tarağı yerleştirilmiştir. Jelleşme tamamlandıktan sonra tarak çıkarılmış ve kuyucukların düzgün bir şekilde oluşması sağlanmıştır.

SDS-PAGE yönteminde örneklerin hazırlanması ve elektroforez koşulları;

On bir farklı protein içeren (Cell Signaling Technology Prestained Protein Marker 13953S) çözelti standart olarak kullanılarak lipaz enziminin moleküler ağırlığı saptanmıştır. Enzim örneklerinden 75 µl alınmış ve ependorf tüplerine konularak üzerlerine 25 µl örnek tamponu eklenmiştir. Daha sonra tüpler kaynar suda 5 dakika boyunca bekletilmiştir.

Daha önce hazırlanmış olan jel, elektroforez tankına oturtularak alt ve üst hazneleri yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Tankına konmuş olan jeldeki ilk kuyucuğun içerisine mikropipet yardımıyla 5 µl protein marker ve ardından diğer kuyucukların

içerlerine 10 µl örnek konmuş ve tanka 150 V sabit akım verilerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. İzleme boyası jelin 1 cm altında kalacak hale geldiğinde ise elektroforez işlemi durdurulmuştur. Elektroforez işlemi yaklaşık 2,5 saat sürmüştür.

SDS-PAGE yönteminde boyama ve boyanın uzaklaştırılması;

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatlice çıkarılmış ve boyama çözeltisi (Çizelge 3.7) içerisinde 50 rpm çalkalayıcıda 1 gece boyunca bekletilmiştir.

Boyanan jelden fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla yıkama çözeltisi (Çizelge 3.6) ile birkaç defa yıkanarak boyanın uzaklaştırılması ve bantların görünür hale gelmesi sağlanmıştır.

3.2.15. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi

Ham enzimin depolanma sıcaklığının belirlemek için mutant bakteriden üretilen ham enzimin başlangıç aktivitesi saptandıktan sonra enzim örnekleri oda sıcaklığında (RT), +4 °C'de ve -20 °C'de her 15 günde bir aktivitelere bakılarak depolama stabilitesi saptanmıştır.

3.2.16. Enzimin deterjan endüstrisindeki potansiyeli: Lipazın sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi

Lipaz enzimin aktivitesine deterjan katkı maddelerinin etkisini incelenmek üzere %1 ve %5 konsantrasyonlarda SDS, Triton X-100, EDTA ve H₂O₂ ilave edilerek, 100 rpm, 60 ve 70°C koşullarında 1 saat boyunca lipaz enzimi bu deterjan katkı maddeleri ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında lipaz enziminin aktiviteyi tayini yapılmıştır. Lipaz aktiviteindeki değişim, başlangıç aktivitelere göre hesaplanarak bağıl aktivite (%) olarak verilmiştir.

3.2.17. Enzimin deterjan endüstrisindeki potansiyeli: Enzimin deterjandaki raf ömrü

Enzimin raf ömrü, enzimin aktivitesinin kalıcılığının araştırılması amacıyla deterjan (enzimsiz deterjan A firması ve enzimli deterjan B firması) ile karıştırılmış liyofilize enzimin oda sıcaklığında her 30 günde bir aktivitelere bakılarak stabilitesini

belirlenmiştir. Liyofilizasyon işlemi LAB312 marka TOPT-10 Model cihazı ile -55 °C’de 48 saat yapılmıştır. Aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.2.18. Enzimin deterjan endüstrisindeki potansiyeli: Kirletilmiş kumaşlara lipaz uygulanması

Liyofilize edilmiş lipazın ticari deterjanlardaki kararlılığı, farklı ticari deterjan çözeltileri ile inkübe edilmesiyle araştırılmıştır. Katı enzimsiz deterjan (A firması) ve katı enzimli deterjan (B firması) test edilmiştir. Deterjanlar (0,1 g) 1 mL saf suda çözülerek kullanılmıştır. Liyofilize ham lipaz 50 mM Tris-HCl içerisinde çözülerek kumaş uygulamaları için hazır hale getirilmiştir (U/mL). Çalışmada %50 pamuk, %50 Poliester (PES) içeren sarı renkte kumaş kullanılmıştır. Kumaş B.U.Ü Tekstil Mühendisliği’nden temin edilmiştir. Kirletici olarak yemeklik yanmış yağ kullanılmıştır.

Kirletici (yemeklik yanmış yağ) ile kirletilmiş kumaşlar için 9 deney seti oluşturulmuştur.

1. Kirletilmiş kumaş (kontrol)
2. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Enzimsiz Deterjan
3. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Enzimli Deterjan
4. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Liyofilize lipaz
5. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Enzimsiz Deterjan + 1mL Liyofilize lipaz
6. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Enzimli Deterjan + 1mL Liyofilize lipaz
7. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Ticari lipaz
8. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Enzimsiz Deterjan + 1 mL Ticari lipaz
9. Kirletilmiş kumaş + 1 mL Enzimli Deterjan + 1 mL Ticari lipaz

Her bir kumaş parçaları 60x60 mm boyutunda kesilmiş ve tüm kumaşı kapsayacak şekilde yanmış yağ ile kirletilmiştir. Yağ içeren kirleticiler ile muamele edilen kumaşlara yukarıda verilen setler uygulanarak 90x90 mm çapındaki petriker içerisinde 1 saat 37 °C’de bekletilmiştir. İnkübasyon sonucu kumaşlar saf su ile durularak kurutulmuştur. İşlem uygulanmamış kumaş örnekleri standart kabul edilerek, enzim ve deterjan uygulamaları sonrası oluşan kumaşlar B.U.Ü. Tekstil Mühendisliği Bölümü

laboratuvarında bulunan Konica Minolta renk ölçüm spektrofotometresi kullanılarak delta E değerleri saptanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Renk Ölçüm Spektrofotometresi (Anonim 2020f)

4. BULGULAR

4.1. Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi

Fiziksel mutajen etkeni olan UV ışını ile yapılan çalışmalarda farklı zaman aralıkları (0.5, 1, 5 10, 15 ve 20. dakika) ve UV ışığının petri yüzeyine farklı uzaklıkları (5, 10, 15 ve 20 cm) ile yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda toplam 445 mutant suş elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Çizelgede en geniş lipaz hidrolitik zon çapına sahip mutantlar verilmiştir. Yapılan çalışmalarda en iyi mutasyon oluşturma zaman aralığı farklılık gösterirken, en iyi uzaklık olarak 15 cm bulunmuştur.

Lipaz enzimi üretimine sahip kolonilerin etrafında açık berrak hidrolitik zonlar cetvel ile ölçülmüş (mm) ve enzimatik indeks (EI) hesaplanmıştır. Elde edilen mutant suşların EI değerleri ana suş (EI= 2.4, hidrolitik zon çapı 19 mm) ile kıyaslanmış ve EI'sı en yüksek olan 3 tane mutant suş ve hidrolitik zon çapı 26 mm olan 1 adet suş olmak üzere toplam 4 mutant suş seçilmiştir. Bunlar EV1 (EI= 1,6; hidrolitik zon çapı 26 mm), EV2 (EI= 6; hidrolitik zon çapı 18 mm), EV3 (EI= 7; hidrolitik zon çapı 14 mm) ve EV4 (EI= 5,6; hidrolitik zon çapı 17 mm) olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.1). EV1 mutantı 15 cm uzaklık ve 1 dakika ışınlama süresi ile elde edilirken, EV2 15 cm uzaklık ve 5 dakika ışınlama süresi, EV3 15 cm uzaklık ve 20 dakika ışınlanma süresi ve EV4 20 cm uzaklık ve 1 dakika ışınlama süresi ile elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

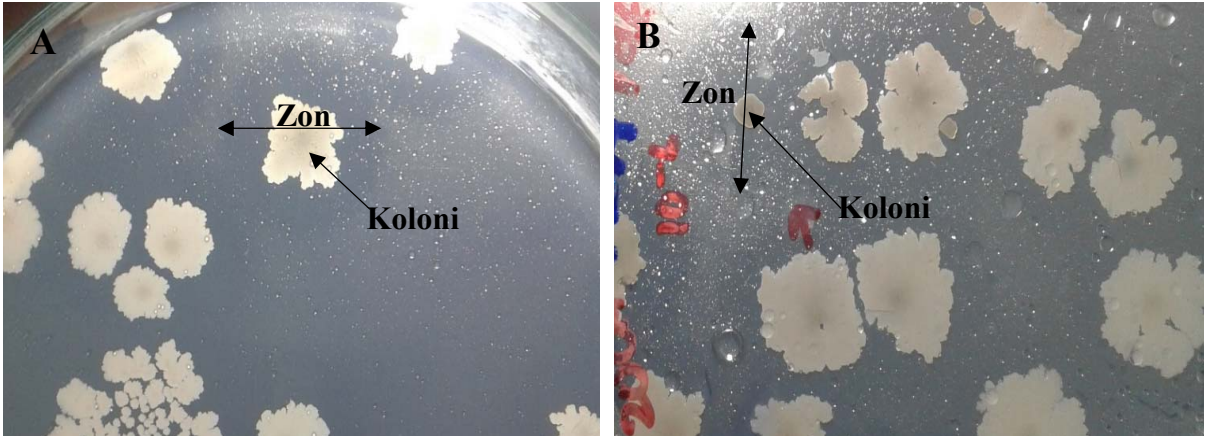
Çizelge 4.1. 5, 10, 15 ve 20 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve lipaz hidrolitik zon çapları

Zaman	5 cm				10 cm				15 cm				20 cm			
	Toplam Mutant Sayısı	Koloni Çapı (mm)	Hidrolitik Zon Çapı (mm)	EI*	Toplam Mutant Sayısı	Koloni Çapı (mm)	Hidrolitik Zon Çapı (mm)	EI	Toplam Mutant Sayısı	Koloni Çapı (mm)	Hidrolitik Zon Çapı (mm)	EI*	Toplam Mutant Sayısı	Koloni Çapı (mm)	Hidrolitik Zon Çapı (mm)	EI*
Kontrol	68	8	19	2,4	68	8	19	2,4	68	8	19	2,4	68	8	19	2,4
30 sn	25	6	17	2,8	25	6	17	2,8	31	6	19	3,1	31	8	20	2,5
1 dk	4	14	23	1,6	29	3	16	5,3	19	16	26	1,6	19	3	17	5,6

Çizelge 4.1. 5, 10, 15 ve 20 cm uzaklıktan yapılan UV denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve lipaz hidrolitik zon çapları (devam)

5 dk	5	6	16	3,2	23	3	16	5,3	24	3	18	6	16	5	19	3,8
10 dk	3	13	16	1,2	20	5	16	3,2	25	4	18	4,5	20	5	15	3
15 dk	2	5	18	3,6	11	3	16	5,3	17	3	15	5	18	5	19	3,8
20 dk	2	5	18	3,6	17	3	16	5,3	22	2	14	7	17	6	15	2,5

EI* = Hidroliz zonunun çapı / Koloninin çapı



Şekil 4.1. (A) Ana suş (EI = 2,4; hidrolitik zon çapı = 19 mm) ve (B) mutant EV4 (EI = 5,6; hidrolitik zon çapı = 17 mm)'nin Tribütirin ortamındaki lipaz hidrolitik zon çapları

UV mutasyon çalışmalarından letal (ölüm) oranları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Ana suş ile mutant suşlar kıyaslandığında EV1 ve EV4'de %72 oranında ölüm saptanırken, EV2'de bu oran %65 olarak ve EV3'te %68 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. *Bacillus cereus* ATA179'un hayatta kalma oranı üzerindeki UV radyasyonun etkisi

Bakteriler	Koloni Sayısı	Canlılık Oranı (%)	Ölüm Oranı (%)
Kontrol (Ana suş)	68	100	0
EV1	19	28	72
EV2	24	35	65
EV3	22	32	68
EV4	19	28	72

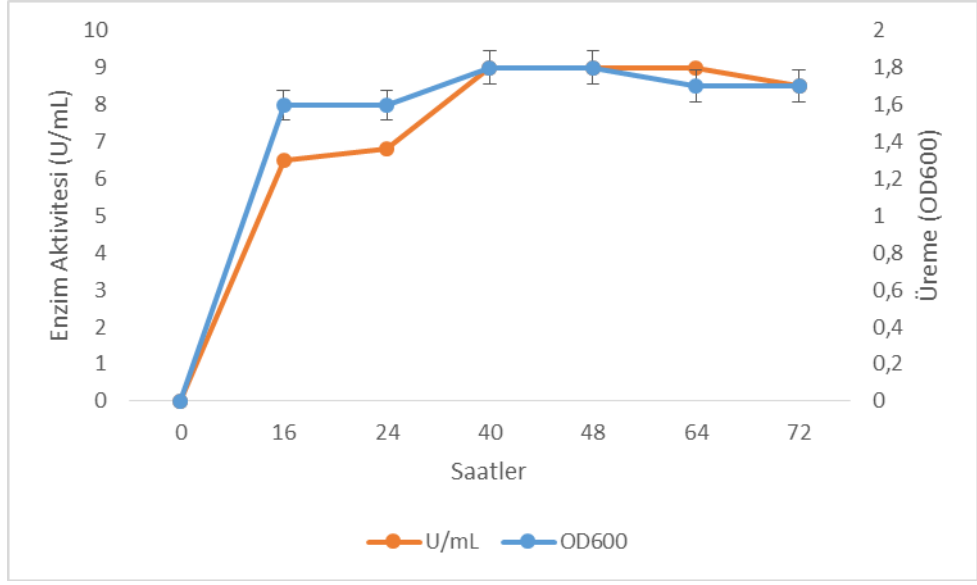
4.2. Mutantların Lipaz Üretim Kapasitesinin Kantitatif Olarak Saptanması

Yapılan mutasyon denemesi sonucunda elde edilen mutantların lipaz üretim potansiyellerini kantitatif olarak saptamak üzere, mutant suşlar (EV1, EV2, EV3 ve EV4) Çizelge 3.2'deki içeriği verilen besiyerinde 16-72 saatler arasında sıvı besi yerinde üretimleri yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, ana suş için maksimum enzim aktivitesi 48. saatte 6,6 U/ml ve maksimum üreme OD₆₀₀ 1,6 olarak 40. saatte tespit edilirken, mutant EV1 için 40. saatte 9 U/ml ve üreme OD₆₀₀ 1,8 olarak 40. saatte, mutant EV2 için 40. saatte 9,1 U/ml ve üreme OD₆₀₀ 1,8 olarak 40. saatte, mutant EV3 için 40. saatte 9 U/ml ve üreme OD₆₀₀ 1,9 olarak 48. saatte ve mutant EV4 için 24. saatte 10,6 U/ml ve üreme OD₆₀₀ 2,3 olarak 64. saatte belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

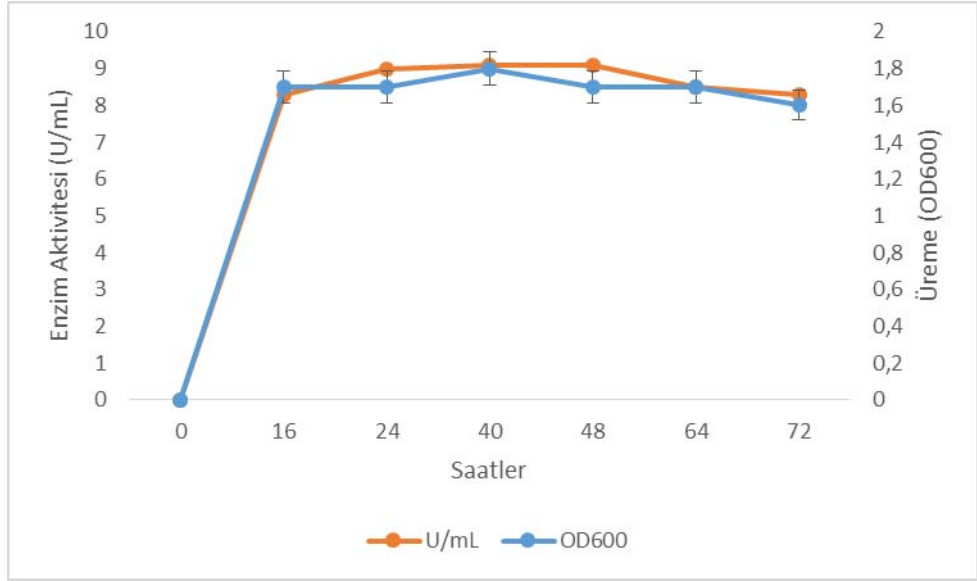
Mutant EV1'de enzim veriminin ana suşa göre %36 oranında artışı gösterirken, mutant EV2'te %38 oranında, mutant EV3'te %36 oranında ve mutant EV4'te ise %60 oranında artışı gösterdiği saptanmıştır. Mutant EV4 ana suşa ve diğer mutant suşlara göre daha yüksek enzim aktivitesine sahip olduğundan dolayı seçilmiş ve bu mutant *Bacillus cereus* EV4 olarak adlandırılmıştır. Mutant EV4'de maksimum enzimin üretimi durağan fazın başlangıcında elde edilmiştir. Üreme ve enzim üretiminin paralel olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). Çalışmalara bu mutant suşu ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.3. Ana suş *Bacillus cereus* ATA179 ve mutant EV1, EV2, EV3 ve EV4 suşlarının lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişim değerleri

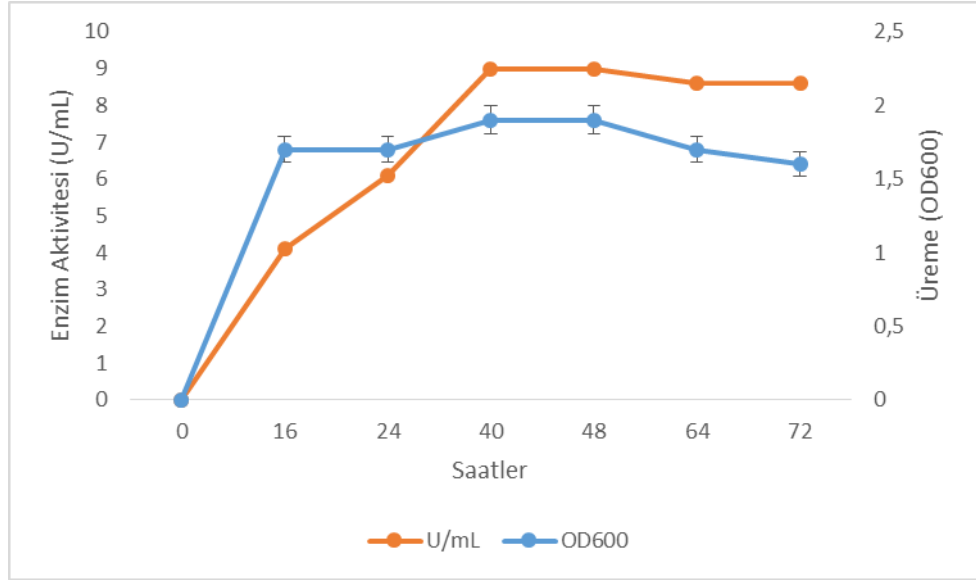
İnkübasyon süresi (saat)	<i>Bacillus cereus</i> ATA179		Mutant EV1		Mutant EV2		Mutant EV3		Mutant EV4	
	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL
16	1,3	3,1	1,6	6,5	1,7	8,3	1,7	4,1	1,8	9,8
24	1,4	3,0	1,6	6,8	1,7	9,0	1,7	6,1	1,8	10,6
40	1,6	4,1	1,8	9	1,8	9,1	1,9	9	2,2	9,16
48	1,5	6,6	1,8	9	1,7	9,1	1,9	9	2,2	8,6
64	1,5	5,4	1,7	9	1,7	8,5	1,7	8,6	2,3	8,1
72	1,2	4,1	1,7	8,5	1,6	8,3	1,6	8,6	2,2	8



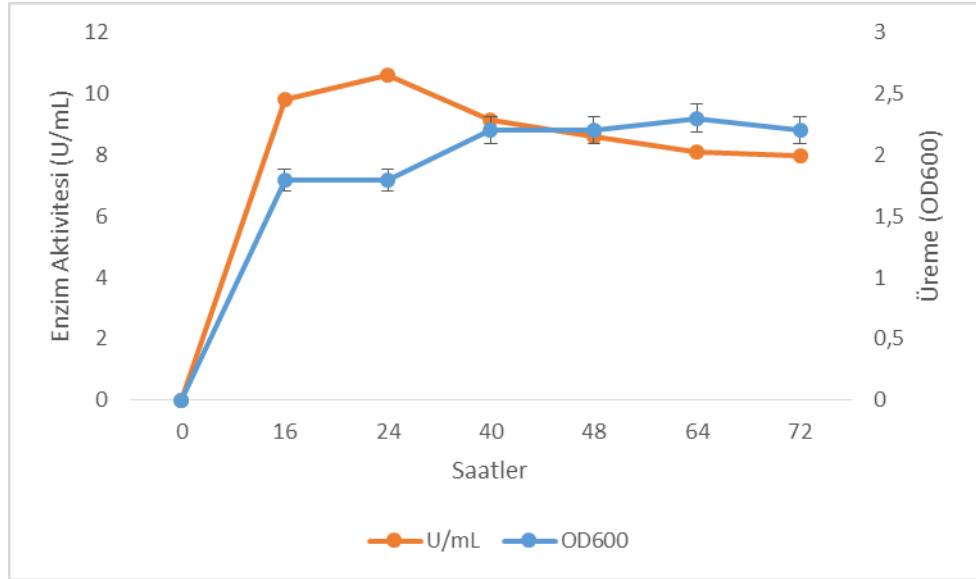
Şekil 4.2. EV1'in lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri



Şekil 4.3. EV2'nin lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimler



Şekil 4.4. EV3'ün lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri



Şekil 4.5. EV4'ün lipaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri

4.3. Karbon (C) Kaynaklarının Etkisi

Karbon kaynaklarının bakteri üremesi ve lipaz enzimi aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla 9 farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de içeriği verilen besiyerindeki karbon kaynağı (zeytinyağı) yerine aynı oranda (%1) glukoz,

sukroz, nişasta, maltoz gibi mono, di ve polisakkaritler, mısır yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, hint yağı ve hindistan cevizi yağı kullanılmıştır. EV4 mutantı farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerinde maksimum lipaz enzimi üretimin elde edildiği saat olan 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra alınan örneklerde lipaz enzimi aktivitesi ve üreme değeri tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6).

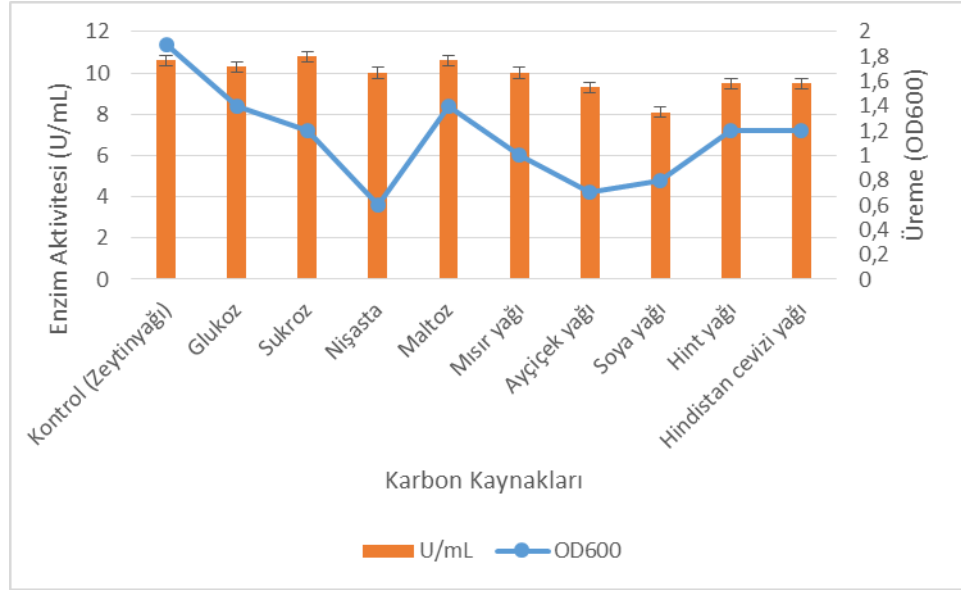
Mutant EV4'ün lipaz enzimi üretimi açısından karbon kaynağı tercih sıralaması sırayla sukroz > maltoz = kontrol > glukoz > nişasta = mısır yağı > hint yağı = hindistan cevizi yağı > ayçiçek yağı > soya yağı şeklinde saptanmıştır.

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

Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği sukroz içeren ortamdaki enzim üretimi (10,8 U/mL), kontrol olan temel besiyerine göre (10.6 U/mL) çok az bir artış göstermiştir (%2) (Çizelge 4.4). Sukrozlu ortamda mutant suş (10,8 U/mL) enzim üretimi açısından ana suşa (6,6 U/mL) göre de %64 oranında artışı göstermiştir.

