

T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI MİKROORGANİZMALARIN ÜRETTİĞİ LİPAZ
ENZİMİNİN OPTİMİZASYON VE
KARAKTERİZASYONU

Tezi Hazırlayan
Ezgi KESKİN TALDARI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2019
NEVŞEHİR

T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI MİKROORGANİZMALARIN ÜRETTİĞİ LİPAZ
ENZİMİNİN OPTİMİZASYON VE
KARAKTERİZASYONU

Tezi Hazırlayan
Ezgi KESKİN TALDARI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2019
NEVŞEHİR

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK danışmanlığında Ezgi KESKİN TALDARI tarafından hazırlanan “**Bazı Mikroorganizmaların Ürettiği Lipaz Enziminin Optimizasyon ve Karakterizasyonu**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

25.01/2019

JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Serkan YILMAZ

Üye : Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Üye : Prof. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 29.01.2019... tarih ve 09-31..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

29/01/2019
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.


Ezgi KESKİN TALDARI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince bilgisini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, tezimin her aşamasında ve her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK'e,

Tezimin uygulama aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen, aynı zamanda kişilik olarak da bana çok şey katan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Belma ASLIM'a,

Çalışmam süresince benimle düşüncelerini paylaşan ve çalışma şartları konusunda her zaman destek olan çalışma arkadaşım Uzman Enver Ersoy ANDEDEN'e,

Maddi ve manevi olarak desteklerini her zaman hissettiren değerli annem Macide KESKİN ve babam Hasan KESKİN'e,

Son olarak, hayatta en önemli desteğim olan, çalışmalarına ilgisini ve teşvikini esirgemeyen sevgili eşim Polat TALDARI'ye,

Teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca teknik ve idari yardımlarından dolayı Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Rektörlüğü'ne, Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanlığı'na, Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi BAP Birimi'ne teşekkür ederim.

BAZI MİKROORGANİZMALARIN ÜRETTİĞİ LİPAZ ENZİMİNİN OPTİMİZASYON VE KARAKTERİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Ezgi KESKİN TALDARI

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2019

ÖZET

Bu çalışmada ekstrem çevre şartlarından alınan yağ ile kontamine olmuş toprak ve kaynak sularından izole edilen 24 tribütrin agar pozitif izolatın lipolitik aktivitesi pNPP lipaz testi ile incelenmiştir. Lipaz aktivitesinin yüksek olduğu izolatlar *Aeromonas veronii* olarak tanımlanmıştır. En yüksek enzim aktivitesine sahip EK-2 (26 U/ml) izolatı optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. EK-2 izolatından lipaz üretimi için en iyi koşulları belirlemek üzere, farklı fermantasyon parametreleri optimize edilmiş ve optimum inkübasyon süresi ve sıcaklığı 18 saat ve 30 °C, optimum besiyeri pH'sı 7, en uygun yağ oranı ve kaynağı % 1 hindistancevizi yağı, en uygun inorganik ve organik azot kaynakları sırasıyla amonyum sülfat ve jelatin olarak belirlenmiştir. Optimize edilmiş fermantasyon koşullarında, hücre dışı lipaz üretilmiş ve diyaliz ve ultrafiltrasyon ile kısmen saflaştırılmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enziminin ultrafiltrasyon aşamasında toplam ve spesifik aktivitesinin (