Çizelge 4.4. Farklı karbon kaynaklarının üreme ve lipaz enzimi üretimi üzerine etkileri

Karbon Kaynakları	Üreme (OD₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağıl Aktivite (%)
Kontrol (Zeytinyağı)	1,9	10,6	100
Glukoz	1,4	10,3	97
Sukroz	1,2	10,8	102
Nişasta	0,6	10	94
Maltoz	1,4	10,6	100
Mısır yağı	1	10	94
Ayçiçek yağı	0,7	9,3	88
Soya yağı	0,8	8,1	76
Hint yağı	1,2	9,5	90
Hindistan cevizi yağı	1,2	9,5	90



Şekil 4.6. Karbon kaynaklarının lipaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri

4.4. Azot (N) Kaynaklarının Etkisi

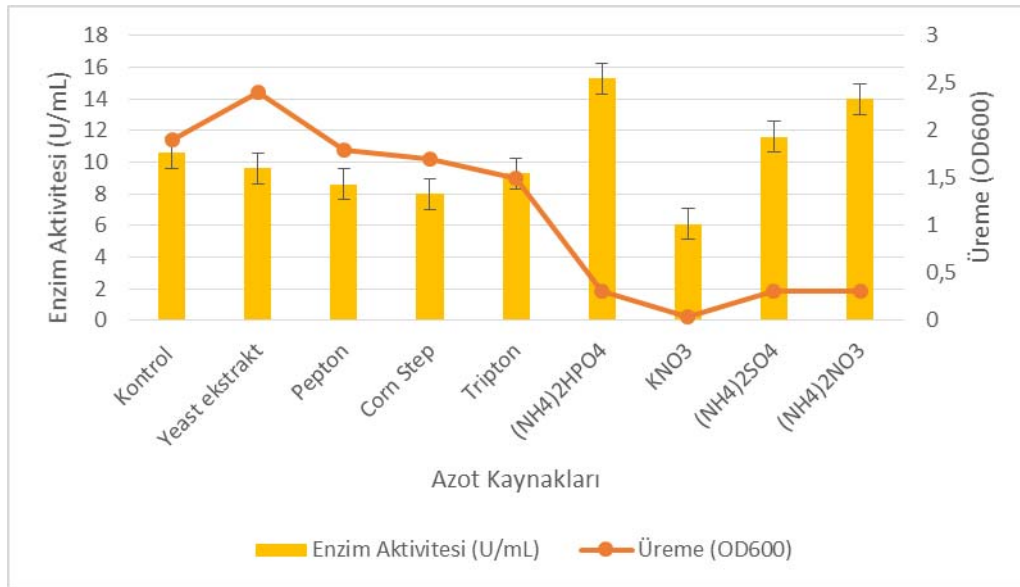
Üreme ortamında bulunan azot kaynaklarının bakteri üreme ve lipaz enzimi üretimi üzerine etkilerini belirlemek üzere kontrol ortamındaki pepton ve yeast ekstrakt yerine sırasıyla; %1 oranında organik azot kaynakları olarak yeast ekstrakt, pepton, tripton, corn step ve inorganik azot kaynakları olarak $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, KNO_3 kullanılmıştır. Farklı azot kaynakları içeren besi yerlerinde 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve 24. saatte alınan örneklerin üreme değerleri ve enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge şeklinde verilerek, en yüksek enzim aktivitesinin azot kaynağı olan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ varlığında 15,3 U/mL olarak saptanmıştır (Çizelge 4.5, Şekil 4.7). Bu ortam kontrol olan temel besiyeri ile kıyaslandığında %44 oranında bir enzim verimi elde edilmiş ve mutant suşun enzim verimi ana suşa (6,6 U/mL) göre de %132 oranında artışı göstermiştir. Ayrıca $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ varlığında %32 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ varlığında ise %9 oranında enzim verimi sağlanmıştır.

Mutant EV4'ün lipaz enzimin üretimi açısından organik ve inorganik azot kaynağı tercihi sırasıyla; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{NO}_3 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{kontrol} > \text{yeast ekstrakt} > \text{tripton} > \text{pepton} > \text{corn step} > \text{KNO}_3$ şeklindedir (Çizelge 4.5).

Maksimum bakteri üremesinin ise sırayla; yeast ekstrakt > kontrol > pepton > corn step > tripton > $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 = (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = (\text{NH}_4)_2\text{NO}_3 > \text{KNO}_3$ ortamlarında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Farklı azot kaynaklarının lipaz enzimi üretimi ve üremesi üzerine etkileri

Azot Kaynakları	Üreme (OD ₆₀₀)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağlı Aktivite (%)
Kontrol (Pepton + Yeast ekstrakt)	1,9	10,6	100
Yeast ekstrakt	2,4	9,6	91
Pepton	1,8	8,6	81
Tripton	1,5	9,3	75
Corn Step	1,7	8	75
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,3	15,3	144
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,3	11,6	109
$(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$	0,3	14	132
KNO_3	0,03	6,1	58



Şekil 4.7. Azot kaynaklarının lipaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri

4.5. Metal İyonu Kaynaklarının Etkisi

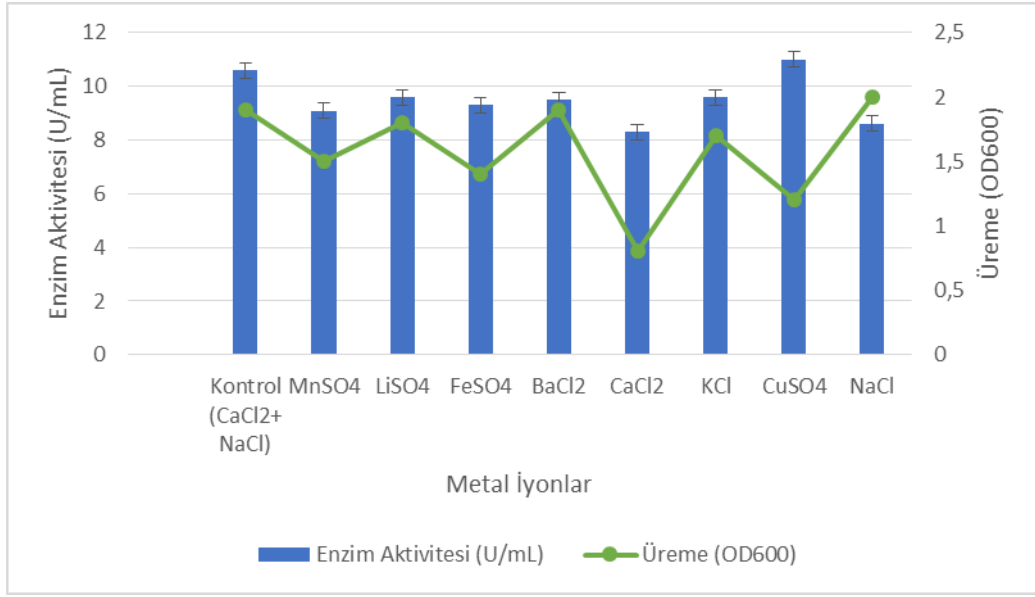
Metal iyonlarının bakteri üremesi ve lipaz enzimi üretimi üzerine etkisinin araştırması amacıyla kontrol ortamında bulunan $\text{CaCl}_2 + \text{NaCl}$ yerine toplam miktarda (%0,055) farklı metal iyonları kullanılmıştır. Bunlar LiSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 , BaCl_2 , KCl , NaCl ve CuSO_4 'tır. Farklı metal kaynakları içeren besi yerlerinden 24. saatte alınan örneklerin üreme değerleri ve enzim aktivitesi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8'de görülebildiği gibi kontrole (10,6 U/mL) göre daha yüksek aktivite değeri metal kaynağı CuSO_4 11 U/mL olarak belirlenmiş ve %4'lük bir enzim verimi elde edilmiştir. Ana suşa (6,6 U/mL) göre de %67 oranında verim artışı göstermiştir.

Lipaz enzimi üretiminde metal kaynağını sırası ile $\text{CuSO}_4 > \text{kontrol} > \text{KCl} = \text{LiSO}_4 > \text{BaCl}_2 > \text{FeSO}_4 > \text{MnSO}_4 > \text{NaCl} > \text{CaCl}_2$ şeklinde tercih ettiği görülmüştür (Çizelge 4.6). Kontrol temel besiyerinde birlikte bulunan CaCl_2 ve NaCl ayrı ayrı denemeye alınmış olmuş ve enzim üretiminde CaCl_2 ve NaCl her ikisi yalnız olduklarında enzim aktivitesinin düştüğü saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Maksimum bakteri üremesinin ise sırayla; $\text{NaCl} > \text{BaCl}_2 = \text{kontrol} > \text{LiSO}_4 > \text{KCl} > \text{MnSO}_4 > \text{FeSO}_4 > \text{CuSO}_4 > \text{CaCl}_2$ ortamlarında gerçekleştiği saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Metal kaynaklarının lipaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri

Metal İyonlar	Üreme (OD600)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağlı Aktivite (%)
Kontrol ($\text{CaCl}_2 + \text{NaCl}$)	1,9	10,6	100
LiSO_4	1,8	9,6	91
MnSO_4	1,5	9,1	86
FeSO_4	1,4	9,3	88
CaCl_2	0,8	8,3	78
BaCl_2	1,9	9,5	90
KCl	1,7	9,6	91
NaCl	2	8,6	81
CuSO_4	1,2	11	104



Şekil 4.8. Metal iyonlarının lipaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri

4.6. Maksimum Lipaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Belirlenmesi

En yüksek lipaz üretiminin saptandığı karbon, azot ve metal iyonları şeklinde besinsel faktörler bir araya getirilerek yeni oluşturulacak bir modifiye ortamda lipaz enzimi veriminin artırılması yoluna gidilmiştir.

Yeni modifiye ortamda maksimum verimi sağlayan karbon kaynağı olarak %1 sukroz, azot kaynağı olarak %1 (NH₄)₂HPO₄ ve metal iyonu olarak %0,055 CuSO₄ kullanılarak, 24 saat boyunca ön inkübasyon yapılmış kültürden %5 oranında aşılama yapılmış ve lipaz enzimin üretimi 37°C, pH 7.0, 150 rpm'de 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda modifiye ortamda enzim aktivitesi 14 U/mL olarak belirlenmiştir. Bu ortamdan elde edilen değer kontrol (10,6 U/mL) ile kıyaslandığında %32 oranında bir enzim verimi elde edilmiştir (Çizelge 4.7). Yeni oluşturulan modifiye ortamda EV4 mutant suş (14 IU/mL) ana suşa (6,6 IU/mL) göre de 2.1 kat enzim üretim artışı göstermiştir.

Çizelge 4.7. Kontrol ortamı ile modifiye ortamda üreme ve lipaz enzimi üretim kapasitesinin karşılaştırılması

Kontrol Ortam (Kumar ve ark. 2005)	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)	Modifiye Ortam	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD ₆₀₀)
%1 Zeytinyağı	10,6	1,9	%1 Sukroz	14	0,92
%0,5 Pepton + %0,5 Yeast Ekstrakt			%1 (NH ₄) ₂ HPO ₄		
%0,05 NaCl+ %0,005 CaCl ₂			%0,055 CuSO ₄		
37°C			37°C		
pH 7.0			pH 7.0		
150 rpm			150 rpm		
%5 Aşılama			%5 Aşılama		
Ön İnkübasyon 24 Saat			Ön İnkübasyon 24 Saat		

4.7. Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Enzimin kısmi olarak saflaştırılması amacıyla EV4 suşu modifiye ortamda üretilmiştir. Üretim sonunda kültür ortamı +4'de soğutmalı santrifüjde 6000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant alınıp ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır. Ham enzim çözeltisi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemlerinden geçirilerek lipaz enzimin kısmi olarak saflaştırılmasını gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma adımlarında elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein tayinleri standart koşullar altında yapılmıştır. Saflık SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

Kısmi saflaştırma basamağında ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Bunun için ham enzim çözeltisi %20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 konsantrasyonlarındaki amonyum sülfat varlığında çöktürmeleri yapılmıştır. Enzimin en iyi çöktüğü amonyum sülfat konsantrasyonu %40 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat çöktürmesi

Fraksiyonlar (%)	Enzim Aktivitesi (U/mL)
20	27
30	27,6
40	33
50	10,4
60	8,8
70	9,6
80	9,4

Lipaz enziminin saflaştırma basamakları Çizelge 4.9’de verilmiştir. Enzim 2,9 kez saflaştırılmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enzim daha sonra karakterize edilmiştir.

Çizelge 4.9. Lipaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim ¹ (%)	Saflık ² (Kez)
Ham enzim	100	5,8	1400	265	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (%40)	13	0,8	429	530	31	2
Diyaliz	10	0,3	216	708	15	2,7
Ultrafiltrasyon	5	0,14	105	766	8	2,9

¹Verim, toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

²Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

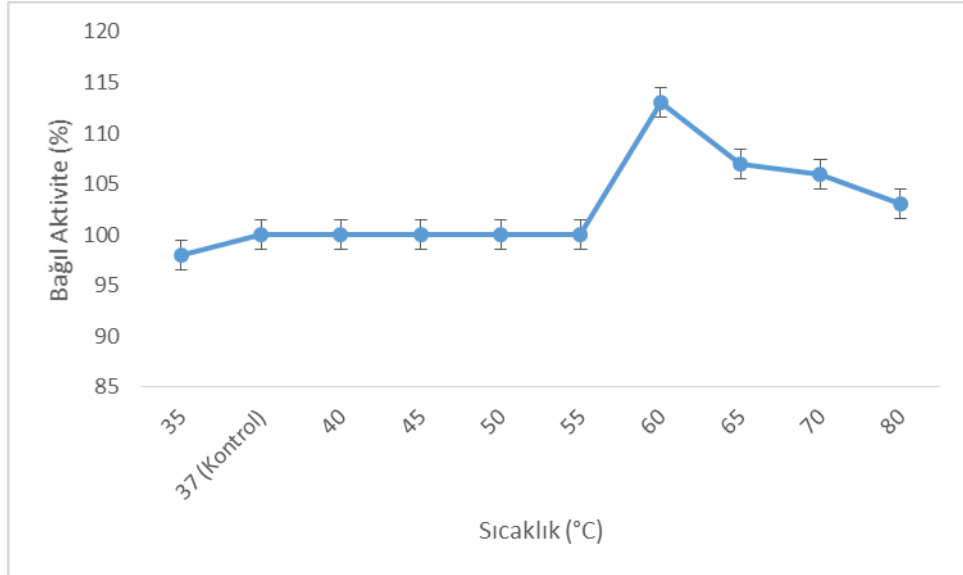
4.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Kısmi saf enzim üzerine sıcaklık derecelerinin etkilerini belirlemek için 35, 37 (kontrol), 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80 °C’lerde aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol olarak kullanılan 37 °C sıcaklık derecesindeki sonuç %100 kabul edilerek, aktivite değerleri % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzimin 60°C’de en yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge

4.10 ve Şekil 4.9). Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi kontrole göre %13 artış göstermiştir. Sıcaklığın artırılması ile aktivite değerleri de artmıştır. Ayrıca lipaz enzimin yüksek sıcaklarda (60-80°C) aktivitesini koruduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.10. Lipaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Bağlı Aktivite (%)
35	98
37 (Kontrol)	100
40	100
45	100
50	100
55	100
60	113
65	107
70	106
80	103

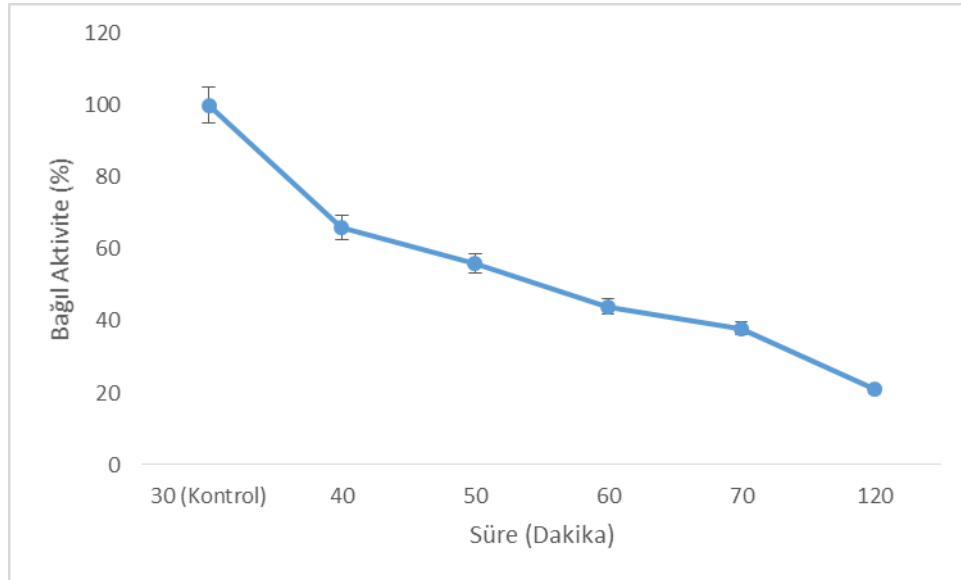


Şekil 4.9. Sıcaklığın kısmi saf enzim üzerine etkisi bağlı aktivite

Lipaz enzimin maksimum aktivite gösterdiği 60°C’de enzimin stabilitesine saptanması için enzim çözeltisi su banyosunda 30 (kontrol), 40, 50, 60, 70 ve 120 dakika süre ile tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kısmi saf enzimin 30 dakikaya kadar aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11) ve sürenin artması ile enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.10).

Çizelge 4.11. Sıcaklık stabilitesinin lipaz enzimi üzerine etkisi

60 °C (Dakika)	Bağlı Aktivite (%)
30 (Kontrol)	100
40	66
50	56
60	44
70	38
120	21



Şekil 4.10. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın stabilitesi bağlı aktivite

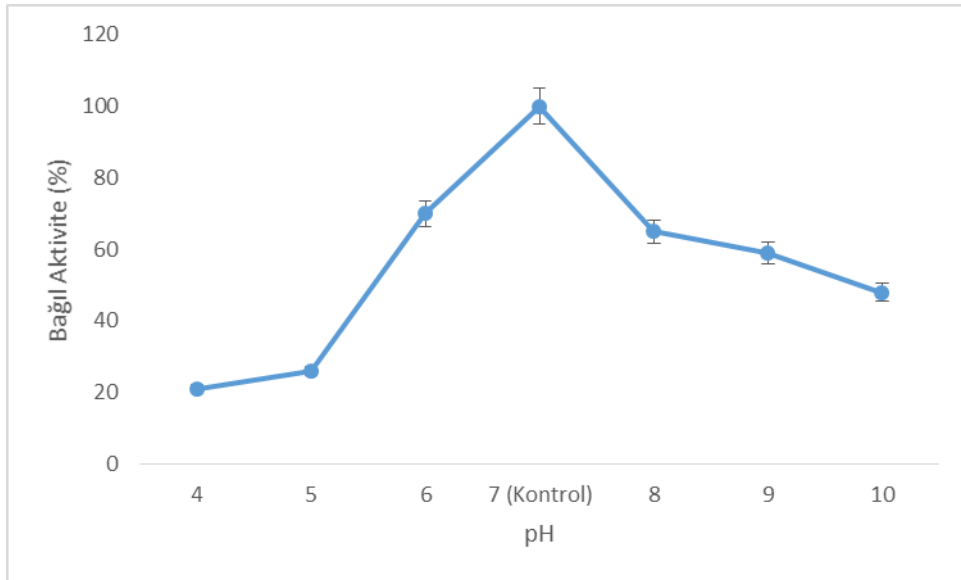
4.9. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Lipaz enziminin optimum pH değerlerini belirlemek üzere enzim 4.0-10.0 arası pH'larda hazırlanan substrat çözeltilerinde aktivite tayin edilmiştir. Yapılan çalışmalar

sırasında pH 7.0’de elde edilen sonuçlar kontrol olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçlar buna göre % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.12 ve Şekil 4.11’de de görüldüğü gibi enzimin optimum pH değerinin 7.0 olduğu belirlenmiştir. Enzimin asidik ortamdaki ziyade alkali ortamda aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.12. Enzim üzerine pH’nın etkisi

pH	Bağıl Aktivite (%)
4	21
5	26
6	70
7 (Kontrol)	100
8	65
9	59
10	48

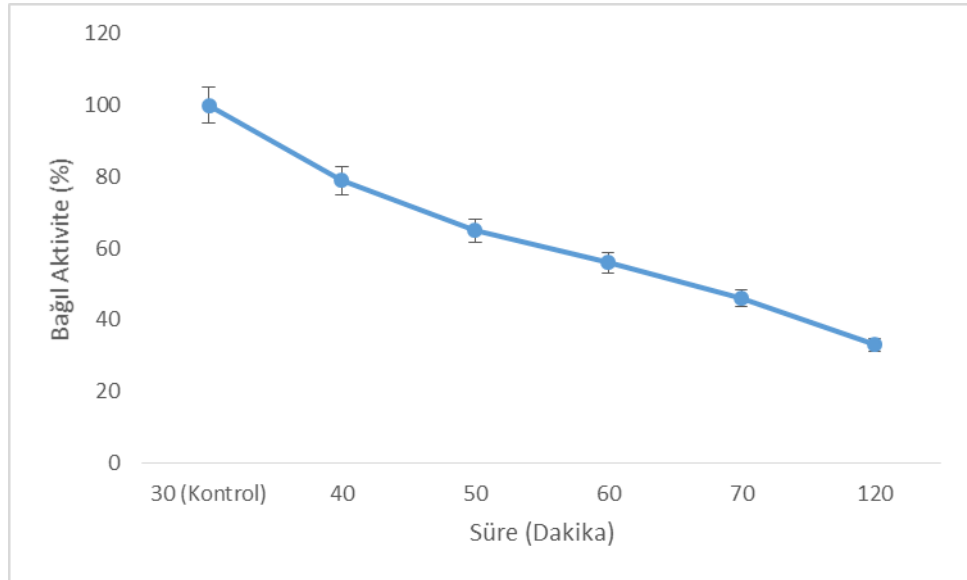


Şekil 4.11. Kısmi saf enzim aktivitesi üzerine pH’nın etkisi bağıl aktivite

Lipaz enziminin pH stabilitesini belirlemek üzere enzim pH 7.0’da 120 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre enzim 30 dakika boyunca aktivitesini korurken, sürenin artması ile 120 dakika sonunda %67 oranında aktivite kaybı saptanmıştır (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.12).

Çizelge 4.13. pH stabilitesinin lipaz enzimi üzerine etkisi

pH 7.0 (Dakika)	Bağlı Aktivite (%)
30 (Kontrol)	100
40	79
50	65
60	56
70	46
120	33



Şekil 4.12. Kısmi saf enzim aktivitesi üzerine pH'nın stabilitesi bağlı aktivite

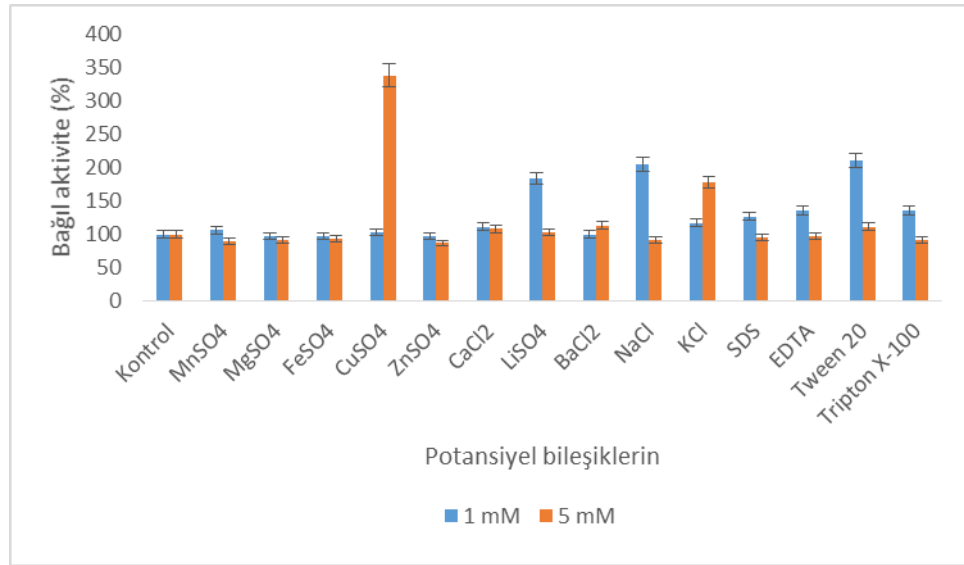
4.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Potansiyel Bileşiklerin Etkisi

Lipaz enzimi aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisini belirlemek üzere enzim 1 ve 5 mM $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, $LiSO_4$, $BaCl_2$, $NaCl$, KCl , SDS, EDTA, Tween 20 ve Triton X-100 gibi farklı bileşenlerle inkübe edilmiştir. Hiçbir potansiyel bileşik bulunmayan substrat çözeltisi ile elde edilen aktivite değeri kontrol olarak kullanılmış ve elde edilen değerler buna göre % olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.17).

Genelde 1 mM konsantrasyonundaki potansiyel bileşikleri varlığında enzim aktivitesinin 5 mM'a göre daha fazla arttırdığı saptanmıştır. Bununla beraber CuSO₄, CaCl₂, LiSO₄, KCl ve BaCl₂ iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkili bir şekilde aktivatör etki yaptığı tespit edilmiştir. Diğer metal iyonları lipaz üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir. En iyi sonuç 5mM CuSO₄ olduğu ve enzim aktivitesi kontrole göre 3,3 kat arttığı saptanmıştır. 5 mM KCl varlığında da %78 oranında aktivitede artış görülmüştür. Noniyonik bir sürfektan olan Triton X-100, anyonik bir deterjan olan SDS ve şelatlayıcı ajan olan EDTA 1 mM olarak varlığında da enzim aktivitesinde artış olmuştur. Ancak 5mM varlığında %2-9 oranında enzim aktivitesinin düştüğü saptanmıştır. (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.13).

Çizelge 4.14. Potansiyel bileşiklerin enzim üzerine etkileri

Potansiyel bileşiklerin	Bağlı aktivite (%)	
	1mM	5mM
Kontrol (potansiyel bileşik yok)	100	100
MnSO ₄	106	89
MgSO ₄	97	91
FeSO ₄	98	94
CuSO₄	103	339
ZnSO ₄	97	87
CaCl ₂	111	108
LiSO ₄	184	103
BaCl ₂	100	113
NaCl	205	91
KCl	117	178
SDS	127	96
EDTA	136	98
Tween 20	211	111
Tripton X-100	136	91



Şekil 4.13. Farklı potansiyel bileşiklerin saf enzim üzerine etkileri

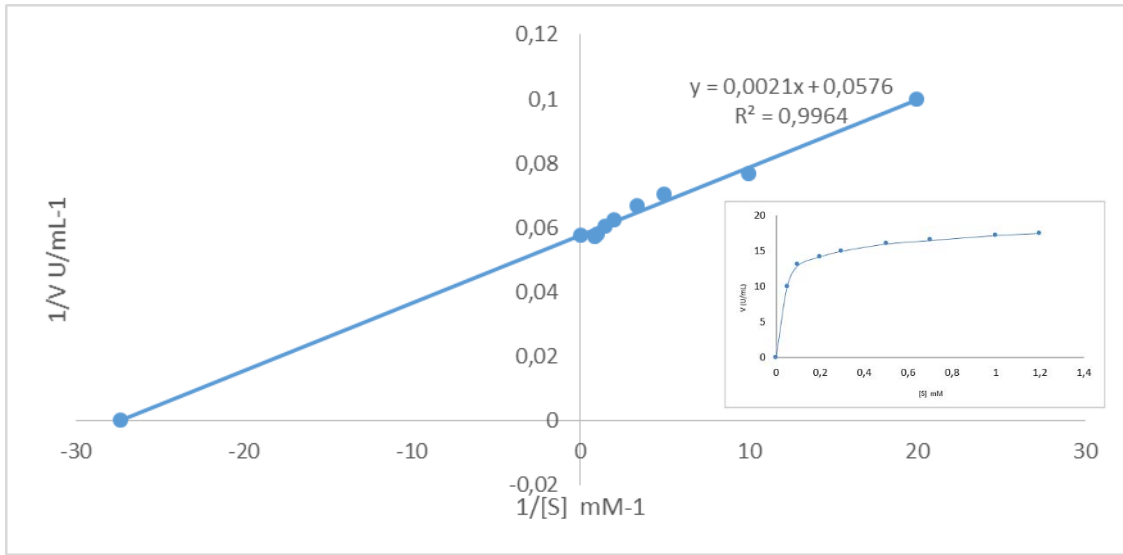
4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Lipaz enzimin aktivitesi üzerine substratın konsantrasyonunun etkisi belirlemek için 0,05-1,2 mM arasındaki konsantrasyonlarda tribütirin 37 °C’de ve pH 7.0’de belirlenen inkübasyon süresinde ortama ilave edilerek standart deney koşullarında enzim aktivitesi tayin edilmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Substart Konsantrasyonu (mM)	Enzim Aktivitesi (U/ml)
0	0
0,05	10
0,1	13
0,2	14,2
0,3	15
0,5	16
0,7	16,5
1	17,2
1,2	17,5

Substrat konsantrasyonunun %0,1'den itibaren bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin kademeli olarak arttığı saptanmıştır. Lipazın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak Lineweaver-Burk $y = ax + b$ doğru grafiğinden yararlanılmıştır. Lineweaver-Burk grafiği, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak çizilmiştir (Şekil 4.14). Bu grafikten elde edilen doğrunun denklemi ise, $y = 0,0021x + 0,0576$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise $R^2 = 0,9964$ bulunmuştur. Denklemde doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0,0576$ değerini verdiğinden, V_{max} değeri 17,36 U/mL olarak hesaplanmıştır ve K_m değeri ise 0,036 mM olarak bulunmuştur.



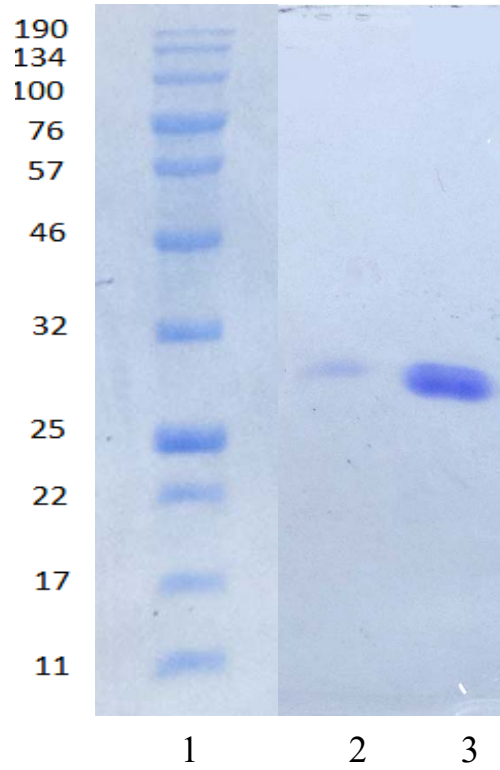
Şekil 4.14. Lipaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği ve Michaelis-Menten grafiği).

4.12. Enzimin Moleküler Ağırlığının Tespiti

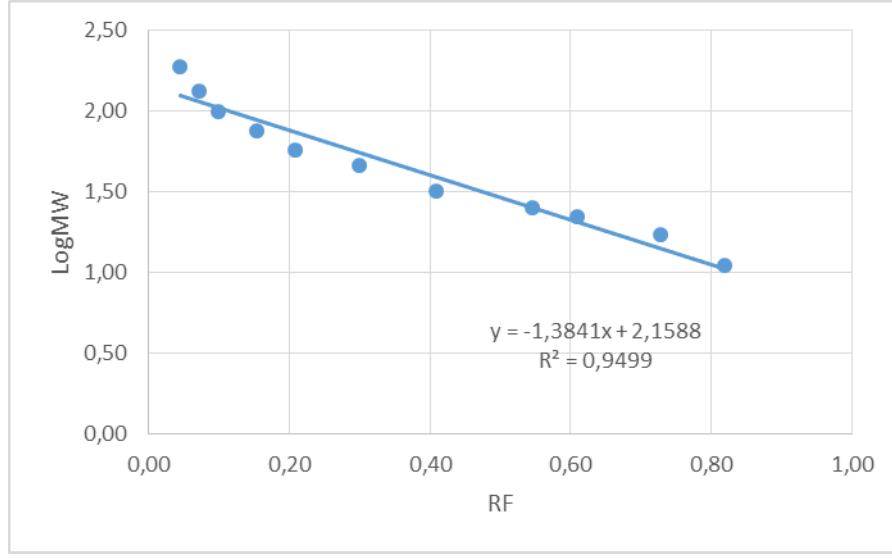
Lipaz enzimin moleküler ağırlığını belirlemek için, elektroforez jeline enzim örneği yanında moleküler ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisi de uygulanmış ve elektroforez işlemi sonucunda oluşan bantların (Şekil 4.15) R_f değerlerinden yararlanılarak aşağıda verilen formüle göre enzim ve standart protein çözeltisinin göreceli hareketlilik değerleri hesaplanmıştır.

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

Moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinlerin göreceli hareketlilik değerleri ve molekül ağırlıkları ile bir standart eğri elde edilmiştir (Şekil 4.16). Elde edilen grafiğin analizi yapılarak, lipaz örneğin moleküler ağırlığı tespit edilmiştir. Ham enzim ve konsantre edilen enzim örneğinin moleküler ağırlığının aynı olduğu, Şekil 4.15’da görüldüğü gibi tek bir bant şeklinde bir sırada yerleştiği tespit edilmiştir. Koyu bant şeklinde görülen enzimin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 28,2 kDa olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.15. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bantlarının görünümü. 1. Marker 2. Ham enzim 3. Konsantre enzim



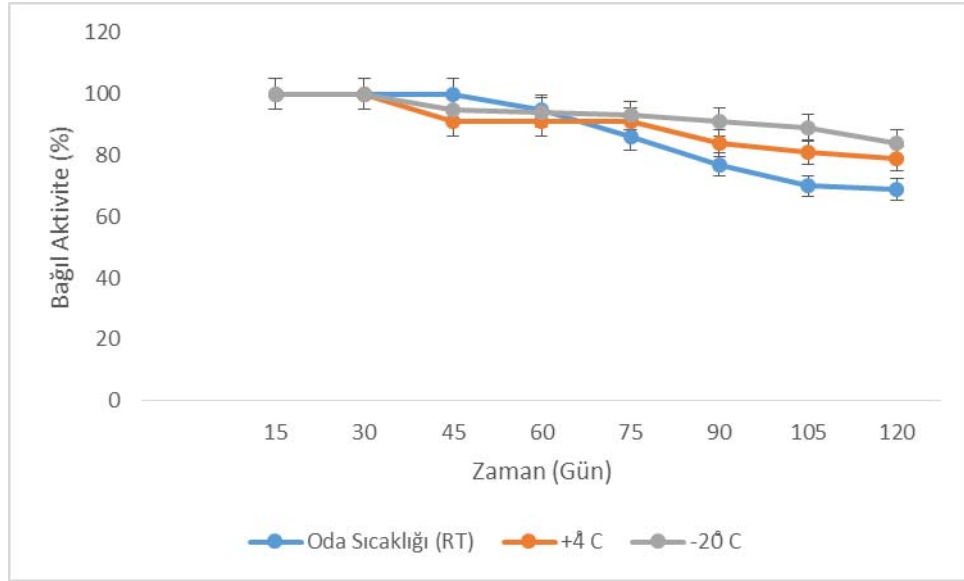
Şekil 4.16. Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri

4.13. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi

Ham enzimin depolanma sıcaklığını belirlemek için mutant bakteriden üretilen ham enzimin başlangıç aktivitesi tayini yapıldıktan sonra enzim örnekleri ellişer mL olacak şekilde oda sıcaklığında (RT), +4 °C' de ve -20 °C' de olmak üzere 3 ayrı gruba ayrılıp depolanmış ve her 15 günde bir aktivitelerini tayin edilerek depolama stabilitesi saptanmıştır. Yapılan çalışmada oda sıcaklığında (RT) 60 güne kadar lipaz enzimin aktivitesi hemen hemen korurken, bu süre +4°C'de 75 güne ve -20 °C'de ise 90 güne kadar bulunmuştur. Sürenin artması ile enzim aktivitesinde düşüşler gözlenmiştir. En iyi korumanın -20 °C'de olduğu belirlenmiş ve 120 günde sadece %16 oranında bir aktivite kaybı olmuştur. En fazla kayıp ise oda sıcaklığındaki depolamada olmasını saptanmıştır. (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.17).

Çizelge 4.16. Ham enzimin depolanma stabilitesi

Zaman (Gün)	Oda Sıcaklığı (RT)	+4°C	-20°C
	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Aktivite (%)
15	100	100	100
30	100	100	100
45	100	91	95
60	95	91	94
75	86	91	93
90	77	84	91
105	70	81	89
120	69	79	84



Şekil 4.17. Farklı sıcaklıkta ham enzimin depolanma stabilitesi

4.14. Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanım Potansiyeli: Lipazın sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi

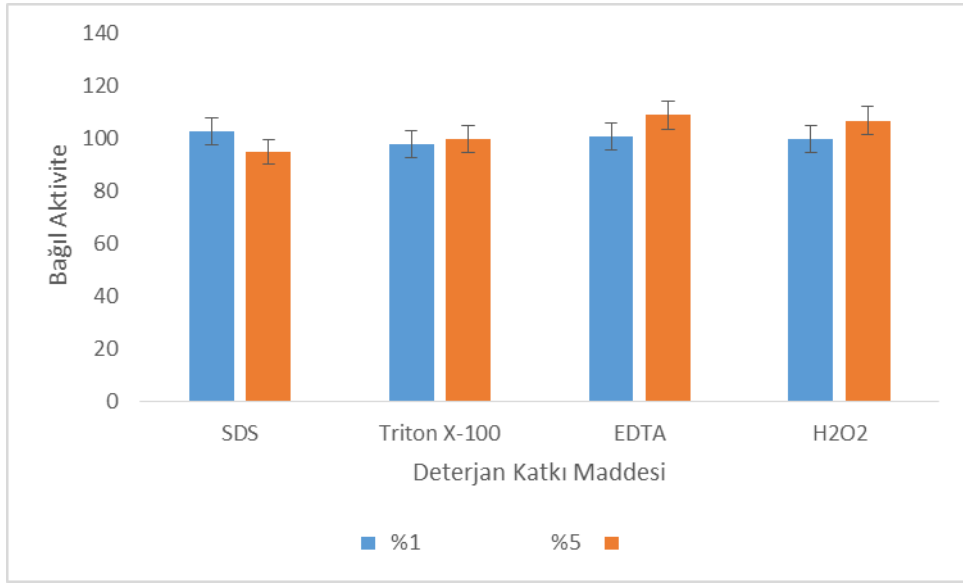
Lipaz enzimin aktivitesine deterjan katkı maddelerinin etkisinin incelenmesi amacıyla %1 ve %5 konsantrasyonlarda olacak şekilde SDS, Triton X-100, EDTA ve H₂O₂ ilave edilerek, 100 rpm, 60 ve 70°C koşullarında 1 saat boyunca lipaz enzimi bu deterjan

katkı maddeleri ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda lipaz enziminin aktivitesini tayin edilmiştir. Lipaz aktivitesindeki değişim, başlangıç aktivite değeri (%100) ile kıyaslanarak bağlı aktivite (%) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.17).

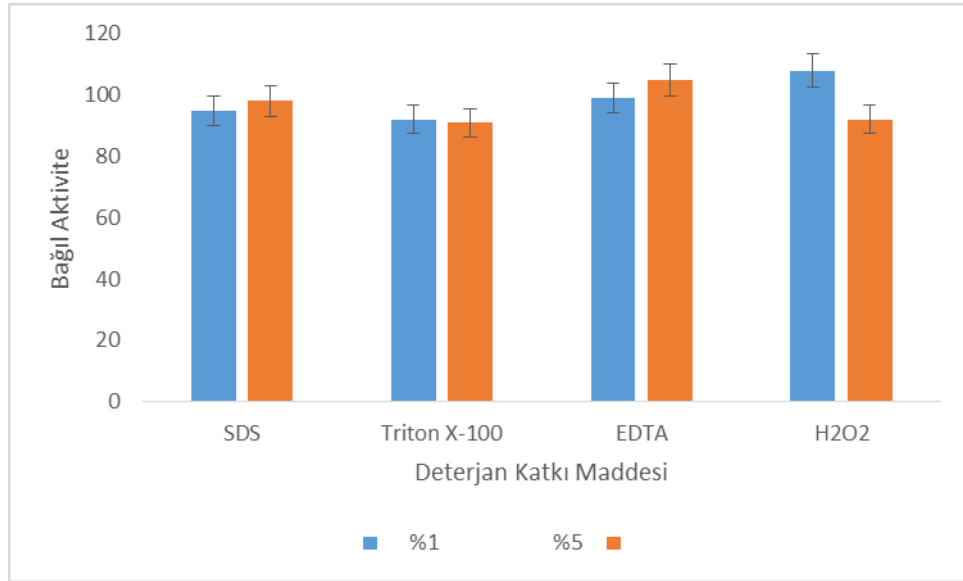
Yapılan çalışmalar sonucunda lipaz enzimin başlangıç aktivitesine göre; 60°C’de %5 EDTA içeren ortamda enzim aktivitesinin %9 oranında arttığı görülmüştür. 60 ve 70 °C’lerde denenen tüm katkı maddeleri varlığında enzim aktivitesinin hemen hemen korumasını gözlenmiştir. Lipaz enzimin katkı maddeleri varlığından etkilenmediği sonucuna ulaşılmıştır. Hatta enzimin 60°C’de bu katkı maddeleri varlığında aktivitesinin az da olsa arttığı saptanmıştır (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

Çizelge 4.17. Liyofilize edilmiş lipaz enzimi aktivitesine farklı sıcaklık ve farklı konsantrasyonlardaki deterjan katkılarının etkisi

Deterjan Katkı Maddesi	60°C’de Bağlı Aktivite (%)		70°C’de Bağlı Aktivite (%)	
	%1	%5	%1	%5
SDS	103	95	95	98
Triton X-100	98	100	92	91
EDTA	101	109	99	105
H ₂ O ₂	100	107	108	92



Şekil 4.18. Liyofilize edilmiş lipaz enzimi aktivitesine 60°C’de farklı konsantrasyonlardaki deterjan katkılarının etkisi



Şekil 4.19. Liyofilize edilmiş lipaz enzimi aktivitesine 70°C’de farklı konsantrasyonlardaki deterjan katkılarının etkisi

4.15. Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanım Potansiyeli: Enzimin deterjandaki raf ömrü

Enzimin raf ömrü, enzimin aktivitesinin kalıcılığının araştırılması amacıyla enzimsiz deterjan (A firması) ve enzimli deterjan (B firması) ile karıştırılmış liyofilize edilmiş

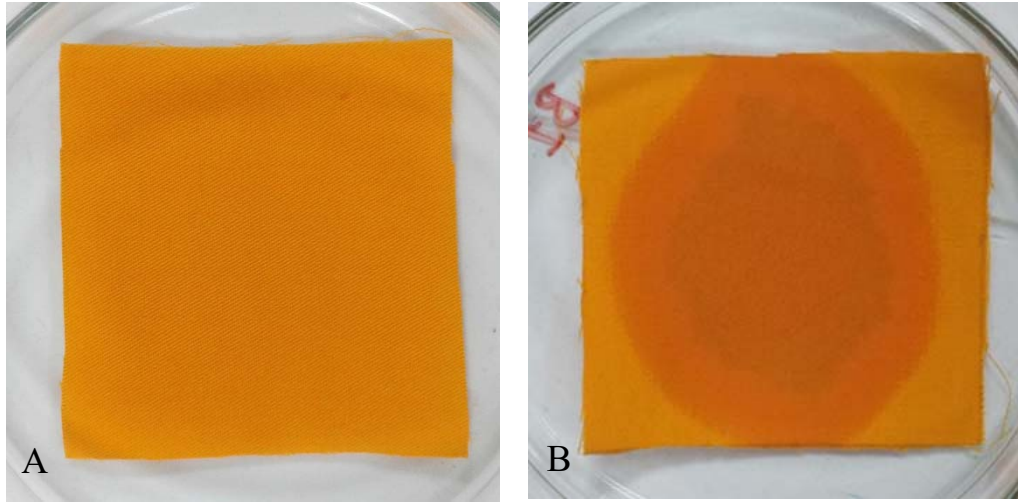
enzimin oda sıcaklığında her 30 günde bir aktivitelerine bakılarak stabilitesini belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda enzimsiz deterjan varlığında lipaz enzimin aktivitesinin kontrole göre % 64,5 oranında korumasını gözlenmiş ve bunu 90. güne kadar aktivitesi stabil kaldığı saptanmıştır. Enzimli deterjan varlığında ise enzimin aktivitesi %59 oranında koruduğu görülmüş ve 90. güne kadar bu aktivitesi stabil kaldığı da gözlenmiştir. Yapılan çalışma sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Enzimin deterjandaki raf ömrü

Zaman (Gün)	Bağıl Aktivite (%)	
	Enzimsiz Deterjan	Enzimli Deterjan
Kontrol (Deterjan yok)	100	100
0	64	59
30	64	58
60	64	58
90	64	58

4.16. Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanım Potansiyeli: Kirletilmiş kumaşlara lipaz uygulanması

Liyofilize lipaz enziminin yanmış yağı ile kirletilmiş kumaşlardaki etkisinin belirlemesi için oluşturulan deney seti sonucunda, işlem uygulanmamış kumaş örnekleri standart kabul edilerek, enzim ve deterjan uygulamaları sonrası oluşan delta E değerleri renk ölçüm spektrofotometresi kullanılarak elde edilmiştir.

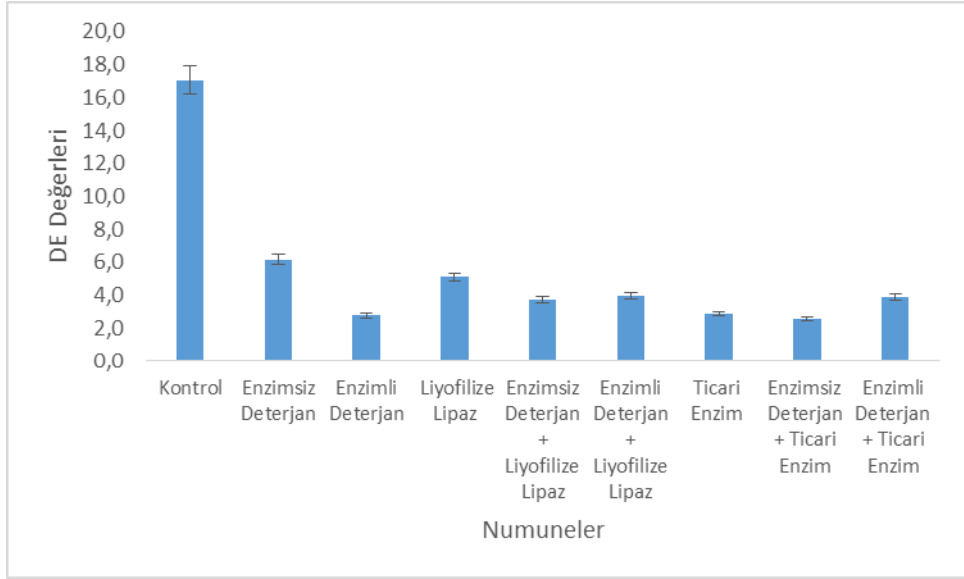


Şekil 4.20. A) Kirlenmemiş kumaş, B) Yemeklik yanmış yağ ile kirlenmiş kumaş

Yapılan çalışma sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.19’de verilmiştir. Hiçbir işlem uygulanmamış kumaştan elde edilen delta E (DE) değeri standart olarak alınmış (kontrol) ve sonuçlar buna göre değerlendirilmiştir. Burada DE değeri kontrol değerinden düşüğe kumaştaki kirliliği giderimi artmaktadır. Yapılan çalışmada, yanmış yağ ile kirlenilen kumaştan alınan DE değeri (kontrol) sadece lipaz uygulandıktan sonra yapılan ölçümlerle kıyaslandığından %30 oranında daha düşük DE değeri elde edilmiştir. Bu da lipaz enziminin etkili olduğunu göstermiştir. Lipaz enzimi, enzimli deterjanlardan daha çok enzimsiz deterjanlarla birlikte uygulandığında etkisini göstermiştir. Diğer yandan enzimsiz deterjan ile yapılan ölçümde DE değeri yüksek çıkmıştır. Bu da deterjanın tek başına etkili olmadığını göstermektedir. En iyi sonuç ticari enzim+enzimsiz deterjan uygulanmasında elde edilmiştir (Şekil 4.21).

Çizelge 4.19. Liyofilize lipaz enziminin uygulandığında elde edilen DE değerleri

	DE Değerleri		
	Birinci Deneme	İkinci Deneme	Ortalama
Kontrol (Kirlenmiş kumaş)	20,1	14,0	17,0 ± 4,3
Enzimsiz Deterjan	7,2	5,1	6,2 ± 1,5
Enzimli Deterjan	2,6	2,9	2,8 ± 0,2
Liyofilize Lipaz	5,6	4,6	5,1 ± 0,7
Enzimsiz Deterjan + Liyofilize Lipaz	3,4	4,1	3,7 ± 0,5
Enzimli Deterjan + Liyofilize Lipaz	3,4	4,5	4,0 ± 0,8
Ticari Enzim	2,8	3,0	2,9 ± 0,1
Enzimsiz Deterjan + Ticari Enzim	3,3	1,9	2,6 ± 1,0
Enzimli Deterjan + Ticari Enzim	3,9	3,9	3,9 ± 0,0



Şekil 4.21. Yemeklik yanmış yağ ile kirlenmiş kumaşlara farklı deterjan, deterjan+enzim uygulaması sonrası elde edilen delta E değerlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücrelerde oldukça önemli görevleri olan enzimler farklı kullanım amaçlarıyla artık güncel yaşantıma girmiştir. Bugün, yaklaşık 4000 enzim bilinmektedir ve bunlardan yaklaşık 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır (Andualema ve Gessesse 2012). Enzimler, yüksek özgülükleri ve ekonomik avantajları nedeniyle herhangi bir çevresel etki yaratmadan endüstri alanlarında biyolojik katalizörler olarak kullanılmaktadır.

Endüstriyel enzimler arasında önemli bir enzim olan lipaz enzimi mantar, maya ve bakteri gibi mikroorganizmalardan, hayvanlardan ve bitkilerden elde edilebilmektedir. Ancak, mikroorganizma kaynaklı lipazlar, sayısız endüstriyel uygulama potansiyeli, kültür işleme kolaylığı ve üretim sırasında fazla miktarda elde edilebilme kapasitesine sahip olduğundan dolayı endüstri alanlarında diğer kaynaklı lipazlara göre daha fazla kullanılmaktadır (Pratish ve ark. 2013). Lipazlar, gıda, deterjan, kozmetik, organik sentezi, ilaç, kimyasal işleme, biyosülfonat sentezi, kâğıt imalatı ve zirai kimyasal endüstri gibi endüstriyel alanlarda büyük bir uygulama alanı bulmaktadır (Sharma ve ark. 2002, Houde ve ark. 2004). Deterjan üretiminde lipaz enzimlerin kullanılması, deterjanların sert lekeleri çıkarma kabiliyetini arttırmaktadır. Günümüzde lipazlar, selülazlar, proteazlar, ve amilazlar kombinasyon halinde birçok çamaşır deterjanı ürününde bulunmaktadır (Jeon ve ark. 2009).

Son birkaç yıl içinde lipaz enzimi çeşitli endüstriyel süreçlerde potansiyel uygulamasına sahip olduğundan dolayı lipaz üretimine yönelik araştırmalar artmıştır. Özellikle mikroorganizmaların lipaz üretim kapasitelerinin geliştirilmesi için optimal ortam koşullarının ve üretimi arttırıcı etki eden çeşitli faktörlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (Gül 2013). Ayrıca mutajenez yöntemleri yoluyla da verimli suşlar geliştirilebilmektedir. Geliştirilmiş suşlar yüksek enzim üretim kapasitesine ve istenilen yeni özelliklere sahip olabilmektedir (Karanam ve ark. 2008). UV ile indüklenen mutajenez, özellikle enzim üreticilerinin değerli metabolitlerini üretebilen daha verimli mikroorganizmalar geliştirmek için yaygın ve kolay bir yöntemdir.

Bu çalışmada yüksek düzeyde lipaz enzimi üreten yeni mutantların elde edilmesi amacıyla, fiziksel bir mutajen olan UV ile yapılan mutasyon çalışmalarında ana suş

Bacillus cereus ATA179 UV ışığının besi yerine uzaklığı ile farklı zaman aralıklarında UV ışığına maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre UV maruz kalma zaman aralığının artması ile UV dirençli bakterilerin sayısında azalma tespit edilmiştir. Bu beklenen bir durumdur. Çünkü zaman arttıkça daha yoğun UV ışığına maruz kaldığından dolayı bakterinin DNA'sında dimerler oluşmakta ve bunlar ise onarım mekanizmaları tarafından tamir edilememektedir. Bakteride letal sonuçlar meydana gelmektedir. Ancak bu çalışmada dört tane verimli mutant elde edilmiştir. Mutant EV1 1 dakikalık UV uygulaması ile elde edilirken, mutant EV2 5 dakika, mutant EV3 20 dakika ve mutant EV4 ise 1 dakika UV ışığı uygulanması ile dirençli suşlar olarak elde edilmiştir.

Ana suş ile mutant suşlar kıyaslandığında EV1 ve EV4'de %72 oranında ölüm tespit edilirken, EV2'de bu oran %65 olarak ve EV3'te %68 olarak saptanmıştır. Ana suşun ölüm oranı UV'ye maruziyet süresi ile orantılı olarak bulunmuştur.

Elde edilen mutant suşlardan enzimatik indeks (EI) ve hidrolitik zon çapı büyük olan 4 adet mutan seçilmiştir. Bu mutantların sıvı ortamda enzim üretim kapasiteleri kantitatif olarak saptanmıştır. Maksimum enzim üretimi mutant EV4 ile 24. saatte aktivite 10,6 U/ml olarak belirlenmiş ve ana suşa göre %60 oranında enzim verim artışı sağlanmıştır. Bu mutant suş *Bacillus cereus* EV4 olarak adlandırılmıştır.

Birçok araştırmacı endüstride kullanım potansiyeline sahip olan lipaz enzimini yüksek verimde üretebilen yeni mutant suşlar elde etmek için UV mutagenез yöntemini kullanmışlardır. Çalışmalarında elde edilen mutant suşların lipaz verimlerindeki değişim araştırılmış ve mutasyonla farklı lipaz artışları saptanmıştır.

Mala ve ark. (2001) *Aspergillus niger* ile yaptıkları UV mutasyon çalışmalarında, uzaklık olarak 30 cm'de 4 dakika maruz kaldıktan sonra %99,95 ölüm oranı görüldüğünü tespit etmişlerdir. En verimli mutant suşu'ndan üretilen ekstraselüler lipaz enzimin aktivitesi 42,0 U/ml olarak bulmuşlar ve ana suşa göre %20,7 oranında enzim verimi artış gözlemlendiği bildirmişlerdir.

Ellaiah ve ark. (2002) ise *Aspergillus niger* mutantı ile çalışmalarda enzim verimi ana suştan %156 oranında artış gözlemlendiği saptamışlardır.

Karanam ve Medicherla (2008) *Aspergillus japonicus* MTCC 1975 ile yaptıkları Ultraviyole ile mutasyon çalışmalarını UV ışığının petri yüzeyine olan uzaklığı olarak 16 cm’de yapmışlar ve elde edilen mutant olan *Aspergillus japonicus* AUV3’ten lipaz enzimi verimin ana suşa göre %118 oranında artışı gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Jayaraman ve Ilyas (2010) *Pseudomonas* sp. ana suşunu 1-10 dakika süre aralığında ve uzaklık olarak 15 cm’de UV’ye maruz bırakmışlar ve seçilen mutant ana suşa göre %118 oranında enzim verimin artışı belirtmişlerdir. Benzer çalışmalarında, *Serratia marcescens* ECU1010 suşundan UV ile elde edilen mutant’ın enzim verimi ana suşa göre 2,3 arttırdığı bulunmuştur (Zhao ve ark. 2010).

Toscano ve ark. (2011) UV ile elde edilen mutant *Aspergillus niger* UV2/3, 7 gün inkübasyon süresi olan besi ortamında üretimi sonucunda ana suştan %168 oranında daha yüksek lipaz verimine sahip olduğu saptamışlardır.

Ameri ve ark. (2019) *Bacillus atrophaeus* FSHM2 suşu kullanarak Ultraviyole ile mutasyon çalışmalarında maruz kalma süresi olarak 45 dakika ve uzaklık olarak ise 20 cm’de en iyi mutant suşu elde ettiklerini bildirmişler ve mutant suşun enzim verimi ana suşa göre 2 kat arttırdığı bulmuşlardır.

Bu çalışmada ve diğer bilim insanlarının yaptıkları UV mutasyon çalışmalarında mutasyon sıklığı organizmalar arasında oldukça fazla farklılık göstermektedir. Bu durum aynı tür içinde bile mutasyon sıklığının gen den gene değişebileceğini göstermektedir. Ayrıca bu durum mikroorganizmaların kendi hata okuma ve onarım sistemlerinin göreceli etkinliklerinden dolayı olabilmektedir.

Mutasyonla verimli mutantların eldesi yanında enzim üretimi kültür ortamının optimizasyonu ile de artırılabilir (İlesanmi ve ark. 2020). Kültür ortamında uygun karbon kaynaklarının varlığı bakteri üremesi için çok önemlidir, çünkü bakteriler karbon kaynağı varlığında herhangi bir ürünün biyosentezini yüksek miktarda yapabilmektedirler (Mazhar ve ark. 2018). Lotti ve ark (1998) tarafından yapılan çalışmalarda, lipolitik enzimlerin üretiminde temel bir bileşen olarak karbon kaynağı olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca lipaz enzimlerin genellikle indüklenebilir enzimler olduğundan dolayı sentezleri ve ekspresyonları için karbon kaynağı gerektiğini

bildirilmektedir. Bu karbon kaynakları, uyarıcı olarak bazı lipit veya lipit olmayan substratlar olabilmekte ve bunlar lipaz proteinlerinin ekspresyonundan sorumlu genleri uyarmaktadır (Sharma ve ark. 2001). Karbon kaynağının yanı sıra, ortamda bulunan organik ve inorganik azot kaynaklarının hücre büyüme faktörleri ve amino asitleri sağladığı bildirilmiştir (Thakur ve ark. 2014). Metal iyonları da lipaz üretiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Üretim ortamlarında farklı metal iyonları, enzim üretimi üzerinde farklı aktivasyon veya inhibisyon etkilerine sahiptir (Sethi ve ark. 2013).

Bu amaçla çalışmada elde edilen yeni mutant olan *B. cereus* EV4'ün lipaz enzimin üretim kapasitesini artırılması amacıyla enzim üretim temel besiyerinde farklı karbon (C), azot (N) ve metal iyonları kaynakları denenmiş ve elde edilen sonuçlara göre yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Bu çalışmada en iyi karbon kaynağı olarak sukroz bulunmuştur. Sukroz bulunan besiyerinde lipaz aktivitesi temel besiyerine (kontrol) göre %2 oranında artarken, ana suşa göre de %64 oranında verim artışı elde edilmiştir. En yüksek enzim aktivitesinin azot kaynağı $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Diamonyum Fosfat) olarak bulunmuştur. Bu ortam kontrol ile kıyaslandığında %44 oranında bir verim elde edilmiştir. Ana suşa göre de %132 oranında verim artışı elde edilmiştir. Ayrıca, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ varlığında %32 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ varlığında ise %9 oranında enzim verimi sağlanmıştır. Denemeye alınan azot kaynaklarından inorganik azot kaynakları, KNO_3 hariç, organik azot kaynaklarına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada inorganik azot kaynağı varlığında lipaz üretiminin daha yüksek olmasının nedeni, besi ortamında bulunan diğer bileşenlerle amonyum tuzları ile pozitif etkileşime girdiği düşünülebilmektedir. Metal iyonları ile yapılan çalışmalarda ise en yüksek enzim aktivitesinin CuSO_4 olarak saptanmıştır ve kontrol ile kıyaslandığında %4'lük bir enzim verimin artışı elde edilmiştir. Ana suşa göre de %67 oranında verim artışı elde edilmiştir. Çalışmada kontrol ortamında birlikte bulunan CaCl_2 ve NaCl ayrı ayrı denemeye alınmış, ancak enzim üretiminde her ikisi tek başına kullanıldığında lipaz enzimin üretimi düştüğü saptanmıştır. İkisinin beraber bulunmasında enzim üretiminin arttırma durumu ise bu metal iyonlarının birbiri üzerine pozitif sinerjik etki yarattığı düşünülebilmektedir.

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

Abada (2008) *Bacillus stearotherophilus* AB-1 sışundan mezofilik lipaz üretiminde karbon kaynağı olarak ksiloz varlığında ve azot kaynağı olarak alanin, fenilalanin, triptofan ve potasyum nitrat (KNO₃) ayrı olarak varlığında maksimum verim elde edildiği bulmuştur.

Kebabçı ve Cihangir (2012) üç farklı *Yarrowia lipolytica* suşu ile lipaz üretimi çalışmasında amonyum bileşiklerinin varlığı lipaz üretiminde en iyi artış sağladığını bulmuşlardır. Aynı bakteri suşu ile çalışan Lopes ve ark. (2016) amonyum sülfat en iyi azot kaynağı olarak da bulmuşlardır.

Veerepagu ve ark. (2013) petrol ile kirletilmiş topraktan izole edilen *Pseudomonas gessardii* tarafından lipaz enzimi üretiminde farklı kullandığı karbon kaynakların asıl ortamdaki bulunan karbon kaynağından (zeytinyağı) daha düşük enzim verimi sağlandığını bulmuşlardır. Bu suşu azot kaynağı olarak histidin varlığında maksimum lipaz enzim ürettiğini rapor etmişlerdir.

Jia ve ark. (2015) *Aspergillus niger* tarafından maksimum lipaz üretiminde karbon kaynağı olarak glukoz ve azot kaynağı olarak soya küspesi en etkili olduğu bulmuşlardır.

Soleymani ve ark. (2017) *Bacillus pumilus* ZR-5'in lipaz maksimum üretiminde, düşük maliyetli karbon kaynağı olarak glikoz şurubu, yüksek maliyetli karbon kaynağı olarak glukoz, düşük maliyetli azot kaynağı olarak balık tozu ve yüksek maliyetli azot kaynağı olarak pepton kullandığını rapor etmişlerdir.

Mazhar ve ark. (2017) *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39 ile çalışmalarında, elde ettiğimiz sonuca benzer olarak sukroz varlığında maksimum verim bulmuşlardır. Ancak azot kaynağı olarak pepton ve metal iyonları olarak Ca²⁺ ve Mg²⁺ enzim üretiminde en iyi bulmuşlardır.

Mazhar ve ark. (2018) *Bacillus cereus* PCSIRNL-37 suşun karbon kaynağı maltoz varlığında maksimum lipaz enzimi üretimi 30,17 U/mL ile bildirmişlerdir. Azot kaynağı olarak yeast ekstrakt varlığında maksimum enzim üretimi 50,83 U/mL olarak saptanmışlar ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları varlığında en yüksek lipaz enzim üretimi (40 U/mL) elde etmişlerdir.

Ilesanmi ve ark. (2020) toprak ve su'dan izole edilmiş bazı bakteri türleri tarafından lipaz üretiminde en iyi koşullar, karbon kaynağı zeytinyağı ve azot kaynağı yeast ekstrakt olarak saptanmışlardır.

Bilim insanlarının yapmış oldukları çalışmaların sonuçlarından da anlaşılacağı üzere farklı mikroorganizmalarla yapılan lipaz üretim verimlerindeki farklılıklar, kültür ortamı bileşiminin yanı sıra bakteri suşu özelliklerine bağlanabilmektedir. Ayrıca, lipaz enzimin aktivitenin ölçülmesinin, aynı zamanda, substrata ve test reaksiyonunun deneysel koşullarına da bağlı olduğundan farklı sonuçlar görülmektedir. Besinsel faktörlerin lipaz üretimine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçların alınması mikroorganizmaların kullandığı metabolik yolların farklı olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışmada maksimum enzim aktivitesinin gözlemlendiği besinsel faktörler kullanılarak modifiye ortamda EV4 mutant suşu enzim üretimi açısından değerlendirilmiş olup, lipaz enziminin aktivitesi 14 U/mL olarak belirlenmiştir. Bu ortamdan elde edilen değer, temel besiyerine (kontrol, 10,6 U/mL) göre %32 oranında bir enzim verimi sağlanmıştır. Ana suşa (6,6 IU/mL) göre de 2.1 kat enzim üretim artışı göstermiştir.

Enzimlerin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla enzim karakterizasyonu ile enzim hakkında önemli bilgiler elde edilmektedir. Bu bilgiler ise enzimin endüstriyel potansiyelini belirlenebilmektedir. Enzimin karakterizasyonunda sıcaklık ve pH gibi bazı önemli parametreler dikkate alınmaktadır. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir optimum sıcaklık ve optimum pH değeri bulunmakta ve bu değerlerin bilinmesi enzimin endüstriyel alanlarda aktif olarak kullanılıp kullanılmayacağını bilgi vermektedir. pH değişimleri enzimlerin konformasyonunda değişikliğe yol açmaktadır, çünkü enzimler farklı pH'larda değişik iyonik gruplar oluşturduğundan farklı pH'larda

enzim aktivitesinde büyük farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca substratın yapısı pH değişimleri ile de değişebilmekte ve dolayısıyla enzim katalitik reaksiyonu üzerinde etkilemektedir (Sirisha ve ark. 2010). Diğer yandan endüstride kullanılan önemli enzimlerin çoğu metalloenzimdir. Bu enzimler aktivite gösterebilmek için ortamda mutlaka kofaktör olarak metal iyonların bulunması gerekmektedir. Metalik iyonlar, konsantrasyona bağlı olarak enzimin aktif merkezinde bulunan amino asit dizilerinin yan gruplarına bağlanarak inhibe edici veya uyarıcı etkiye sahiptir. Enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri enzimin en önemli kinetiksel özellikleri olup, enzimin substrat ile ne kadar çabuk doyuma ulaştığı (K_m) ve ulaşabildiği en hızlı (V_{max}) reaksiyonunu göstermektedir. K_m değeri düştükçe enzimin substratına olan ilgisi artmaktadır. K_m değeri arttıkça enzimin substrata olan ilgisi ise düşmektedir. Düşük K_m 'e sahip enzimler substratlarına karşı yüksek affiniteye sahip olduğundan endüstride önem taşımaktadırlar.

Bu çalışmada elde edilen mutant suşu olan *Bacillus cereus* EV4'den lipaz enziminin özelliklerini belirlemek için enzimi kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemleri uygulanmıştır. Enzim %8 verimle, 2,9 kez saflaştırılmıştır. Saflaştırma kısmi işlemine enzim verimin kayıpların, MW cut-off 30,000 ultrafiltrasyon tüpü ile yapılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü lipaz moleküler ağırlık saptama çalışmalarında moleküler ağırlık 28,2 kDa olarak bulunmuştur.

Bu işlemde elde edilen kısmi saf enzim üzerine sıcaklık ve stabilitesi, pH ve stabilitesi, çeşitli potansiyel bileşiklerin etkileri, enzimin K_m ve V_{max} değerleri ve moleküler ağırlığı belirlenerek enzim karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmada mutant EV4'den elde edilen lipaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 60°C olarak tespit edilmiştir ve enzim 80°C'ye kadar aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Lipaz enzimin termostabil özelliklerine sahip olduğunu düşünülmektedir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi kontrol'den elde edilen değere göre %13 artmıştır. 60°C'de 30. dakikaya kadar aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Enzimin optimum pH değeri ise 7.0 olarak saptanmış olup, nötral bir enzimdir. Diğer yandan, enzimin asidik ortamdan ziyade alkali ortamda daha iyi aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. pH stabilite denemelerinde 30 dakika boyunca aktivitesini korurken, sürenin artması ile 120 dakika sonunda %67

oranında aktivite kaybı saptanmıştır. Metal iyonları enzim aktivitesi üzerinde kofaktör olarak görev aldığından dolayı enzim üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yapılan çalışmada CuSO₄, CaCl₂, LiSO₄, KCl ve BaCl₂ iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkili bir şekilde aktivatör etki yaptığı tespit edilmiştir. Diğer metal iyonları lipaz üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır. En iyi sonuç 5mM CuSO₄ olduğu, enzim aktivitesi kontrole göre 3,3 kat arttırdığı bulunmuştur. 5 mM KCl varlığında da %78 oranında aktivitede artış görülmüştür. Noniyonik bir sürfektan olan Triton X-100, anyonik bir deterjan olan SDS ve şelatlayıcı ajan olan EDTA 1 mM olarak varlığında da enzim aktivitesinde artış olmuştur. Ancak 5mM varlığında %2-9 oranında enzim aktivitesinin düştüğü saptanmıştır.

Yapılan çalışmada enzimin kinetik özellikleri araştırıldığında V_{max} değeri 17,36 U/mL olarak bulunmuştur. K_m değeri ise 0,036 mM olarak bulunmuştur. Çalışmada mutant EV'den elde edilen lipaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 28,2 kDa olarak saptanmıştır. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi için çalışmanın sonucunda oda sıcaklığında (RT) 60 güne kadar lipaz enzimin aktivitesi hemen hemen korunurken, bu süre +4°C'de 75 güne ve -20 °C'de 90 güne kadar bulunmuştur.

Farklı araştırmacılar farklı mikroorganizmalarla yaptıkları çalışmalarda da lipazların özelliklerini ortaya çıkarmak için enzimi saflaştırma uygulamaları yapmışlar ve enzimi karakterize etmişlerdir.

B. subtilis 168 (Lesuisse ve ark. 1993), *B. subtilis* (Eggert ve ark. 2002), *Bacillus pumilus* (Kim ve ark. 2002) ve *Bacillus coagulans* (Alkan ve ark. 2007) suşlarından üretildiği lipaz enzimin aktivitesi 35-40 °C'de maksimum gösterdiğini saptanmıştır.

Çalışmalarımızdan elde edildiği sonuca benzer olarak Wang ve ark. (1995) *Bacillus* sp. A30-1 tarafından elde edilen lipaz enzimin aktivitesi 60°C'de maksimum gösterdiği rapor etmişlerdir. Aynı sıcaklıkta *Bacillus* sp. J33 (Nawani ve ark. 1998), *Bacillus Cereus* C7 (Dutta ve Ray 2013) ve *Bacillus thermoleovorans* CCR11 (Ochoa ve ark. 2005) maksimum aktivite de bulunmuştur.

Bacillus A30-1'in lipaz enzimi pH 9.5'te maksimum enzim aktivitesi ve lipaz enzimi substrat olmadığında pH 5-10,5 arasında 15 saat boyunca %90-95 oranında stabil olduğunu saptanmıştır (Wang ve ark. 1995).

El-Shafei ve ark. (1997) *Bacillus cereus* lipazın aseton çöktürmesi (%60-%70) ve Sephadex G-100 kolon kromatografisi ile 31,2 kez saflaştırmışlar ve sonucunda %46,2 verim elde ettiği saptamışlardır. Lipazın maksimum aktivitesi 40°C'de olduğunu, 40-50°C arasında 30 dakika boyunca enzim aktivitesi koruduğu ve lipazın optimum pH değeri 0,05 M fosfat tamponunda 7.5 ve 0,05 M Tris tamponunda ise 8.5 olduğunu rapor etmişlerdir.

Nawani ve ark. (1998) termofilik *Bacillus* sp. J33 ile yapılan çalışmalarda lipaz enzimin amonyum sülfat çöktürmesi ile 8 kat ve jel filtrasyon kromatografisi ile 10 kat kısmi olarak saflastırdıktan sonra oluşan lipazın 70°C'de 30 dakika boyunca aktivitesi %50 oranında koruduğu, lipazın optimum aktivitesi pH 8.0'de gösterdiğini, Hg²⁺ ve Cd²⁺ iyonları varlığında inhibe olurken, Mg²⁺, Na⁺, Li⁺ iyonları varlığında aktivitesinin sırasıyla % 63, % 63 ve % 23 oranında arttığını saptamışlardır. Lipaz enzimin aktivitesi Ca²⁺, Fe³⁺, ve K⁺ iyonları varlığında tamamen koruduğu, 10 mM EDTA varlığında ise enzimin aktivitesi %40 oranında kaybetiğini bulmuşlardır.

Lee ve ark. (2001) *Bacillus thermoleovorans* ID-1 suşundan elde edilen lipazın amonyum sülfat çöktürmesiyle (%80) 9,8 kez saflaştırıldıktan sonra DEAE-Sefaroz CL6B Anyon Değişimi Kromatografisi, Superdex 200 Jel Kolon Kromatografisi, Resource PHE Hidrofobik Kromatografisi (FPLC) ve Mono Q Anyon Değişimi Kromatografisi ile 300 kat saflartırıldığı ve enzimin saflaştırma sonucunda toplam %0,16 verim elde edildiğini saptamışlardır. Saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığını 65°C olduğunu, lipazın 40-50°C arasında 30 dakika boyunca enzim aktivitesi koruduğu, pH 6.00-8.00 arasında oda sıcaklığında 24 saat boyunca aktivitesi koruduğu ve pH 9.0'da maksimum enzim aktivitesi olduğu bulmuşlardır. Enzimin 1mM Fe²⁺ ve Cu²⁺ varlığında aktivitesinin inhibe edildiğini de saptamışlardır.

Lima ve ark. (2004) *Bacillus megaterium* ile yaptıkları çalışmalarda lipaz enzimin pH 6.0 maksimum aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Ochoa ve ark. (2005) *Bacillus thermoleovorans* CCR11'den üretilen lipazın 30-40°C arasında 1 saat boyunca enzim aktivitesi %100 olarak koruduğu saptamışken 50-60°C arasında ise %75 olarak koruduğu bulmuşlardır. Lipaz enzimin pH 9.0 ile 10.0 arasında maksimum aktivite gösterdiği ve pH 5-11 arasında 30°C'de 26 saat boyunca %80 oranında koruduğu saptamışlardır. Ayrıca lipaz enzimin 30°C'de 1 saat boyunca inkübe edildiğinde 1mM konsantrasyonundaki Hg²⁺, Mg²⁺, K⁺ ve Li⁺ iyonları varlığında inhibe olurken, Na⁺ and Ba⁺ iyonları varlığında ise enzim aktivitesi koruduğu da saptamışlardır. Hg²⁺ iyonu lipaz aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahip olması sebebi, bu iyon enzim konformasyonunu değiştirebildiğini düşünmüşlerdir.

Kumar ve ark. (2005) *Bacillus coagulans* BTS-3 lipazlarının 55°C'de maksimum aktivite gösterdiğini, 8.5 olarak daha alkali ortamda maksimum aktivitesi gösterdiğini ve K⁺ varlığında aktivitesi %286 oranında kontrolden daha yüksek olduğu saptamışlardır.

B. cereus C7 (Dutta ve Ray 2009) 1 mM Ca²⁺ varlığında %100 oranında enzim verimi artışı göstermiştir.

Kamijo ve ark. (2011) *Bacillus* sp. HH-01 suşu ile çalışmalarda lipaz enzimin aktivitesi 30 °C'de maksimum gösterdiği rapor etmişlerdir.

Tamilarasan ve Kumar (2012) *Bacillus sphaericus* MTCC ile yapılan çalışmalarda ekstraselüler lipaz enzimi 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda amonyum sülfat çöktürmesi (%60) ile 1,35 kat saflaştırma yaptıktan sonra DEAE-Sefaroz Anyon Değişimi Kromatografisi kullanarak toplam %5.7 verim ile 17 kat saflaştırma yaptığını saptamışlardır. Saflaştırılan lipazın maksimum aktivitesi 40°C'de ve pH 8.0'de gösterdiğini bulmuşlardır. Lipazın aktivitesi, 1 mM ve 5 mM Mg²⁺ ve Ca²⁺ iyonları varlığında %10-15 oranında arttırdığı, Mn²⁺ ve Na⁺ 1 mM konsantrasyonunda enzim aktivite üzerinde etki göstermemesine rağmen 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarında enzim aktivitesini %10-12 arttırdığı rapor etmişlerdir. 5 mM ve 10 mM Cu²⁺, K⁺ ve Fe³⁺ iyonları varlığında lipaz aktivitesi inhibe olduğunu belirlemişlerdir.

Dutta ve Ray (2013) *Bacillus Cereus* C7 suşundan lipazın amonyum sülfat çöktürmesi (%30-50) ve diyaliz ile 11 kez saflaştırıldığını ve %41.5 verim elde ettiğini

saptamışlardır. Lipazın optimum aktivitesi pH 8.0'de gösterdiğini, pH 7.2-9 arasında 60°C'de 1 saat boyunca stabil olduğunu, 0,1 ve 1 mM Mn^{2+} , Fe^{3+} ve Sn^{2+} iyonları tarafından inhibe edildiği, ve 1 mM Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} ve Co^{2+} iyonları aktivitesi artırdığını rapor etmişlerdir.

Saengsanga ve ark. (2016) 10 mM konsantrasyondaki Ca^{2+} or Mg^{2+} iyonları, *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA suşundan elde edilen lipaz üretimini sırasıyla %128.85 ve %121.1 oranında uyardığını bulmuşlardır. Co^{2+} varlığında aktivitesi %70 oranında düştüğü ve Fe^{2+} , Mn^{2+} ve Cu^{2+} iyonları enzim aktivitesi üzerinde güçlü olarak inhibe ettiğini saptamışlardır.

Mazhar ve ark. (2016) *Bacillus subtilis* PCSIR-NL39 suşundan elde edilen lipaz enzimin amonyum sülfat çöktürmesi (%80) ile 3,45 kez saflaştırdıktan sonra diyaliz ve İyon Değişimi Kromatografisi ile 8.38 kat saflaştırmışlar ve 446 U/ml olarak enzim aktivitesi ile toplam %1,6 verim elde etmişlerdir. Saflaştırılan lipazın 70°C'de 1 saat boyunca inkübe edildiğinde aktivitesi %90 (124 U/ml) oranında koruduğu, lipazın optimum aktivitesi pH 8.0'de gösterdiğini ve 1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ and Na^+ iyonların varlığında aktivitesini arttığı bildirmişlerdir. Fakat 10 mM Mg^{2+} ve 1 mM Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ag^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} iyonları varlığında düşük lipaz aktivitesi ile sonuçladığı rapor etmişlerdir

Sivaramakrishnan ve Incharoensakdi (2016) petrol ile kirletilmiş topraktan izole edilen *Bacillus* sp. suşundan lipaz enzimin 5,1 kez saflaştırmışlar ve sonucunda %10,5 verim elde ettiğini bildirmişlerdir. Lipazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 37°C olduğu, optimum pH değeri 6,5 olduğu ve pH 3 ve pH 10'da enzim aktivitesi %70 kaybettiğini saptamışlardır. Lipaz enzimi Zn^{2+} , K^+ ve Fe^{2+} iyonları varlığında aktivitesi inhibe olurken, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} iyonları varlığında aktivitesinin arttığını saptamışlardır. Çalıştığımızdan elde edilen sonuçların aksine Cu^{2+} varlığında lipaz enzimin aktivitesi tamamen göstermediği bulmuşlardır.

Sharma ve ark. (2017) *Bacillus methylotrophicus* PS3 suşundan lipaz enzimi 48 saat boyunca inkübe edildikten sonra amonyum sülfat çöktürmesi (%30-90), diyaliz ve Sephadex G-100 kolon kromatografisi ile 2,9 kez saflaştırmışlar ve enzimin saflaştırma sonucunda toplam %24,10 verim elde ettiğini rapor etmişlerdir. Saflaştırılan lipazın

55°C’de maksimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Farklı pH değerlerinin lipaz enzimin aktivitesine olan etkilerinin araştırması için sitrat-fosfat tamponu (pH 4.0-7.0), Tris HCl tamponu (pH 8.0) ve glisin- NaOH tamponu (pH 9.0-11.0) kullanarak *Bacillus methylotrophicus* PS3 ile bir çalışma yapmışlar ve 50°C’de ve 30 dakika boyunca inkübe edilen lipazın maksimum aktivitesi elde ettiğimiz sonuca benzer olarak pH 7.0’de bulmuşlardır. Ayrıca lipaz aktivitesinin 1 mM Mg²⁺ ve Ca²⁺ ile sırasıyla %100 ve %98.40 oranında stimüle edildiğini ve 1 mM Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ ve Zn²⁺ iyonları varlığında ise enzim aktivitesi sırasıyla %48, %65, %75 ve %83 oranında kaybettiğini bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi literatürlerde metal iyonları farklı *Bacillus* suşlarından elde edilen lipaz enzimler üzerinde farklı etkiler göstermiştir. Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuca benzer olarak çoğu araştırmacı Ca²⁺ iyonların lipaz enzimi üzerinde olumlu bir etki gösterdiğini bulmuşlardır. Bunun sebebi Ca²⁺ iyonların enzimin konformasyonunda değişiklik sağladığından dolayı daha fazla bağlanma bölgesi oluşmaktadır. Ayrıca enzimin termal stabilitesini de arttırmaktadır (Ghasemi ve ark. 2015).

Enzimin kinetik özellikleri belirlenmek için diğer bilim insanları da yaptıkları çalışmalarda farklı sonuçlar elde etmişlerdir.

El-Shafei ve ark. (1997) *Bacillus cereus* lipazın K_m değeri tween 20 olarak substrat kullandığında 0.6 mM olduğu ve tributirin kullandığında 0.9 mM olduğu bulmuşlardır.

Lee ve ark. (2001) *Bacillus thermoleovorans* ID-1’den ekstaselüler lipaz enzimin trikaprilin olarak substrat kullandığında Lineweaver-Burk grafiği yararlanarak K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,8 mM ve 12,8 µmol dak⁻¹ mg⁻¹ olduğunu saptamışlardır.

Dutta ve Ray (2013) *Bacillus cereus* C7 suşundan üretilen lipaz enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 5.282 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ ve 3,34 x 10⁻⁵ mol dak⁻¹ L⁻¹ olduğunu rapor etmişlerdir.

Hemlata ve ark. (2016) *Bacillus sonorensis* 4R ile çalışmalarda lipaz enzimin substrat zeytinyağı olarak kullandığında V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 5,0 µM/ml/dak ve 3,22 µM olduğu, hardal yağı olarak kullandığında V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 5,55

$\mu\text{M/ml/dak}$ ve $2,22 \mu\text{M}$ ve pamuk yağı olarak kullandığında V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla $7,14 \mu\text{M/ml/dak}$ ve $2,5 \mu\text{M}$ bulmuşlardır.

Bazı araştırmacı yaptıkları çalışmaların sonuçları çalıştığımızdan elde edilen sonuca göre daha küçük moleküler ağırlığına sahip olan lipazlar bulmuşlardır.

Schmidt-Dannert ve ark. (1994) termofilik *Bacillus thermocatenulatus* lipazın moleküler ağırlığının 16 kDa olduğunu saptamışlardır.

Benzer çalışmalarda *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee ve ark. 2001) lipazın moleküler ağırlığı 19 kDa olduğu, *Bacillus* sp. H-257 (Imamura ve Kitaura 2000), *Bacillus thermoleovorans* CCR11 (Ochoa ve ark. 2005) lipazın 11 kDa olduğunu, *Bacillus licheniformis* (Madan ve Mishra 2009) ve *Bacillus subtilis* (Ma ve ark. 2006) lipazların 24 kDa olduğunu, *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA olduğunu (Saengsanga ve ark. 2016) lipazın 23 kDa olduğunu rapor edilmiştir.

Başka bilim adamları daha büyük moleküler ağırlığa sahip olan lipazlar da saptamışlardır.

Kim ve ark. (1994) *Bacillus* sp. suşundan üretilen lipaz moleküler ağırlığı 50 kDa olduğu belirtmişlerdir.

Wang ve ark. (1995) lipazın moleküler ağırlığı 65 kDa olduğu saptamışlardır.

Lin ve ark. (1996) mesofilik *Bacillus* sp. lipazın moleküler ağırlığı de 112 kDa olduğu bulmuşlardır. Başka çalışmada aynı sonuç olarak Dosanjh ve Kaur (2002) mesofilik *Bacillus* sp. suşunun lipazın 112 kDa olduğunu rapor etmişlerdir.

Nawani ve ark. (1998) termofilik *Bacillus* sp. J33 ile yaptıkları çalışmalarda lipazların moleküler ağırlığı 45 kDa olduğu tespit etmişlerdir.

Dharmstithi ve Luchai (1999) *Bacillus* sp. THL027 lipazın 69 kDa olduğunu bulmuşlardır.

Nawani ve ark. (2006) mesofilik *Bacillus* spp. lipazın moleküler ağırlığı 60 kDa olduğu rapor etmişlerdir.

Dutta ve Ray (2013) *Bacillus cereus* C7 suşundan üretilen lipazın moleküler ağırlığı 38 kDa olduğu rapor etmişlerdir.

Mazhar ve ark. (2016) *Bacillus subtilis* PCSIR-NL39 ile yaptıkları çalışmalarda lipazların moleküler ağırlığı sırasıyla 41 kDa olduğu bulmuşlardır.

Sharma ve ark. (2017) *Bacillus methylotrophicus* PS3 suşu ile çalışmada lipaz enzimi elde ettiğimiz enzim moleküler ağırlık değerine yakın olarak 31.40 kDa olduğu bulmuşlardır.

Enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi amacıyla diğer araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda farklı sonuçlar da ortaya çıkartmışlardır.

Pereira-Meirelles ve ark. (1997) *Candida lipolytica* ile çalışmalarda lipaz enzimin 5°C'de 370 gün boyunca aktivitesi koruduğu saptamışlardır.

Brígida ve ark. (2007) *Yarrowia lipolytica* suşundan elde edilen lipaz enzimi depolama stabilitesi araştırmak için -10°C'de saklamışlar ve 7 ay sonunda lipaz aktivitesi başlangıç aktivitesine göre %100 oranında koruduğu rapor etmişlerdir.

Tümtürk ve ark. (2007) *Candida rugosa* suşundan üretilen lipaz 4°C'de 60 gün boyunca saklamışlar ve enzim aktivitesi 30. günde tamamen kaybetişini rapor etmişlerdir.

Dizge ve ark. (2008) *Thermomyces lanuginosus* lipazı 4°C'de asetat tamponunda (25 mM, pH 6.0) 30 gün boyunca saklamışlar ve 30 gün sonra aktivitesi %45'e düştüğü tespit etmişler.

Bussamara ve ark. (2012) *Pseudozyma hubeiensis* HB85A'nın lipazın 5°C'de 40 gün boyunca her gün aktivitesine bakmışlar ve 40. günde enzim aktivitesi başlangıç aktivitesine göre %20 oranında kaybetişini bulmuşlardır.

Bu çalışmada da lipaz enziminin çeşitli sürfektan ve oksitleyici ajan varlığında stabilitesi araştırılarak, lipaz enziminin deterjan endüstrisinde kullanım potansiyeli belirlenmiştir. %1 ve %5 konsantrasyonlardaki SDS, Triton X-100, EDTA ve H₂O₂ eklenerek, 100 rpm, 60 ve 70°C koşullarında 1 saat boyunca lipaz enzimi bu deterjan katkı maddeleri ile beraber inkübe edilmiştir. Çalışmalar sonucunda enzimin başlangıç

aktivitesine göre, 60°C'de %5 EDTA içeren ortamda lipaz enzimi aktivitesinin %9 oranında arttığı belirlenmiştir. 60 ve 70 °C'lerde denenen tüm katkı maddeleri bulduklarında enzim aktivitesinin koruduğunu görülmüştür. Enzimin katkı maddeleri bulduklarından etkilenmediği sonucuna ulaşılmasını gözlenmiştir. Hatta enzimin 60°C'de bu katkı maddeleri varlığında aktivitesinin az da olsa arttığı tespit edilmiştir. Diğer yandan liyofilize lipaz enziminin deterjandaki raf ömrü saptamak için yapılan çalışma sonucunda enzim deterjan varlığında aktivitesi kontrole göre %59-64 oranında koruduğu gözlenmiş ve bunu 90. güne kadar aktivitesi stabil kaldığı saptanmıştır. Bunun yanında enzimli deterjandaki lipazın enzimsiz deterjandakine göre biraz daha fazla aktivite kaybı gözlenmiştir. Bunun sebebi enzimli deterjan içerisinde lipaz enzimin protein yapısı parçalayabilen proteaz enzimin bulunması düşünülmektedir.

Mutant EV4 Liyofilize lipaz enziminin yemeklik yanmış yağı ile kirletilmiş kumaşlardaki kirliliğin giderilmesindeki etkisini saptamak üzere yapılan çalışma sonucunda lipaz uygulandıktan sonra yapılan ölçümler, kontrol olan kirletilmiş kumaşla kıyaslandığında %30 oranında düşük delta E değeri elde edilmiştir. Bu da lipaz enziminin kirlilik gideriminde etkili olduğunu göstermiştir. Lipaz enzimi, enzimli deterjandan daha çok enzimsiz deterjanla birlikte uygulandığında etkili olmuştur. Bu durum en iyi sonucun alındığı ticari enzim+enzimsiz deterjan uygulanmasında da elde edilmiştir. Enzimli deterjanlarda bulunan proteaz enziminin lipaz enzimlerini degrade ettiği düşünülebilir. Diğer yandan enzimsiz deterjan ile yapılan ölçümde DE değeri yüksek çıkmıştır. Bu da deterjanın tek başına kirlilik gideriminde etkili olmadığını göstermektedir. Bu durum deterjanlara katkı olarak enzim ilavesinin önemini de göstermiştir. Ticari enzimle yapılan çalışmada en iyi sonucun alınma nedeni, ticari enzimlerin büyük ölçekte üretilmesi ve konsantre edilmesinden kaynaklanmaktadır. Küçük çapta üretilip liyofilize edilen mutant EV4 lipaz enzimi büyük çapta üretilen ve konsantre edilen ticari enzim ile kıyaslandığında umut verici olarak görülmektedir.

Bazı bilim insanları da deterjan katkı maddeleri varlığında lipaz enziminin kararlılığını ortaya çıkaran çalışmalar bildirmişlerdir.

Schmidt-Dannert ve ark. (1994) *Bacillus thermocatenulatus* lipazı Tween 20 ve Tween 80 varlığında aktivitesi düşük gösterdiği ve Triton X-100 varlığında enzim stabil kaldığı belirlemiştir.

Wang ve ark. (1995) *Bacillus A30-1*'in lipaz enzimi %1 H₂O₂ varlığında 60°C'de 1 saatlik inkübasyon süresinden sonra aktivitesi tamamen koruduğu ve 3 saat sonra enzimin başlangıç aktivitesine göre %93 oranında kaldığını rapor etmişlerdir. Bu da deterjan uygulamalarında olumlu sonuçlar aldıklarını ifade etmişlerdir.

Lee ve ark. (2001) *Bacillus thermoleovorans* ID-1 saflaştırılan enzimin %1 EDTA varlığında aktivitesi %32'ye düştüğü ve %1 EDTA varlığında ise enzim %97 oranında stabil kaldığı tespit etmişlerdir.

Ochoa ve ark. (2005) *Bacillus thermoleovorans* CCR11'den elde edilen lipazın 1% Triton X-100 varlığında 60°C'de pH 6.5'te 30 dakika sonra aktivitesi koruduğu, ancak 1% SDS, Tween 80 ve Tween 20 varlığında enzim tamamen inhibe olduğunu rapor etmişlerdir.

Kiran ve Chandra (2008) *Bacillus* sp. TSCVKK lipazın aktivitesi Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100 varlığında %90 oranında koruduğu bulmuşlardır. Bu da enzimin deterjan sanayii için uygunluğunu ifade etmişlerdir.

Tamilarasan ve Kumar (2012) *Bacillus sphaericus* MTCC lipaz enzimin 10 mM EDTA, SDS, 2-Mercaptoethanol, Triton X 100 ve Sodyum perklorat varlığında aktivitesi tamamen inhibe olduğu rapor etmişlerdir.

Hemlata ve ark. (2016) *Bacillus sonorensis* 4R ile çalışmalarda çeşitli sürfaktan (%1 SDS, Sodium deoxycholate, Triton X-100 ve Tween-80) ve ticari deterjanlar (%1 Ariel, Surf excel, Tide, Rin) kullanarak 60°C'te enzim stabilitesine bakmışlar ve 30 dakika sonunda SDS, sodium deoxycholate, tween-80, Ariel ve Rin varlığında enzim aktivitesi stabil kaldığını bulmuşlardır.

Sharma ve ark. (2017) *Bacillus methylotrophicus* PS3 suşu ile yapılan çalışmalarda lipaz enzimi çeşitli sürfektan varlığında stabilitesi kontrol etmişlerdir. Lipaz enzimi 50°C'de Triton X-100 varlığında %106.16 oranında stabil olduğunu, gliserol varlığında

lipaz aktivitesi %16 oranında kaybetiğini ve diğerk surfaktan olan SDS, EDTA, CTAB, and Tween 80 varlığında enzim aktivitesi sırasıyla %89, %83, %75 ve %69 oranlarında kaybetiğini rapor etmişlerdir.

Saraswat ve ark. (2017) toprakan izole edilen *Bacillus subtilis* suşu ile çalışmalarda lipaz enzimin aktivitesi surfaktan olan %1 Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100 varlığında 6 saat sonunda başlangıç aktivitesine göre sırasıyla %103, %98 ve %84 kaldığı, ancak %1 SDS varlığında aktivitesi %99 oranında kaybetiğini bulmuşlardır. Lipaz enzimin 37°C’te %1 sodyum perborat (NaH₂BO₄), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve sodyum hipoklorit (NaClO) gibi oksitleyici ajan ve 7 mg/mL Aerial, Tide, Fena ve Henko gibi çeşitli ticari deterjanlar varlığında aktivitesi %90-98 oranında stabil kaldığı ve deterjan formülasyonlarında kullanılma potansiyele sahip olabileceğini bulmuşlardır.

Khan ve ark. (2019) *Bacillus subtilis* ile yapılan mutasyon çalışmalarda ana suş ve mutantların lipaz enzimlerin çeşitli surfaktan (%10 Tween 20, Tween 80, Triton X-100, NP-40, SDS), oksitleyici ajan (%10 H₂O₂, Na₂BO₃, NaClO) ve ticari deterjanlar (%10 Tide, Vanish, Ariel, Henko, Surf Excel) varlığında stabilitesi araştırmışlar ve bunlardan bir mutant lipaz inkübasyon sonunda stabil olduğunu saptamışlardır.

Literatürlerde *Bacillus* türlerinden elde edilen lipaz ile ilgili çok farklı sonuçlar rapor edilmiştir ve bu da bize *Bacillus* türlerinin lipazlarının çok farklı özelliklerde olduklarını göstermektedir. Bu çalışmada da mutant EV4’ün özellikleri literatüre kazandırılmıştır.

Bu çalışma sonucunda ana suşu olan *Bacillus cereus* ATA179 suşundan rastgele mutasyon çalışmalarından elde edilen verimli mutant olan *Bacillus cereus* EV4’den üretilen lipaz enzimi için verimli bir modifiye ortamı elde edilmiş, enzim kısmi saflaştırılmış ve karakterize edilmesi sonucu enzimin termostabil olduğu ve düşük K_m’e sahip olması nedeni ile çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım potansiyeli olabileceği, deterjanlar varlığında raf ömrünün uzun olması, enzimin deterjan katkı maddeleri varlığından etkilenmediği ve kirletilmiş kumaştaki yağları giderdiğinden dolayı enzimin deterjan endüstrisinde bir potansiyele sahip olabileceğini düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abada, E.A.E. 2008.** Production and Characterization of a Mesophilic Lipase Isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11(8):1100-1106.
- Abigor, R.D., Uadia, P.O., Foglia, T.A., Haas, M.J., Jones, K.C., Okpefa, E. 2000.** Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem Soc Trans.*, 28: 979–81.
- Abo, M. 1990.** Method of purifying dry-cleaning solvent by decomposing liquid contaminants with a lipase. World Organization Patent, No: 9,007,606.
- Abol-Fotouh, D.M., Bayoumi, R.A., Hassan, M.A. 2016.** Production of thermoalkaliphilic lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and application in leather industry. *Enzyme Res.*, doi.org/10.1155/2016/9034364.
- Ahmed, E.H., Raghavendra, T., Madamwar, D. 2010.** An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: application for ethyl caprylate synthesis. *Bioresour. Technol.*, 101: 3628-3634.
- Akanbi, T.O., Kamaruzaman, A.L., Abu Bakar, F., Sheikh Abdul Hamid, N., Radu, S., Abdul Manap, M.Y., Saari, N. 2010.** Highly thermostable extracellular lipase-producing *Bacillus* strain isolated from a Malaysian hot spring and identified using 16S rRNA gene sequencing. *Int. Food Res. J.*, 17: 45-53.
- Akbar, A., Sitara, U., Ali, I., Muhammad, N., Khan, S.A. 2014.** Isolation and characterization of biotechnologically potent *Micrococcus luteus* strain from environment. *Pak. J. Zool.*, 46: 967-973.
- Akman, M. 1983.** Bakteri Genetiği. Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ders Notları No:1, Sivas, 560 s.
- Akoh, C.C., Min, D.B. 1998.** Microbial Lipases ve Enzymatic Interesterification Food Lipids Chemistry. Nutrition and Biotechnology. Marcel Decker Inc., New York, USA, pp: 641-698.
- Akyl, M.H. 2013.** Lipazın *Trichoderma citrinoviride*'den Üretimi ve Enzim Bazı Kinetik Özelliklerinin Saptanması. *Yüksek Lisans Tezi*, Hacettepe Üniv, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F., Dogru, M. 2007.** Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 136:183:192.
- Ameri, A., Shakibaie, M., Soleimani-Kermani, M., Faramarzi, M.A., Doostmohammadi, M., Forootanfar, H. 2019.** Overproduction of thermoalkalophilic lipase secreted by *Bacillus atrophaeus* FSHM2 using UV-induced mutagenesis and statistical optimization of medium components. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(2): 184-191.
- Ananthi, S., Ramasubburayan, R., Palavesam, A., Immanuel, G. 2014.** Optimization and purification of lipase through solid state fermentation by *Bacillus cereus* MSU as isolated from the gut of a marine fish *Sardinella longiceps*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6: 291-298.
- Andualema, B., Gessesse, A. 2012.** Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology*, 11: 100-118.
- Angajala, G., Pavan, P., Subashini, R. 2016.** Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7: 257-270.

- Anobom, C.D., Pinheiro, A.S., De-Andrade, R.A., Aguierras, E.C.G., Andrade, G.C., Moura, M.V., Almeida, R.V., Freire, D.M. 2014.** From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. *BioMed Research International*, 10.1155/2014/684506.
- Anonim, 2000a.** Enzymatic modification of the surface of a polyester fiber or article. <http://www.wipo.in/>-(Erişim tarihi: 2000).
- Anonim, 2000b.** Properties of enzymes and their use in the textile industry. <http://science.ntu.ac.uk/research/EnzyTex/EnzRep1.html>-(Erişim tarihi: 14.12.2000).
- Anonim, 2001.** Products and solutions. <http://www.novozymes.com/library/Downloads/Productsandsolutions/textile/200122607.pdf#search='lipases%20in%20leather%20industry>. (Erişim tarihi: 2001).
- Anonim, 2004.** Laundry Enzymes, Mid-America Commercialization Corporation. <http://www.k-state.edu/tech.transfer/macc/LaundryEnzymes.htm>-(Erişim tarihi: 2004).
- Anonim, 2005.** Biotechnology in the Leather Industry, A Guide to Opportunities for Improving Processes and Products. Bio Wise Department of Trade and Industry. <http://www.mapsenzymes.com/EnzymesLeather.asp>.
- Anonim, 2020a.** Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim, 2020b.** Industrial Enzyme Market-Growth, Trends, and Forecast (2020-2025). <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market>-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim, 2020c.** Lipase Market: Food Application to Dominate the Global Market in Terms of Revenue: Global Industry Analysis (2012-2016) and Opportunity Assessment (2017-2026). <https://www.futuremarketinsights.com/reports/lipase-market>-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim, 2020d.** Lipase Market-Growth, Trends and Forecasts 2020- 2025). <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/lipase-market>-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim, 2020e.** Lipids: Lipid Molecules. <https://courses.lumenlearning.com/boundless-chemistry/chapter/lipids/>-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim, 2020f.** Masaüstü spektrofotometre CM-3600A. <http://www.argetek.com.tr/cm-3600a/>-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim, 2020g.** Microbial Lipase Market by Application (Cleaning Agents, Animal Feed, Dairy Products, Bakery Products, and Confectionery Products), Form (Powder and Liquid), Source (Fungi and Bacteria), and Region - Global Forecast to 2023. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/microbial-lipase-market248464055.html>-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim, 2020h.** Mutagenesis (molecular biology technique). [https://en.wikipedia.org/wiki/Mutagenesis_\(molecular_biology_technique\)#Random_mutagenesis](https://en.wikipedia.org/wiki/Mutagenesis_(molecular_biology_technique)#Random_mutagenesis)-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim, 2020i.** Triglyceride. <https://en.wikipedia.org/wiki/Triglyceride>-(Erişim tarihi: 2020).
- Anonim. 1981.** Enzymes in the Fats and Oils Industry. *Jap-Chem Week*, 6-9.

- Anonim. 1997.** *Bacillus, Aliscylobacillus and Paenibacillus*. Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Editor(s): Berkeley, R.C.W., Logan, N.A., Chichester: John Wiley & Sons, pp: 185-207.
- Anonim. 2018.** UK Standards for Microbiology Investigations, Identification of *Bacillus* species. *Standards Unit, Microbiology Services, PHE*. 3.1: 1-27.
- Arda, M. 1985.** Genel Bakteriyoloji. Ank.Ün.Vet.Fak., No: 402, A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Arpigny J.L., Jaeger K.E. 1999.** Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochem. J.*, 343: 177–183.
- Ashfaq, M. 2015.** Basmati–rice a class apart (a review). *Rice Res. Open Access*, 3: 88-92.
- August P. 1972.** Lipase containing defatting creams. West Germany Patent, No: 2,064,940.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. 1986.** Applied Enzyme Catalysis: Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill, New York, pp: 157–227.
- Bairoch, A. 2000.** The Enzyme Database in 2000. *Nucleic Acids Res.*, 28(1): 304-305.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P.N., Mehrotra, R. 2010.** Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *J. Mol. Catal. B Enzym*, 62: 9-14.
- Bajpai, P. 1999.** Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Progr.*, 15: 147-57
- Balcao, V.M., Paiva, A.L. Malcata, F.X. 1996.** Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb Technol.*, 18: 392-416.
- Baldessari, A., Iglesias, L.E. 2012.** Lipases in green chemistry: acylation and alcoholysis on steroids and nucleosides. *Lipases Phospholipases*, 457-469.
- Barros, M., Fleuri, L., Macedo, G. 2010.** Seed lipases: sources, applications and properties-a review. *Braz J Chem Eng.*, 27: 15-29.
- Basheer, S.M., Chellappan, S., Beena, P., Sukumaran, R.K., Elyas, K., Chandrasekaran, M. 2011.** Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnol.*, 28: 627–638.
- Basri, M., Heng, A.C., Razak, C.N.A., Wan, W.M.Z., Yunus, M.A., Rahman R.N.A, Ampon, K., Salleh, A.B., 1997.** Alcoholysis of palm oil midfraction by lipase from *Rhizopus rhizopodiformis*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 113-116.
- Beattie, S., Williams, A. 1999.** Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28: 221–225.
- Belarbi, E.H., Molina, E., Chisti, Y. 2000.** A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 516-529.
- Berglund, P., Hutt, K. 2000.** Biocatalytic Synthesis of Enantiopure Compounds Using Lipases: Stereoselective Biocatalysis, Editor(s): Patel, R.N., Marcel Dekker, New York, pp: 633-657.
- Bhatia, R.P. 1990.** Contact lens cleaning composition containing an enzyme and a carboxylvinyl polymer. United States Patent, No: 4,921,630.
- Bisht, D., Yadav, S.K., Darmwal, N.S. 2012.** Enhanced production of extracellular alkaline lipase by an improved strain of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10,055. *J. Appl. Sci.*, 9: 158-167.

- Biundo, A., Hromic, A., Pavkov-Keller, T., Gruber, K., Quartinello, F., Haernvall, K., Perz, V., Arrell, M.S., Zinn, M., Ribitsch, D., Guebitz, G.M. 2016.** Characterization of a poly(butylene adipate-co-terephthalate)-hydrolyzing lipase from *Pelosinus fermentans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 1753-1764.
- Blackburn, G.M. 2006.** Nucleic Acids in Chemistry and Biology. *Royal Society of Chemistry*, 191–192.
- Boel, E., Høge-Jensen, B., Christensen, M., Thim, J., Fill, N.P. 1988.** *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids*, 23(7): 701 – 706.
- Bökel, C. 2008.** EMS screens: from mutagenesis to screening and mapping. *Methods in Molecular Biology*, 420: 119–38.
- Bora, L., Kalita, M.C. 2008.** Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from a thermophilic *Bacillus* sp. DH4, characterization and its potential applications as detergent additive. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83: 688-693.
- Bordes, F., Barbe, S., Escalier, P. 2010.** Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biophysical Journal*. 99(7): 2225–2234.
- Borrelli, G.M., Trono, D. 2015.** Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int J Mol Sci.*, 16: 20774–20840.
- Borza, P., Peter, F., Paul, C. 2015.** Improved enantioselectivity of *Candida antarctica* a lipase through sol-gel entrapment. *Chem Bull.*, 60: 49-54.
- Bottomone, E.J. 2010.** *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev.*, 23: 382-398.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S. 1990.** A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 343(6260):767–770
- Brahimi-Horn, M.C., Guglielmino, M.L., Sparrow, L.G. 1989.** Wax Esterase Activity in a Commercially-Available Source of Lipase for *C. Cylindracea*. *J. Biotechnol.*, 12: 299-306.
- Brash, D.E. 1991.** A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10124–10128
- Brigida, A.I., Amaral, P.F., Coelho, M.A., Goncalves, L.R. 2014.** Lipase from *Yarrowia lipolytica*: production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym.*, 101: 148-158.
- Brígida, A.I.S., Amaral, P.F., Gonçalves, L.R., Coelho, M.A.Z. 2007.** Characterization of an extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*. Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6), Copenhagen.
- Britt, A.B. 1996.** DNA damage and repair in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1): 75–100.
- Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Turkenburg, J.P. 1992.** Structure and molecular model refinement of *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase: a case study of the use of simulated annealing in partial model refinement. *Acta Crystallogr.*, 48: 307-319.
- Buisman, G.J.H., van Helteren, C.T.W., Kramer, G.F.H., Veldsink, J.W., Derksen, J.T.P., Cuperus, F.P. 1998.** Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnol. Lett.*, 20: 131-136.
- Bussamara, R., Dall’Agnol, L., Schrank, A., Fernandes, K.F., Vainstein, M.H. 2012.** Optimal Conditions for Continuous Immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) Lipase by Adsorption in a Packed-Bed Reactor by Response Surface Methodology. *Enzyme Research*, 10.1155/2012/329178.

- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S., Ravanat, J.L., Spinelli, S. 1997.** Effects of UV and visible radiation on DNA final base damage. *Biol. Chem.*, 378: 1275–1286.
- Caras, I.W., MacInnes, M.A., Persing, D.H., Coffino, P., Martin Jr, D.W. 1982.** Mechanism of 2-aminopurine mutagenesis in mouse T-lymphosarcoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2(9): 1096–1103.
- Castilla, A., Panizza, P., Rodríguez, D., Bonino, L., Diaz, P., Irazoqui, G., Rodríguez, S. 2017.** A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). *Enzyme Microb. Technol.*, 98: 86-95.
- Castro, H.F., Oliveira, P.C., Pereira, E.B. 2000.** Influence of Substrate Partition Coefficient on the Performance of Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate by Alcoholysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17(1): 4-7.
- Cavalcanti-Oliveira, E., da Silva, P.R., Ramos, A.P., Aranda, D.A.G., Freire, D.M.G. 2011.** Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. *Enzyme Res.*, 2011: 1.
- Chahinian, H., Vanot, G., Ibrik, A., Rugani, N., Sarda, L. and Comeau, L.C., 2000.** Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of partial acylglycerol lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 215–22. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.215>
- Chakraborty, K., Raj, R.P. 2008.** An extra-cellular alkaline metallo-lipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. *Food Chem.*, 109: 727-736.
- Chandrasekaran, V.P.L.M. 2013.** Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1349-1360.
- Chauhan, M., Chauhan, R.S., Garlapati, V.K. 2013.** Evaluation of a new Lipase from *Staphylococcus* sp. for detergent additive capability. *BioMed Res Int.*, 2013:1.
- Chen, S.J., Cheng, C.Y., Chen, T.L. 1998.** Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *J. Ferment. Bioeng.*, 86: 308-312.
- Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., Sayadi, S. 2011.** A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids Health Dis.*, 10: 221.
- Cho, A.R., Yoo, S.K., Kim, E.J. 2000.** Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol Lett.*, 186: 235–238.
- Choi, W.C., Kim, M.H., Ro, H.S., Ryu, S.R., Oh, T.K., Lee, J.K. 2005.** Zinc in lipase L1 from *Geobacillus stearothermophilus* L1 and structural implications on thermal stability. *FEBS Lett.*, 579: 3461-3466.
- Choudhury, P., Bhunia, B. 2015.** Industrial application of lipase: a review. *Biopharm J.*, 1: 41–47.
- Christopher, L.P., Zambare, V.P., Zambare, A., Kumar, H., Malek, L. 2015.** A thermo-alkaline lipase from a new thermophile *Geobacillus thermodenitrificans* AV-5 with potential application in biodiesel production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 90: 2007-2016.
- Clementz, A.L., Del Peso, G., Canet, A., Yori, J.C., Valero, F. 2016.** Utilization of discard bovine bone as a support for immobilization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog.*, 32: 1246-1253.

- Costa, R.M.A., Chigancas, V., Galhardo, R.D.S., Carvalho, H., Menck, C.F.M. 2003.** The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, 85(11): 1083–1099.
- Couturier, L., Taupin, D., Yvergnaux, F. 2009.** Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids. *J Mol Catal B Enzymatic.*, 56: 29–33.
- Crow, J.F., Abrahamson, S. 1997.** Seventy Years Ago: Mutation Becomes Experimental. *Genetics*. 147 (4): 1491–1496.
- da Silva, S.J.D., Balmant, W., Soares, D., Corazza, M.L., Krieger, N., Mitchell, D.A. 2017.** A combined sorption and kinetic model for multiphasic ethyl esterification of fatty acids from soybean soapstock acid oil catalyzed by a fermented solid with lipase activity in a solvent-free system. *Biochem Eng J.*, 120: 84–92.
- Dahle, J., Frey, H.R., Haas, L., Kaaden, O.R., Liess, B., Moening, V. 1994.** Virologie I und Virologie II. Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule, Hannover.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M.B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., Gargouri, Y., Ben Ali, Y., Aloulou, A. 2013.** Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 57: 232–237.
- de Oliveira, D., Di Luccio, M., Faccio, C., Rosa, C.D., Bender, J.P., Lipke, N., 2004.** Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Appl Biochem Biotechnol.*, 113–116: 771–80.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., DeBlock, J., VanCoillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L. 2010.** Toxinogenic and spoilage potential of aerobic sporeformers isolated from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 136: 318–325.
- Derewenda, Z.S., Derewenda, U., Dodson, G.G. 1992.** The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 227(3):818–839.
- Dey, A., Chattopadhyay, A., Saha, P., Mukhopadhyay, S. 2015.** An approach to the identification and characterisation of a psychrotrophic lipase producing *Pseudomonas* sp. ADT3 from Arctic Region. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 322–332.
- Dhake, K.P., Thakare, D.D., Bhanage, B.M. 2013.** Lipase: a potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Frag J.*, 28: 71–83.
- Dharmsthiti, S., Kuhasuntisuk, B. 1998.** Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *J Industr Microbiol Biotechnol*, 21: 75–80.
- Dharmsthiti, S., Luchai, S., 1999.** Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiol Lett.*, 179:241–6.
- Dizge, N., Keskinlera, B., Tanriseven, A. 2008.** Covalent attachment of microbial lipase onto microporous styrene–divinylbenzene copolymer by means of polyglutaraldehyde. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66:34–38.
- Doering, J.A., Lee, S., Kristiansen, K., Evenseth, L., Barron, M.G., Sylte, I., LaLone, C.A. 2018.** In Silico Site-Directed Mutagenesis Informs Species-Specific Predictions of Chemical Susceptibility Derived From the Sequence Alignment to

Predict Across Species Susceptibility (SeqAPASS) Tool. *Toxicological Sciences*. 166(1): 131–145.

Do, H., Lee, J.H., Kwon, M.H., Song, H.E., An, J.Y., Eom, S.H., Lee, S.G., Kim, H. J. 2013. Purification, characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a cold-active lipase (CpsLip) from the psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* 34H. *Acta Crystallogr Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 69: 920-924.

Dosanjh, N.S., Kaur, J. 2002. Biochemical analysis of a native and proteolytic fragment of a high-molecular-weight thermostable lipase from a mesophilic *Bacillus* sp.. *Expr. Purif.*, 24: 71-75.

Drobniewski, F.A. 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev.*, 6: 324-338.

Dror, A., Kanteev, M., Kagan, I., Gihaz, S., Shahar, A., Fishman, A. 2015. Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99: 9449-9461.

Du, W., Xu, Y.Y., Zeng, J., Liu, D.H. 2004. Novozym 435-catalysed transesterification of crude soya bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium. *Biotechnol Appl Biochem*, 40: 187-90.

Dulbecco, R. 1949. Reactivation of ultra-violet-inactivated bacteriophage by visible light. *Nature*, 163(4155): 949– 950.

Dutra, J.C.V., Terzi, S.C., Bevilaqua, J.V., Damaso, M.C.T., Couri, S., Langone, M.A.P. 2008. Lipase production in solidstate fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 147: 63-75.

Dutta, S., Ray, L. 2009. Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 159: 142-154.

Dutta, S., Ray, L. 2013. Purification and Immobilization of a Lipase from *Bacillus Cereus* C7. *Indian Chemical Engineer*, 55(3):165-176.

Ebrahimpour, A., Rahman, R.N.Z.R.A., Ean, Ch'ng, D.H., Basri, M., Salleh, A.B. 2008. A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. strain ARM. *BMC Biotechnology*. 8: 96-110.

Eggert, T., van Pouderoyen, G., Pancreach, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B. W., Jaeger, K.E. 2002. Biochemical properties and threedimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surf. B.*, 26:37-46.

El-Shafei, H.A., Rezkallah, L. A. 1997. Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase. *Microbiol. Res.*, 152:199-208.

Eker, A.P.M., Kooiman, P., Hessels, J.K.C., Yasui, A. 1990. DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(14): 8009–8015.

Ekinci, A.P., Dincer, B., Baltas, N., Adiguzel, A. 2015. Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 6366 : 1-7.

Ellaiah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B., Taleb, A.T., Adinarayana, K. 2002. Strain improvement of *Aspergillus niger* for the production of lipase. *Indian J. Microbiol.*, 42: 151-153.

- Elshaghabee, F.M.F., Rokana, N., Gulhane, R.D., Sharma, C., Panwar, H. 2017.** Bacillus as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol.*, 8:1490.
- Eltaweel, M.A., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B., Basri, M. 2005.** An organic solvent-stable lipase from *Bacillus* sp. strain 42. *Ann. Microbiol.*, 55: 187-192.
- Ersoy, E., Bayşu, N. 1986.** Biyokimya. A.Ü.Vet. Fak., No: 408, A.Ü. Basımevi, Ankara
- Essen, L.O., Klar, T. 2006.** Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(11): 1266–1277.
- Essers, J., Vermeulen, W., Houtsmuller, A.B. 2006.** DNA damage repair: anytime, anywhere?. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(3): 240–246.
- Faouzi, F.L., El Bergadi, F.E.B., Sayari, A.S., Elabed, S.E., Mohammed, I.M., Harchali, E.H.H., Ibsouda, S.K.I. 2015.** Biochemical characterization of a new thermostable lipase from *Bacillus pumilus* strain. *Turk. J. Biochem.*, 40: 8-14.
- Farfan, M., Villalon, M.J., Ortiz, M.E., Nieto, S., Bouchon, P. 2013.** The effect of interesterification on the bioavailability of fatty acids in structured lipids. *Food Chem.*, 139: 571-577.
- Farrokh, P., Yakhchali, B., Karkhane, A.A. 2014.** Cloning and characterization of newly isolated lipase from *Enterobacter* sp. Bn12. *Braz. J. Microbiol.*, 45: 677-687.
- Feller, G., Gerday, C. 2003.** Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaption. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1: 200-208.
- Flavell, R.A., Sabo, D.L., Bandle, E.F., Weissmann, C. 1975.** Site-directed mutagenesis: effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Qbeta RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(1): 367–371.
- Fleuri, L.F., de Oliveira, M.C., Arcuri, M.D.C., Capoville, B.L., Pereira, M.S., Delgado, C.H.O., Novelli, P.K. 2014.** Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. *Food Sci Biotechnol.*, 23: 1199-1205.
- Flibotte, S., Edgley, M.L., Chaudhry, I., Taylor, J., Neil, S.E., Rogula, A., Zapf, R., Hirst, M., Butterfield, Y., Jones, S.J., Marra, M.A., Barstead, R.J., Moerman, D.G. 2010.** Whole-genome profiling of mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 185(2): 431–441.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Rocaniello, U.R., Skalka, A.M. 2000.** Principles of Virology. ASM Press, Washington.
- Florencio, C., Couri, S., Farinas, C.S. 2012.** Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Res.*, 10.1155/2012/793708.
- Fritze, D. 2004.** Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94: 1245-1248.
- From, C., Hormazábal, V., Granum, P.E. 2007.** Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *Int.J. Food Microbiol.*, 115: 319–324.
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazábal, V., Granum, P.E. 2005.** Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1178–1183.
- Fukuda, S., Hayashi, S., Ochiai, H., Iizumi, T., Nakamura, K. 1990.** Improvers for deinking of wastepaper. Japanese Patent 2,229,290.

- Gandhi, N.N., Patil, N.S., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Wangikar, P.P., Mukesh, D. 2000.** Lipase-Catalyzed Esterification. *Catalysis Reviews*, 42(4): 439-480.
- Garcia, H.S., Arcos, J.A., Keough, K.J., Hill, C.G. 2001.** Immobilized lipase-mediated acidolysis of butteroil with conjugated linoleic acid: batch reactor and packed bed reactor studies. *J Mol Catal B Enzymatic.*, 11: 623-632.
- Garlapati, V.K., Kant, R., Kumari, A., Mahapatra, P., Das, P., Banerjee, R. 2013.** Lipase mediated transesterification of Simarouba glauca oil: a new feedstock for biodiesel production. *Sustain Chem Process.*, 1: 1.
- Gennari, F., Miertus, S., Stredansky, M., Pizzio, F. 1998.** Use of biocatalysts for industrial applications. *Genetic Eng. Biotechnol.*, 4: 14-23.
- Ghanem, E.H., Al-Sayed, H.A., Saleh, K.M. 2000.** An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 459-464.
- Ghasemi, S., Rasoul, A., Kazemi, G., Zarrini, M.H., Morowvat, M.K. 2015.** Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. *Microbiology*, 80:483-487.
- Godfrey, T., Reichelt, J. 1983.** Industrial applications: Industrial enzymology-applications of enzymes in industry. The Nature Press, London, pp: 170-465.
- Godfrey, T., West, S. 1996.** Introduction to Industrial Enzymology: Industrial Enzymology, Editor(s): Godfrey, T., West, S., Stockholm Press, New York, pp: 1-17.
- Going, L.H. 1967.** Intersetification product and processes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 44:414A.
- Goosen, N., Moolenaar, G.F., Visse, R., van de Putte, P. 1998.** Functional domains of the *E. coli* UvrABC proteins in nucleotide excision repair: Nucleic acids and molecular biology: DNA repair, Editor(s): Eckstein, F., Lilley, D.M.J., Springer Verlag, Berlin, Germany, pp: 103-123.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P.R., Beresford, T.P., Fenelon, M.A., Cotter, P.D. 2015.** The Prevalence and Control of Bacillus and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Front. Microbiol.*, 10.3389/fmicb.2015.01418.
- Gricajeva, A., Bendikienė, V., Kalėdienė, L. 2016.** Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: cloning, expression and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, 92: 96-104.
- Griebeler, N., Polloni, A.E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Cechet, J.L. 2009.** Isolation and screening of lipase producing fungi with hydrolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*, 10.1007/s11947-008-0176-5.
- Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H. 1999.** Modern Genetic Analysis, Editor(s): Freeman, W.H., New York, ISBN-10: 0-7167-3118-5.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T. 2000.** An Introduction to Genetic Analysis, Editor(s): Freeman, W.H., New York, ISBN-10: 0-7167-3520-2.
- Gryglewicz, S., 2001.** Enzyme catalysed synthesis of some adipic esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 15, 9-13.
- Gül, Ü.D. 2013.** Fungal lipazlar ve endüstride kullanım alanları. *AKU J. Sci. Eng.* 13: 1-8
- Günalp, A., Ayter, Ş., Lüleci, G., Kart, A., Sakızlı, M. 1986.** Tıbbi Biyoloji. Meteksan yayınları, Ankara.
- Guncheva, M., Zhiryakova, D. 2011.** Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1): 1-21.

- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004.** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 64: 763-781.
- Gupta, R., Kumari, A., Syal, P., Singh, Y. 2015.** Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog Lipid Res.* 57:40–54.
- Gupta, R., Rathi, P., Bradoo, S. 2003.** Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43: 635-644.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. 2013.** A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/32912>.
- Hamden, K., Keskes, H., Elgomdi, O., Feki, A., Alouche, N. 2017.** Modulatory effect of an isolated triglyceride from fenugreek seed oil on of α -amylase, lipase and ace activities, liver-kidney functions and metabolic disorders of diabetic rats. *J Oleo Sci.*, 66: 633-645.
- Hanamura, S., Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T. 2016.** Synthesis of acacetin and resveratrol 3,5-di-O-b-glucopyranoside using lipasecatalyzed regioselective deacetylation of polyphenol glycoside peracetates as the key step. *J Mol Catal B Enzymatic.*, 128: 19-26.
- Handelsman, T., Shoham, Y. 1994.** Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 40: 435-443.
- Harm, H. 1980.** Damage and repair in mammalian cells after exposure to non-ionizing radiations. III. Ultraviolet and visible light irradiation of cells of placental mammals, including humans, and determination of photorepairable damage in vitro. *Mutation Research*, 69(1): 167–176
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. 2006.** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, 39: 235-251.
- Hassan, S. 2014.** Lipase Catalyzed Aminolysis as An Entry to Consecutive Multicomponent Reactions. *Ph.D. Thesis*, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Heinrich Heine University, Dusseldorf, Germany.
- Hassan, S., Ullrich, A., Muller, T.J. 2015.** Consecutive three-component synthesis of (hetero) arylated propargyl amides by chemoenzymatic aminolysis–Sonogashira coupling sequence. *Organ Biomol Chem.*, 13: 1571-1576.
- Hellyer, S.A., Chandler, I.C., Bosley, J.A. 1999.** Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride. *Biochim. Biophys*, 1440: 215-224.
- Hemlata, B., Uzma, Z., Tukaram, K. 2016.** Substrate kinetics of thiol activated hyperthermostable alkaline lipase of *Bacillus sonorensis* 4R and its application in bio-detergent formulation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8:104-111.
- Hjorth, A., Carriere, F., Cudrey, C., Wöldike, H., Boel, E., Lawson, D.M., Ferrato, F., Cambillau, C., Dodson, G.G., Thim, L., Verger, R. 1993.** A Structural Domain (the lid) Found in Pancreatic Lipases Is Absent in the Guinea Pig (phospho) Lipase. *Biochemistry*, 32(18): 4702-4707.
- Hoeijmakers, J.H. 2009.** DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.*, 361(19): 1914.
- Hollaender, A., Curtis, J.T. 1935.** Effects of sublethal doses of monochromatic ultraviolet radiation on bacteria in liquid suspension. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 33: 61–62.

- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, USA, 559 pp.
- Hoq, M.M. 1985.** Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62: 1016-1021.
- Hoq, M.M., Yamane, T., Shimizu, S., Funada, T., Ishida, S. 1985.** Bioreactor for Enzymic Reaction of Fat and Fatty Acid Derivatives. III Continuous Hydrolysis of Olive Oil by Lipase in a Microporous Hydrophobic Membrane Reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62: 1016–1021.
- Hossain, M.Z., Shrestha, D.S., Kleve, M.G. 2010.** Biosensors for Biodiesel Quality Sensing. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 64: 80-85.
- Houde, A., Kademi, A. ve Leblanc D., 2004.** Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem. and Biotech.* 118: 155-170.
- Hrabé de Angelis, M., Balling, R. 1998.** Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutation Research*, 400(1–2): 25–32.
- Hsu, A.F., Jones, K., Foglia, T.A., Marmer, W.N. 2002.** Immobilized lipasecatalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnol Appl Biochem.*, 36: 181-6.
- Huang, A.H.C. 1984.** Plant lipases: Lipases, Editor(s): Borgström, B., Brockman, H.L., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp: 419-442.
- Idris, N.A., Mat Dian, L.H. 2005.** Interesterified palm products as alternatives to hydrogenation. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 14: 396-401.
- Ikehata, H., Ono, T. 2011.** The Mechanisms of UV Mutagenesis. *J. Radiat. Res.*, 52: 115–125.
- Ilesanmi, O.I., Adekunle, E.A., Omolaiye, J.A., Olorode, E.M., Ogunkanmi, L.A. 2020.** Isolation, Optimizaron and Molecular Characterization of Lipase Producing Bacteria From Contaminated Soil. *Scientific African*, 10.1016/j.sciaf.2020.e00279.
- Imamura, S., Kitaura, S. 2000.** Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus sp.* H-25. *J. Biochem.*, 127:419-425.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S. 2001.** Production of biodiesel fuel from triclycerides and alcohol using immobilized lipase. *J Mol Cat B: Enzymat.*, 16: 53-8.
- Iyama, T., Wilson, D.M. 2013.** DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8): 620-36.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. 1999.** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbio.*, 53:315 – 351.
- Jaeger, K.E., Eggert, T. 2002.** Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.*, 13: 390–397.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Heuvel M., Misset, O. 1994.** Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.*, 15: 29-63.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Koch, H.B., Ferrato, F., Dijkstra, B.W. 1993.** Topological Characterization and Modeling of the 3D Structure of Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.*, 332(1–2), 143–149.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998.** Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends. Biotechnol.*, 16: 396-403.

- Jayaraman, R., Ilyas, M.H.M. 2010.** Strain Improvement of *Pseudomonas* sp for the Production of Lipase. *Journal of Experimental Sciences*, 1(11):01-03.
- Jeon, J.H., Kim, J.T., Kim, Y.J., Kim, H.K., Lee, H.S., Kang, S.G., Kim, S.J., Lee, J.H. 2009.** Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deepsea sediment metagenome. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 81: 865-874.
- Jeong, S.T., Kim, H.K., Kim, S.J., Chi, S.W., Pan, J.G., Oh, T.K., Ryu, S.E. 2002.** Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19): 17041-17047.
- Jeppesen, D.K., Bohr, V.A., Stevnsner, T. 2011.** DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol.*, 94(2): 166-200.
- Ji, X., Chen, G., Zhang, Q., Lin, L., Wei, Y. 2015.** Purification and characterization of an extracellular cold-adapted alkaline lipase produced by psychrotrophic bacterium *Yersinia enterocolitica* strain KM1. *J Basic Microbiol.*, 55: 718-728.
- Jia, J., Yang, X., Wu, Z., Zhang, Q., Lin, Z., Guo, H., Lin, C.S.K., Wang, J., Wang, Y. 2015.** Optimization of Fermentation Medium for Extracellular Lipase Production from *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology. *BioMed Research International*, 2015:1-8.
- Jo, J.C., Kim, S., Kim, H.K. 2014.** Transesterification of plant oils using *Staphylococcus haemolyticus* L62 lipase displayed on *Escherichia coli* cell surface using the OmpA signal peptide and EstAb8 anchoring motif. *Enzyme Microb Technol.*, 67: 32-39.
- Johnson, J.L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G.B., Rajagopalan, K.V., Sancar, A. 1988.** Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(7): 2046–2050.
- Joseph, B., Ramteke, P.W. 2013.** Extracellular solvent stable cold-active lipase from psychrotrophic *Bacillus sphaericus* MTCC 7526: partial purification and characterization. *Ann. Microbiol.*, 63: 363-370.
- Justice, M.J., Noveroske, J.K., Weber, J.S., Zheng, B., Bradley, A. 1999.** Mouse ENU Mutagenesis. *Human Molecular Genetics*, 8(10): 1955–63.
- Kai, W., Peisheng, Y. 2016.** Optimization of lipase production from a novel strain *Thalassospira permensis* M35-15 using response surface methodology. *Bioengineered*, 5979: 1-6.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W.P. 2007.** MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*. 6(8): 1079-1099
- Kamijo, T., Saito, A., Ema, S., Yoh, I., Hayashi, H., Nagata, R. 2011.** Molecular and enzymatic characterization of a subfamily I.4 lipase from an edible oil-degrader *Bacillus* sp. HH-01. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99: 179–187.
- Kanjanavas, P., Khuchareontaworn, S., Khawsak, P., Pakpitcharoen, A., Pothivejkul, K., Santiwatanakul, S., Matsui, K., Kajiwara, T., Chansiri, K. 2010.** Purification and characterization of organic solvent and detergent tolerant lipase from thermotolerant *Bacillus* sp. RN2. *Int J Mol Sci.*, 11: 3783-3792.
- Kanmani, P., Aravind, J., Kumaresan, K. 2015.** An insight into Microbial lipases and their environmental facet. *Int J Environ Sci Technol*. 12:1147–1162.
- Kao, Y.T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D. 2005.** Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45): 16128–16132.

- Kapoor, M., Gupta, M.N. 2012.** Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.*, 47: 555-569.
- Karanam, H.K., Medicherla, N. R. 2008.** Enhanced lipase production by mutation induced *Aspergillus japonicus*. *African Journal of Biotechnology*, 7(12):2064-2067.
- Karkhane, A.A., Yakchali, B., Jazii, F.R., Bambai, B. 2009.** The effect of substitution of Phe181 and Phe182 with Ala on activity, substrate specificity and stabilization of substrate at the active site of *Bacillus thermocatenulatus* lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 61: 162-167.
- Kazlauskas, R.J. 1994.** Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol.*, 12: 464-472.
- Kazlauskas, R.J., Bornscheur, U.T. 1998.** Biotransformations with Lipases: Biotechnology, Editor(s): Rehm, H.J., Pihler, G., Stadler, A., Kelly, P.W.J., Wiley-VCH, New York, USA, pp: 37-192.
- Kebabçi, Ö., Cihangir, N. 2012.** Comparison of three *Yarrowia lipolytica* strains for lipase production: NBRC 1658, IFO 1195, and a local strain. *Turkish Journal of Biology*, 36:15-24.
- Kelner, A. 1949.** Effects of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 35: 73–79.
- Khan, M.F., Kundu, D., Hazra, C., Patra, S. 2019.** A strategic approach of enzyme engineering by attribute ranking and enzyme immobilization on zinc oxide nanoparticles to attain thermostability in mesophilic *Bacillus subtilis* lipase for detergent formulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136:66-82.
- Khasanov, K.T., Davranov, K., Rakhimov, M.M. 2015.** State of fungal lipases of *Rhizopus Microsporus*, *Penicillium* sp and *Oospora lactis* in Border Layers Water-Solid Phase and Factors Affecting Catalytic Properties of Enzymes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51: 600-607.
- Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Beh, B.K., Lai, O.M. 2011.** Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. in submerged and solid-state fermentations. *J. Biomed. Biotechnol.*, 10.1155/2011/702179.
- Kim, H.K., Choi, H.J., Kim, M.H., Sohn, C.B., and Oh, T.K. 2002.** Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim. Biophys. Acta.* 1583:205-212.
- Kim, H.K., Sung, M.H., Kim, H.M., Oh, T.K. 1994.** Occurrence of Thermostable Lipase in Thermophilic *Bacillus* sp. Strain 398. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 961-962.
- Kim, S.T., Heelis, P.F., Sancar, A. 1992.** Energy transfer (deazaflavin→FADH₂) and electron transfer (FADH₂→T⇌T) kinetics in *Anacystis nidulans* photolyase. *Biochemistry*, 31(45): 11244–11248.
- Kino, K., Sugiyama, H. 2005.** UVR-induced G-C to C-G transversions from oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 571: 33–42.
- Kiran, K.K., Chandra, T.S. 2008.** Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. strain TSCVKK. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77: 1023–1031.
- Kittilson, J.D., Reindl, K.M., Sheridan, M.A. 2011.** Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess two hormone-sensitive lipase-encoding mRNAs that are differentially

expressed and independently regulated by nutritional state. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, 158: 52-60.

Knippers, R. 1997. Molekulare Genetik. Thieme, USA, ISBN 3-13-477007-5.

Kobayashi, H. 1989. Liquid Leather Cleaners. Japanese Patent, No: 1,225,700.

Kobayashi, T., Nagao, T., Watanabe, Y., Shimada, Y. 2012. Promotion of the lipase-catalyzed hydrolysis of conjugated linoleic acid lmenthyl ester by addition of an organic solvent. *Springer Plus*, 1: 1.

Konkit, M., Choi, W.J., Kim, W. 2016. Aldehyde dehydrogenase activity in *Lactococcus chungangensis*: application in cream cheese to reduce aldehyde in alcohol metabolism. *J. Dairy Sci.*, 99: 1755-1761.

Krauzer, N.K. 1988. Genetic variation and exchange: Zinsser Microbiology. JOKLIK WF. Practici-Hall int., USA, pp: 103-110.

Krishna, S.H., Karanth, N.G. 2002. Lipase and lipase-catalyzed esterification reaction in nonaqueous media. *Catalysis Review*, 44(4): 499-591.

Kuepethkaew, S., Sangkharak, K., Benjakul, S., Klomkiao, S. 2017. Laundry detergent-stable lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas: Effect of extraction media and biochemical characterization. *Int J Food Properties*. 20: 769-781.

Kugimiya, W., Otani, Y., Hashimoto, Y., Takagi, Y. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141(1): 185– 190.

Kumar, C.G., Malik, R.K., Tiwari, M.P. 1998. Novel enzyme-based detergents: An Indian perspective. *Curr. Sci.*, 75: 1312-1318.

Kumar, M.D.J., Rejitha, R., Devika, S., Balakumaran, M.D., Nancy Rebecca, A.I.M., Kalaichelvan P.T. 2012a. Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus* sp. MPTK 912 isolated from oil mill effluent. *Advances in Applied Science Research*, 3(2):930-938.

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar S.S., Gupta R. 2005. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr. Purif.*, 41:38-44.

Kumar, V., Jahan, F., Mahajan, R.V., Saxena, R.K. 2016. Efficient regioselective acylation of quercetin using *Rhizopus oryzae* lipase and its potential as antioxidant. *Bioresource Technol.*, 218: 1246-1248.

Kumar, A., Parihar, S.S., Batra, N. 2012b. Enrichment, isolation and optimization of lipase-producing *Staphylococcus* sp. from oil mill waste (Oil cake). *J. Exp. Sci.*, 3: 26-30.

Kumar, A., Singh, S. 2012. Lipase Production in Solid-state Fermentation (SSF). *Recent Developments and Biotechnological Applications*, 6: 13-27.

Kumar, R., Sharma, A., Kumar, A., Singh, D. 2012c. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: production, purification and some properties. *World Appl. Sci. J.*, 16 (7): 940-948.

Laachari, F., Bergadi, F.E., Sayari, A., Elabed, S., Mohammed, I., Harchali, E.H., Ibsouda, S.K. 2015. Biochemical characterization of a new thermostable lipase from *Bacillus pumilus* strain. *Turk J Biochem.*, 40(1): 8–14.

Laemmlli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- Lampi, A.M., Damerau, A., Li, J., Moio, T., Partanen, R., Forsell, P., Piironen, V. 2015.** Changes in lipids and volatile compounds of oat flours and extrudates during processing and storage. *J Cereal Sci.*, 62: 102-109.
- Larios, A., Garcia, H.S., Ollart, R.M., Valerio-Alfaro, G. 2004.** Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4): 373–376.
- Latha, K., Ramarethinam, S. 1999.** Studies on lipid acyl hydrolases during tea processing. *Ann Plant Physiol.*, 13: 73-78.
- Lecoite, C., Dubreucq, E. and Galzy, P. 1996.** Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases *Biotechnol. Lett.*, 18(8): 869–874.
- Lee, D.W., Kim, H.W., Lee, K.W., Kim, B.C., Choe, E.A., Lee, H.S., Kim, D.S., Pyun, Y.R. 2001.** Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:363–371.
- Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J., Kim, D.S., Suhartono, M.T., Pyun, Y.R. 1999.** Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179: 393-400.
- Lee, K.T., Akoh, C.C. 1998.** Structured lipids: synthesis and application. *Fodd Res. Int.*, 14: 17-34.
- Lee, L.P., Karbul, H.M., Citartan, M., Gopinath, S.C.B., Lakshmipriya, T., Tang, T.-H. 2015.** Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. *Biomed. Res. Int.*, 1-9.
- Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. 1993.** Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 216:155-160.
- Li, M., Yang, L., Xu, G., Wu, J. 2016.** Cloning and characterization of a novel lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* GS11: the first member of a new bacterial lipase family XVI 228. *J. Biotechnol.*, 228: 30-36.
- Lima, V. M. G., Krieger, N., Mitchell, D. A., Baratti, J. C., de Filippis, I., Fontana, J. D. 2004.** Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 31:53-61.
- Lin, J.J., Sancar, A. 1992.** Active site of (A)BC excinuclease I. Evidence for 59 incision by UvrC through a catalytic site involving Asp399, Asp438, Asp466, and His538 residues. *J. Biol. Chem.*, 267: 17688–17692.
- Lin, J.J., Sancar, A., 1990.** Reconstitution of nucleotide excision nuclease with UvrA and UvrB proteins from *Escherichia coli* and UvrC protein from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(34): 21337–21341.
- Lin, S.F., Chiou, C.M., Yeh, C., Tsai, Y.C., 1996.** Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1093–1095.
- Lin, Y.H., Yu, C., Huang, A.H.C. 1986.** Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 244: 346-356.
- Linares, G.G., Manez, P.A., Baldessari, A. 2014.** Lipase-catalyzed synthesis of substituted phenylacetamides: hammett analysis and computational study of the enzymatic aminolysis. *Eur J Organ Chem.*, 2014: 6439-6450.
- Lindsay, D., Mosupye, F., Brözel, V., Von Holy, A. 2000.** Cytotoxicity of alkaline-tolerant dairy-associated *Bacillus* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30: 364–369.

- Liu, Y., Chen, D., Yan, Y., Peng, C., Xu, L. 2011.** Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. *Bioresour. Technol.*, 102: 10414-10418.
- Lokre, S.S., Kadam, D.G. 2015.** Production and characterization of thermostable lipase from *Aeribacillus* sp. *SSL096201 GERF Bull. Biosci.*, 5: 1-7.
- Lopes, P.A., Pestana, J.M., Coelho, D., Madeira, M.S., Alfaia, C.M., Prates, J.A.M. 2019.** From natural triacylglycerol to novel structured lipids containing n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *The Molecular Nutrition of Fats.*, 10.1016/B978-0-12-811297-7.00017-2.
- Lopes, V.R.O., Farias, M.A.I., Belo, M.P.M., Coelho, A.Z. 2016.** Nitrogen sources on TPOMW valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia lipolytica*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(02):261 – 270.
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J.L., Brocca, S., Valero, F. and Lafuente, J. 1998.** Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem. Phys. Lipids*, 93: 143-148.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951.** Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Ma, J., Zhang, Z., Wang, B., Kong, X., Wang, Y., Cao, S., Feng, Y. 2006.** Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expr. Purif.*, 45: 22-29.
- Macedo, G.A., Lozano, M.M.S., Pastore, G.M. 2003.** Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp., *J. Biotechnol.*, 6: 72-75.
- Madalozzo, A.D., Martini, V.P., Kuniyoshi, K.K., de Souza, E.M., Pedrosa, F.O., Glogauer, A., Zanin, G.M., Mitchell, D.A., Krieger, N. 2015.** Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. *J Mol Catal B Enzymatic*, 116:45-51.
- Madan, B., Mishra, P. J. 2009.** Overexpression, purification and characterization of organic solvent stable lipase from *Bacillus licheniformis* RSP-09. *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 17:118-123.
- Magalhaes, S.S., Alves, L., Sebastiao, M., Medronho, B., Almeida, Z.L., Faria, T.Q., Brito, R.M., Moreno, M.J., Antunes, F.E. 2016.** Effect of ethyleneoxide groups of anionic surfactants on lipase activity. *Biotechnol Prog.*, 32: 1276-1282.
- Mahale, P.K., Desai, S.V., Hombalimath, V.S., Achappa, S. 2015.** Isolation, screening and characterization of lipase producing strain from oil contaminated soil of Hubballi, Karnataka. *IJBAB*, 2: 198-201.
- Maiangwa, J., Ali, M.S.M., Salleh, A.B., Rahman, R.N.Z.R.A., Shariff, F.M., Leow, T.C. 2015.** Adaptational properties and applications of cold-active lipases from psychrophilic bacteria. *Extremophiles*, 19: 235-247.
- Mala, J.G.S., Kamini, N.R., Puvanakrishnan, R. 2001.** Strain improvement of *Aspergillus niger* for enhanced lipase production. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 47, 181–186.
- Maldonado, R.R., Macedo, G.A., Rodrigues, M.I. 2014.** Lipase production using microorganisms from different agro-industrial by products. *Int J App Scien Tech.*, 4(1): 108-115.
- Mandepudi, B., Mandepudi, D., Ghanta, V.C. 2013.** Identification and characterization of novel lipase producing soil bacterial isolates B3 and B4 using 16S rDNA analysis. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 4: 149-160.

- Markovitsi, D., Gustavsson, T., Banyasz, A. 2010.** Absorption of UV radiation by DNA: spatial and temporal features. *Mutat Res*, 704: 21–28.
- Marques, T.A., Baldo, C., Borsato, D., Buzato, J.B., Celligoi, M. 2014.** Utilization of dairy effluent as alternative fermentation medium for microbial lipase production. *Roman Biotechnol Lett.*, 19: 9042-9050.
- Masomian, M., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B., Basri, M. 2016.** Analysis of Comparative Sequence and Genomic Data to Verify Phylogenetic Relationship and Explore a New Subfamily of Bacterial Lipases. *PLoS ONE*, 10.1371/journal.pone.0149851.
- Matsumae, H., Furui, M., Shibatani, T. 1993.** Lipase catalysed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of Ditiagem hydrochloride. *J. Ferment. Bioeng.*, 75: 93-98.
- Matsumura, H., Yamamoto, T., Leow, T.C., Mori, T., Salleh, A.B., Basri, M. 2008.** Novel cation- π interaction revealed by crystal structure of thermoalkalophilic lipase. *Proteins*, 70: 592-598.
- Matsunaga, T., Kotaro, H., Nikaido, O. 1991.** Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm. *Photochem Photobiol*, 54: 403–410
- Maugard, T., Rejasse, B., Legoy, M.D. 2002.** Synthesis of water-soluble retinol derivatives by enzymatic method. *Biotechnol Prog.*, 18: 424-8.
- Mazhar, H., Abbas, N., Ali, S., Sohail, A., Hussain, Z., Ali, S.S. 2017.** Optimized production of lipase from *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39. *African Journal of Biotechnology*, 16(19):1106-1115.
- Mazhar, H., Abbas, N., Ali, S.S., Hussain, Z., Ali, S. 2016.** Purification and Characterization of Lipase Production from *Bacillus subtilis* PCSIR-NL39. *J. Biol. Chem. Research*, 33(1):546- 558.
- Mazhar, H., Abbas, N., Zamir, T., Hussain, Z., Ali, S.S., 2018.** Optimization study of lipolytic enzyme from *Bacillus cereus*, PCSIR NL-37. *Punjab Univ. J. Zool.*, 33(2): 217-224.
- McHugh, G.L., Miller, C.G. 1974.** Isolation and Characterization of Proline Peptidase Mutants of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 120(1): 364–371.
- Mehta, A., Bodh, U., Gupta, R. 2017.** Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8: 58-77.
- Meng, Y., Li, S., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., Li, X. 2015.** Effect of lipase addition on hydrolysis and biomethane production of Chinese food waste. *Bioresource Technol.* 179:452–459.
- Mikkola, R., Andersson, M.A., Grigoriev, P., Teplova, V.V., Saris, N.E.L., Rainey, F.A. 2004.** *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from moisturedamaged buildings produced surfactin and a substance toxic to mammalian cells. *Arch. Microbiol.*, 181: 314–323.
- Mo, Q., Liu, A., Guo, H., Zhang, Y., Li, M. 2016.** A novel thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* YB103: screening, purification and characterization. *Extremophiles*, 20: 157-165.
- Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., Moosavi-Nejad, Z. 2011.** Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iran. J. Microbiol.*, 3: 92-98.

- Mohammed, Y., Lee, B., Kang, Z., Du, G. 2014.** Development of a two step cultivation strategy for the production of vitamin B12 by *Bacillus megaterium*. *Micr Cell Fact.*, 13:102.
- Moreau, R.A., Harron, A.F., Powell, M.J., Hoyt, J.L. 2016.** A comparison of the levels of oil, carotenoids, and lipolytic enzyme activities in modern lines and hybrids of grain sorghum. *J Am Oil Chem Soc.*, 93: 569-573.
- Moreno-Pirajan, J., Giraldo, L. 2011.** Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arab J Chem.*, 4: 55-62.
- Moriguchi, H., Hirata, J., Watanabe, T. 1990.** Microorganism based agent for treatment of organic wastes. Japanese Patent, No: 2105899.
- Morita, R., Nakane, S., Shimada, A. 2010.** Molecular Mechanisms of the Whole DNA Repair System: A Comparison of Bacterial and Eukaryotic Systems. *J Nucleic Acids.*, 2010: 179594.
- Mukherjee, K.D. 1994.** Plant Lipases and Their Application in Lipid Biotransformations. *Prog. Lipid Res.*, 33:165–174.
- Mukherjee, K.D. 1995.** Plant lipases in lipid biotransformation: Engineering of/with lipases, Editor(s): Malcata, F.X., Kluwer Academic-Elsevier, Dordrecht, Netherlands, pp: 391-401.
- Muller, H.J. 1927.** Artificial Transmutation of the Gene. *Science*, 66(1699): 84–87.
- Müller, W., Weber, H., Meyer, F., Weissmann, C. 1978.** Site-directed mutagenesis in DNA: Generation of point mutations in cloned β globin complementary DNA at the positions corresponding to amino acids 121 to 123. *Journal of Molecular Biology*, 124(2): 343–358.
- Muthukumar, N., Dhar, S.C. 1982.** Comparative studies on the degreasing of skins using acid lipase and solvent with reference to the quality of finished leathers. *Leather Sci.*, 29: 417-24.
- Nakajima, M., Snape, J., Khare, S.K. 2000.** Method in Non-Aqueous Enzymology: Biochemistry, Editor(s): Gupta, M.N., Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp: 52-69.
- Nakamura, K., Nasu, T. 1990.** Enzyme containing bleaching composition. Japanese Patent, No: 2,208,400.
- Nardini, M., Dijkstra, B.W. 1999.** α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6): 732–737.
- Nawani, N., Dosanjh, N.S., Kaur, J. 1998.** A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, 20(10): 997–1000.
- Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J., 2006.** A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Mol. Cell. Biochem.*, 290: 17–22.
- Ncube, I., Gitlesen, T., Adlercreutz, P., Read, J.S., Mattiasson, B. 1995.** Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis*. *Seed. Biochim. Biophys.*, 1257: 149-156.
- Nerurkar, M., Joshi, M., Pariti, S., Adivarekar, R. 2013.** Application of lipase from marine bacteria *Bacillus sonorensis* as an additive in detergent formulation. *J. Surfact. Deterg.*, 1-9.

- Noble, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmond, M.R., Frenken, L.G.J. 1999.** The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *Annual Reviews in Microbiology*, 53: 315–351.
- Noble, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Frenken, L.G.J., Egmond, M.R. 1993.** The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.*, 331(1–2): 123 – 128.
- Noureddini, H., Gao, X., Philkana, R.S. 2005.** Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour Technol.*, 96: 769-77.
- Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., Kirpichnikov, M. 2013.** Expression and chaperone-assisted refolding of a new cold-active lipase from *Psychrobacter cryohalolentis* K5T. *Protein Expr. Purif.*, 91: 96-103.
- Nthangeni, M.B., Patterton, H.-G., Van Tonder, A., Vergeer, W.P., Litthauer, D. 2001.** Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: A comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7-8): 705-712.
- Nuykert, A., Hongpattarakere, T. 2013.** Improvement of cell-bound lipase from *Rhodotorula mucilaginosa* P11I89 for use as a methanol-tolerant, whole-cell biocatalyst for production of palm-oil biodiesel. *Ann Microbiol.* 63: 929-939.
- Ochoa, L.D.G., Gomez, C.R., Alfaro, G.V., Ros, R.O. 2005.** Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, 37:648–654.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M. 1992.** The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5(3): 197–211.
- Ooi, C.W., Hii, S.L., Kamal, S.M.M., Ariff, A., Ling, T.C. 2011.** Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. *Process Biochem.*, 46: 68-73.
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P.A., de Vries, R.P. 2016.** Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *Int J Food Microbiol.*, 237: 17-27.
- Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A. 1995.** Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: Partial purification, characterization and interesterification of butter fat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 42-51.
- Pahoja, V.M., Sethar, M.A. 2002.** A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. *Pakistan J Appl Sci.*, 2: 474–484.
- Palekar, A.A., Vasudevan, P.T., Yan, S. 2000.** Purification of lipase: a review. *Biocatal Biotransform.*, 18: 177-200.
- Paques, F.W., Macedo, G.A. 2006.** Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais: A Review. *Química Nova*, 29(1): 93.
- Park, H., Lee, K., Chi, Y., Jeong, S. 2005.** Effects of methanol on the catalytic properties of porcine pancreatic lipase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2): 296–301
- Patil, K.J., Chopda, M.Z., Mahajan, R.T. 2011.** Lipase biodiversity. *Indian J Sci Technol.*, 4: 971-982.
- Peak, M.J., Peak, J.G. 1987.** Photosensitized DNA damages. *Photochem Photobiol*, 45: 57.

- Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leão, M.H.M., Sant'Anna, J.G.L. 1997.** A stable lipase from *Candida lipolytica*: cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63-65:73–85.
- Petersen, M.T.N., Fojan, P., Petersen, S.B. 2001.** How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of biotechnology*, 85(2): 119-131.
- Pettijohn, D.E., Hanawalt, P.C. 1964.** Evidence for repairreplication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 9: 395–410.
- Pfeifer, G.P. 1997.** Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem. Photobiol.*, 65: 270–283.
- Pfeifer, G.P., You, Y.H., Besaratinia, A. 2005.** Mutations induced by ultraviolet light. *Mutation Research*, 571: 19–31.
- Phelps, R.J., McKillip, J.L. 2002.** Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*68: 3147–3151.
- Phuah, E.T., Tang, T.K., Lee, Y.Y., Choong, T.S.Y., Tan, C.P., Lai, O.M. 2015.** Review on the current state of diacylglycerol production using enzymatic approach. *Food Bioprocess Technol.*, 8: 1169-1186.
- Pogaku, P., Suresh, A., Srinivas, P., Reddy, S.R. 2010.** Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 882-886.
- Prasad, P., Manjunath, K. 2011.** Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian J Biotechnol.*, 10: 121–124.
- Pratish, A., Gupta, A., Vyas, G. and Sharma, P. 2013.** Microbiology application. Bhalla Publishers. Dehradun, India, pp: 64-83.
- Price, J., Hofmann, B., Silva, V.T., Nordblad, M., Woodley, J.M., Huusom, J.K. 2014.** Mechanistic modeling of Biodiesel production using a liquid lipase Formulation. *Biotechnol Prog.*, 30: 1277-1290.
- Priji, P., Unni, K.N., Sajith, S., Binod, P., Benjamin, S. 2015.** Production, optimization, and partial purification of lipase from *Pseudomonas* sp. strain BUP6, a novel rumen bacterium characterized from Malabari goat. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 62 (1): 71-78.
- Prod'hom, G., Bille, J. 2017.** Infectious Diseases. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 179 pp.
- Ramakrishnan, V., Balakrishnan, B., Rai, A.K., Narayan, B., Halami, P.M. 2012.** Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste. *Int. Aquat. Res.*, 4: 1-14.
- Ramakrishnan, V., Goveas, L.C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P.M., Narayan, B. 2016.** Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 6: 19-27.
- Ramani, K., John Kennedy, L., Ramakrishnan, M., Sekaran, G. 2010.** Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochem.*, 45: 1683-1691.
- Ramchuran, S.O., Vargas, V.A., Hatti-Kaul, R., Karlsson, E.N. 2006.** Production of a lipolytic enzyme originating from *Bacillus halodurans* LBB2 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 463-472.
- Ramig, R.F. 1990.** Principles of Animal Virus Genetics: Virology, Editor(s): Fields, B.N., Knipe, D.M., Raven press, London, UK, pp: 95-144.

- Ramos-Sanchez, L.B., Cujilema-Quitio, M.C., Julian-Ricardo, M.C., Cordova, J., Fickers, P. 2015.** Fungal lipase production by solid state fermentation. *J Bioprocess Biotechnol.*, 5: 1-9.
- Rashid, F.A.A., Rahim, R.A., Ibrahim, D., Balan, A., Bakar, N.M.A. 2013.** Purification and properties of thermostable lipase from a Thermophilic bacterium, *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2. *J Pure Appl Microbiol.*, 7: 1635-1645.
- Rastogi, R.P., Rajeshwar, P.S. 2011.** Genotoxin-Induced DNA Damage: Detection, Recovery and Influence on Human Health. *Advances in Life Sciences*, 10.13140/RG.2.1.1643.9761.
- Rastogi, R.P., Richa, Kumar, A., B. Tyagi, M.B., P. Sinha, R.P. 2010.** Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids*, 10.4061/2010/592980.
- Ray, A. 2012.** Application of lipase in industry. *Asian J Pharm Technol.*, 2: 33-37.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. 2009.** Advances in Colloid and Interface Science. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147–148: 237–250.
- Ribeiro, B.D., de Castro, A.M., Coelho, M.A.Z., Freire, D.M.G. 2011.** Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res.*, 1-16.
- Rivera, I., Robles, M., Mateos-Diaz, J.C., Gutierrez-Ortega, A., Sandoval, G. 2017.** Functional expression, extracellular production, purification, structure modeling and biochemical characterization of *Carica papaya* lipase 1. *Process Biochem.*, 56: 109-116.
- Rivero, C.W., Palomo, J.M. 2016.** Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase at alkaline pH and their application in the regioselective deprotection of per-O-acetylated thymidine. *Catalysts*, 6:115.
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., Leiros, I. 2009.** Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci.*, 66(6): 981-993.
- Rochette, P.J., Therrien, J.P., Drouin, R., Perdiz, D., Bastien, N., Drobetsky, E.A., Sage, E. 2003.** UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine–thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res.*, 31: 2786–2794.
- Rodrigues, J.P., Orrico, A.C.A., Junior, O., Previdelli, M.A, Seno, L., de Araujo, L.C., Sunada, NdS. 2014.** Adding oil and lipase on the anaerobic digestion of pig manure. *Ciencia Rural*. 44: 544–547
- Romdhane, IB-B., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouri, A., Belghith, H. 2010.** A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochem Eng J.*, 53: 112-120.
- Rong, H., ChengQun, L., BaoLing, H., LiJuan, G., JiangMing, Y., RuiLong, L., JinHua, H., Yu, H., Qiang, L. 2014.** Relationships between virulence and activities of protease, chitinase and lipase produced by entomogenous *Pestalotiopsis disseminata*. *J South Agric.*, 45:1172-1177.
- Sae-leaw, T., Benjakul, S. 2018.** Lipase from liver of seabass (*Lates calcarifer*): characteristics and the use for defatting of fish skin. *Food Chem*. 240: 9-15.
- Saengsanga, T., Siripornadulsil, W., Siripornadulsil, S. 2016.** Molecular and enzymatic characterization of alkaline lipase from *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA isolated from lipid-rich food waste. *Enzyme Microb. Technol.*, 82: 23-33.

- Sakate, P., Salunkhe, P. 2013.** Study of lipase activity during development of *Chilo partellus* (Swinhoe). *Uttar Pradesh J Zool.*, 33: 61-68.
- Salaberria, F., Palla, C., Carrm, M.E. 2017.** Hydrolytic activity of castor bean powder: effect of gum arabic, lipase and oil concentrations. *J Am Oil Chem Soc.*, 94:741–745.
- Salihu, A., Alam, M.Z. 2015.** Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochem.*, 50: 86-96.
- Salis, A., Bhattacharyya, M.S., Monduzzi, M., Solinas, V. 2009.** Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. *J Mol Catal B Enzymatic*, 57: 262-269.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kaçmaz, K., Linn, S. 2004.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.*, 73: 39-85
- Sanfilippo, C., Nicolosi, G., Patti, A. 2014.** Milnacipran as a challenging example of aminomethyl substrate for lipase-catalyzed kinetic resolution. *J Mol Catal B Enzymatic*, 104: 82-86.
- Sangeetha, R., Geetha, A., Arulpandi, I. 2010.** Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: Production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 179-185.
- Santos, L.D., Coutinho, J.A., Ventura, S.P. 2015.** From water-in-oil to oil-in-water emulsions to optimize the production of fatty acids using ionic liquids in micellar systems. *Biotechnol Prog.*, 31: 1473-1480.
- Saphir, J. 1967.** Permanent hair waving. West Germany Patent, No: 1,242,794.
- Saraswat, R., Verma, V., Sistla, S., Bhushan, I. 2017.** Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus* strain for detergent formulation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 30:33-38.
- Saravanan, D., Anusuya, C., Divya, B.B., Usha, M. 2014.** Environmentally benign scouring of wool fibers using mesophile acidic lipase. *Fibers Polymers*. 15:1902–1907.
- Sarıkaya, E. 1995.** Alfa Amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu, *Doktora Tezi*, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna, K.R., Sridhar, S., Mehtab, V., Sumana, C. 2017.** Recent advances on sources and industrial applications of lipase *Biotechnol. Prog*, 34 (1): 5-27.
- Saun, N.K., Narwal, S.K., Dogra, P., Chauhan, G.S., Gupta, R. 2014.** Comparative Study of Free and Immobilized Lipase from *Bacillus Aerius* and its Application in Synthesis of Ethyl Ferulate. *JOS*, 63: 911-919.
- Savaghebi, D., Safari, M., Rezaei, K., Ashtari, P., Farmani, J. 2012.** Structured lipids produced through lipase-catalyzed acidolysis of canola oil. *J Agric Sci Technol.*, 14: 1297-1310.
- Saxena, C., Sancar, A., Zhong, D. 2004.** Femtosecond dynamics of DNA photolyase: energy transfer of antenna initiation and electron transfer of cofactor reduction. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(46): 18026–18033.
- Schmid, R.D., Verger, R. 1998.** Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37: 1608-1633.

- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., Schmid, R.D. 1994.** Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochim Biophys Acta.*, 1214:43–53.
- Schrag, J. D., Li, Y., Wu, S., Cygler, M. 1991.** Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351(6329):761–764.
- Schrag, J.D., Cygler, M. 1997.** Lipases and α/β hydrolase fold. *Methods Enzymol*, 284: 85–107.
- Seitz, E.W. 1974.** Industrial Applications of Microbial Lipases-A Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51: 12–16.
- Sekiguchi, M., Tsuzuki, T. 2002.** Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene*, 21: 8895–8904.
- Senanayake, S.P.J.N., Shahidi, F. 2002.** Lipase-catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into borage oil: optimization using response surface methodology. *Food Chemistry*, 77: 115-123.
- Sethi, B.K., Rout, J.R., Das, R., Nanda, P.K., Sahoo, S.L. 2013.** Lipase production by *Aspergillus terreus* using mustard seed oil cake as a carbon source. *Annals of Microbiology*, 63(1):241–252.
- Setzu, S., Salis, S., Demontis, V., Salis, A., Monduzzi, M., Mula, G. 2007.** Porous silicon-based potentiometric biosensor for triglycerides. *Physica Status Solidi*, 204: 1434–1438.
- Shah, S., Sharma, S., Gupta, M.N. 2004.** Biodiesel preparation by lipase catalysed transesterification of Jatropha oil. *Energy Fuels*, 18: 154-9.
- Shakibaie, M., Ameri, A., Ghazanfarian, R., Adeli-Sardou, M., Amirpour-Rostami, S., Torkzadeh-Mahani, M., Imani, M., Forootanfar, H. 2018.** Statistical Optimization of Kojic Acid 190 A. AMERI ET AL. Production by a UV-induced Mutant Strain of *Aspergillus terreus*. *Braz. J. Microbiol*, 49, 865–871
- Shariff, F.M., Leow, T.C., Mukred, A.D., Salleh, A.B., Basri, M., Rahman, R.N.Z.R.A. 2007.** Production of L2 lipase by *Bacillus* sp. strain L2: Nutritional and physical factors *J. Basic Microbiol.*, 47: 406-412.
- Sharma, A.K., Sharma, V., Saxena, J. 2016.** A Review on Applications of Microbial Lipases. *International Journal of Biotech Trends and Technology (IJBTT)*, 19(1), 10.14445/22490183/IJBTT-V19P601.
- Sharma, D., Sharma, B., Shukla, A. 2011.** Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*, 10: 23-40.
- Sharma, P., Sharma, N., Pathania, S., Handa, S. 2017.** Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 369–377.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2001.** Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8): 627–662.
- Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Gupta, L.K., Gupta, J.K. 2002.** Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochem.*, 37: 1075–1084.
- Sharma, S., Kanwar, S.S. 2014.** Organic solvent tolerant lipases and applications. *Sci. World J.*, 2014:1.
- Shimada, Y., Nagao, T., Watanabe, Y. 2005.** Application of lipase to industrial scale purification of oil- and fat-related compounds: Handbook of Industrial biocatalysis, Editor(s): Hou, C. T., Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp: 1-27.

- Shortle, D., Dimaio, D., Nathans, D. 1981.** Directed Mutagenesis. *Annual Review of Genetics*, 15: 265–294.
- Shortle, D., Nathans, D. 1978.** Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(5): 2170–2174.
- Singh, A.K., Mukhopadhyay, M. 2012.** Overview of Fungal Lipase: A Review. *Appl Biochem Biotechnol.*, 166(2): 486-520.
- Singh, M., Chandraveer, Tripathi, A. 2017.** Isolation and Screening of Lipases producing Microorganisms from Natural Sources. *Indian journal of ecology*, 44(1): 19-23.
- Sinha, R.P., Hader, D.P. 2002.** UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1(4): 225–236.
- Sirisha, E., Rajasekar, N., Narasu, M.L. 2010.** Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. *Advances in Biological Research*, 4(5): 249-252.
- Sivaramakrishnan, R., Incharoensakdi, A. 2016.** Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus* sp. for methyl ester production from algal oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(5): 517-522.
- Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E. 2003.** The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.*, 531(1-2): 231-251.
- Smythe, C.V. 1951.** Microbiological production of enzymes and their industrial application. *Econ Bot.*, 5: 126-44.
- Solanki, S., Pandey, C.M., Soni, A., Sumana, G., Biradar, A.M. 2016.** An amperometric bioenzymatic biosensor for the triglyceride tributyrin using an indium tin oxide electrode coated with electrophoretically deposited chitosan-wrapped nanozirconia. *Microchim Acta*, 183: 167–176.
- Soleymani, S., Alizadeh, H., Mohammadian, H., Rabbani, E., Moazen, F., Sadeghi, H.M.M., Shariat, Z.S., Etemadifar, Z., Rabbani, M. 2017.** Efficient Media for High Lipase Production: One Variable at a Time Approach. *Avicenna J Med Biotech.*, 9(2): 82-86.
- Song, X., Qi, X., Hao, B., Qu, Y. 2008.** Studies of substrate specificities of lipases from different sources. *Eur J Lipid Sci Technol.*, 110: 1095-1101.
- Sonntag, N.O.V. 1979.** Fat Splitting. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56: 729A–732A.
- Stergiou, P.Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., Papamichael, E.M. 2013.** Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv.*, 31: 1846-1859.
- Stinson, S.C. 1995.** Fine and intermediate chemical markers emphasize new products and process. *Chem. Eng. News*, 73: 10-26.
- Stirton, A.J. 1964.** Fat Splitting, Esterification and Interesterification: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Editor(s): Bailey, A.E., Swern, D., John Wiley & Sons, New York, USA, pp: 931–972.
- Su, E., Xu, J., You, P. 2014.** Functional expression of *Serratia marcescens* H30 lipase in *Escherichia coli* for efficient kinetic resolution of racemic alcohols in organic solvents. *J Mol Catal B Enzymatic.*, 106: 11-16.
- Su, J., Zhang, F., Sun, W., Karuppiah, V., Zhang, G., Li, Z., Jiang, Q. 2015.** A new alkaline lipase obtained from the metagenome of marine sponge *Ircinia* sp. *World J Microbiol Biotechnol.*, 31: 1093-1102.

- Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y. 1991.** Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp, *J. Biochem. (Tokyo)*, 109:211-216.
- Suominen, I., Andersson, M.A., Andersson, M.C., Hallaksela, A.M., Kämpfer, P., Sutherland, B.M. 1974.** Photoreactivating enzyme from human leukocytes. *Nature*, 248(5444): 109–112.
- Sutherland, B.M., Bennett, P.V. 1995.** Human white blood cells contain cyclobutyl pyrimidine dimer photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21): 9732–9736.
- Suwanno, S., Rakkan, T., Yunu, T., Paichid, N., Kimtun, P., Prasertsan, P., Sangkharak, K. 2017.** The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst. *Fuel*, 195: 82-87.
- Svendsen, A. 2000.** Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543(2000): 223-238.
- Tachioka, M., Sugimoto, N., Nakamura, A., Sunagawa, N., Ishida, T., Uchiyama, T., Igarashi, K., Samejima, M. 2016.** Development of simple random mutagenesis protocol for the protein expression system in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Biofuels*, 10.1186/s13068-016-0613-z.
- Takaç, S., Marul, B. 2008.** Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 1019-1025.
- Tambekar, D.H., Dhandale, V.R. 2012.** Phylogenetic analysis of lipase producing bacteria using physiological and molecular techniques from the lonar crater. *Int. J. App. Microbiol. Sci.*, 1(2): 24-31.
- Tamilarasan, K., Kumar, M.D. 2012.** Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1:309–313.
- Tan, S., Owusu, A.R.K. Knapp, J. 1996.** Low temperature organic phase biocatalysis using cold-adapted lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* P38. *Food Chem.*, 57: 415-418.
- Tanaka, K., Takanaka, S., Yoshida, K. 2014.** A second generation *Bacillus* cell factory for rare inositol production. *Bioengineered.*, 5(5): 331–4.
- Taylor, J.M., Sutherland, A.D., Aidoo, K.E., Logan, N.A. 2005.** Heatstable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 242: 313–317
- Tessman, I., Kennedy, M.A. 1991.** The two-step model of UV mutagenesis reassessed: deamination of cytosine in cyclobutane dimers as the likely source of the mutations associated with photoreactivation. *Mol Gen Genet.*, 277: 144–148.
- Tessman, I., Liu, S., Kennedy, M.A. 1992.** Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA: mostly error-free processing of deaminated cytosine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 1159–1163
- Thakur, S. 2012.** Lipases, its sources, properties and applications: a Review. *Int J Sci Eng Res.*, 3: 1-29.
- Thakur, V., Tewari, R., Sharma, R. 2014.** Evaluation of production parameters for maximum lipase production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and scale-up in bioreactor. *Chin. J. Biol.*, 10.1155/2014/208462.

- Thirstrup, K., Verger, R., Carriere, F. 1994.** Evidence for a Pancreatic Lipase Subfamily with New Kinetic Properties. *Biochemistry*, 33(10): 2748-2756.
- Todo, T. 1999.** Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutation Research*, 434(2): 89–97.
- Todorova, T., Guncheva, M., Dimitrova, R., Momchilova, S. 2015.** Walnut oil–unexplored raw material for lipase-catalyzed synthesis of low-calorie structured lipids for clinical nutrition. *J Food Biochem.*, 39: 603-611.
- Toscano, L., Gochev, V., Montero, G., Stoytcheva, M. 2011.** Enhanced Production of Extracellular Lipase by Novel Mutant Strain of *Aspergillus Niger*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1): 2243-2247.
- Trautwein, G. and Kuhlmann, K.P. 1982.** Immunofluoreszenz, Theorie and Praxis, Hannover, p:52.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M., Oliveira, J.V. 2010.** A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.*, 3: 182-196.
- Tripathi, R., Singh, J., Bharti, R.K., Thakur, I.S. 2014.** Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia*, 54: 518-529.
- Tschocke, C. 1990.** Enzymatic treatment of fats in wastewater treatment plants. *Eau Ind, Nuisances* 138: 63-64.
- Tümtürk, H., Karaca N., Demirel, G., Şahin, F. 2007.** Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/ κ -Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(3):281-285.
- Turnbull, P.C.B. 1996.** Bacillus: Medical Microbiology, Editor(s): Baron, S., Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, USA.
- Ueda, T., Kato, A., Kuramitsu, S., Terasawa, H., Shimada, I. 2005.** Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43): 36237–36243.
- Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S. 2001.** Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil mid fraction. *Process Biochem.*, 36: 933-939.
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A. 1994.** The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 2(4): 293–308.
- Uttatree, S., Winayanuwattikun, P., Charoenpanich, J. 2010.** Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162: 1362-1376.
- Vakhlu, J., Kour, A. 2006.** Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9: 1-17.
- van Hoffen, A., Venema, J., Meschini, R., Van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F. 1995.** Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6–4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts, *EMBO Journal*, 14(2): 360–367.
- van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. 2001.** The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.*, 309: 215–226.
- Vaquero, M.E., Barriuso, J., Martinez, M.J., Prieto, A. 2016.** Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100:2047–2061.

- Vaquero, M.E., Prieto, A., Barriuso, J., Martinez, M.J. 2015.** Expression and properties of three novel fungal lipases/sterol esterases predicted in silico: comparison with other enzymes of the *Candida rugosa*-like family. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 99: 10057-10067.
- Veerepogu, M., Narayanan, A.S., Ponmurugan, K., Jeya, K.R. 2013.** Screening Selection Identification Production and Optimization of Bacterial Lipase Production from Oil Spilled Soil. *Asian J Pharm Clin Res.*, 6(3):62-67.
- Verhoeven, E.E.A., van Kesteren, M., Moolenaar, G.G., Visse, R., Goosen. N. 2000.** Catalytic sites for 39 and 59 incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC. *J. Biol. Chem.*, 275: 5120–5123.
- Villeneuve, P. 2003.** Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105(6): 308-317.
- Vulfson, E.N. 1994.** Industrial Applications of Lipases: Lipases-Their Structure, Biochemistry and Application, Editor(s): Woolley, P., Peterson, S.B., Cambridge University Press, UK, pp: 271-288.
- Wang, Y., Srivastava, K.C., Shen, G.J., Wang, H.Y. 1995.** Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). *J. Ferment. Bioeng.*, 79(5): 433-438.
- Wang, B., Wang, A., Cao, Z., Zhu, G. 2016.** Characterization of a novel highly thermostable esterase from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans* TK64. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 6-8.
- Wang, Q., Hou, Y., Ding, Y., Yan, P. 2012.** Purification and biochemical characterization of a cold-active lipase from Antarctic sea ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. NJ 70. *Mol. Biol. Rep.*, 39: 9233-9238.
- Weissman, L., de Souza-Pinto, N.C., Stevensner, T., Bohr, V.A. 2007.** DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience*, 145(4): 1318-1329.
- Willis, W.M., Marangoni, A.G. 2002.** Enzymatic Interesterification: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biology*, Editor(s): Akoh, C.C., Min, D.B., Marcel Dekker Inc, New York, pp: 839-875.
- Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W. 1990.** Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343(6260): 771-774.
- Xie, W., Khosasih, V., Suwanto, A., Kim, H.K. 2012.** Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. *J Microbiol Biotechnol.*, 22: 84-91.
- Xu, F., Wu, Q., Chen, X., Lin, X., Wu, Q. 2015.** A Single lipase-catalysed one-pot protocol combining aminolysis resolution and azamichael addition: an easy and efficient way to synthesiseb amino acid esters. *Eur J Organ Chem.*, 2015: 5393-5401.
- Xu, T., Liu, L., Hou, S., Xu, J., Yang, B., Wang, Y. 2012.** Crystal structure of a mono- and diacylglycerol lipase from *Malassezia globosa* reveals a novel lid conformation and insights into the substrate specificity. *J. Struct. Biol.*, 178: 363-369.
- Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H., Yan, Y. 2016.** A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B Enzym*, 126: 76-89.
- Yele, V.U., Desai, K. 2015.** A New Thermostable and Organic Solvent-Tolerant Lipase from *Staphylococcus warneri*; Optimization of Media and Production Conditions Using Statistical Methods. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 855-869.
- Yeşilbağ, K. 2002.** Mutasyonel Değişimler ve Veteriner Virolojideki Önemi. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 21: 125-131.

- Yoo, H.Y., Simkhada, J.R., Cho, S.S., Park, D.H., Kim, S.W., Seong, C.N., Yoo, J.C. 2011.** A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 102: 6104-6111.
- Yoon, J.H., Lee, C.S., O'Connor, T., Yasui, A., Pfeifer, G.P. 2000.** The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J. Mol. Biol.*, 299: 681-693.
- Yu, S., Yu, S., Han, W., Wang, H., Zheng, B., Feng, Y. 2010.** A novel thermophilic lipase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 representing a new subfamily of bacterial lipases. *J Mol Catal B Enzym.*, 66: 81-89.
- Zehani, N., Kherrat, R., Dzyadevych, S.V., Jaffrezic-Renault, N. 2015.** A microconductometric biosensor based on lipase extracted from *Candida rugosa* for direct and rapid detection of organophosphate pesticides. *Int J Environ Anal Chem.* 95: 466-479.
- Zhao, L. L., Chen, X.X., Xu, J.H. 2010.** Strain Improvement of *Serratia marcescens* ECU1010 and Medium Cost Reduction for Economic Production of Lipase. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26:537-543.
- Zheng, J., Xu, L., Liu, Y., Zhang, X., Yan, Y. 2012.** Lipase-coated K₂SO₄ microcrystals: Preparation, characterization, and application in biodiesel production using various oil feedstocks. *Bioresour. Technol.*, 110: 224-231.
- Zheng, X., Chu, X., Zhang, W., Wu, N., Fan, Y. 2011.** A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: Gene cloning and characterisation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90: 971-980.
- Zhu, Y., Li, H., Ni, H., Xiao, A., Li, L., Cai, H. 2015.** Molecular cloning and characterization of a thermostable lipase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. EPT9. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 295-306.
- Zimmerman R.L., Cornovale J., Shaw S. 2014.** World Enzymes, BCC.
- Zin, N.B.M., Yusof, B.M., Oslan, S.N., Wasoh, H., Tan, J.S., Ariff, A.B., Halim, M. 2017.** Utilization of acid pre-treated coconut dregs as a substrate for production of detergent compatible lipase by *Bacillus stratosphericus*. *AMB Express.*, 17:7.
- Zubiolo, C., Santos, R.C.A., Figueiredo, R.T., Soares, C.M.F., Santana, L. 2015.** Morphological and physicochemical aspects of microbial lipase obtained from novel agroindustrial waste encapsulated in a sol-gel matrix. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120: 1503-1509.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Vichi Sicha IRIANTO
Doğum Yeri ve Tarihi : Sragen, 04.04.1994
Yabancı Dil : İngilizce, Türkçe

Eğitim Durumu
Lise : SMA N Sragen BBS
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi

İletişim (e-posta) : vichisichairianto@gmail.com

Yayınları : -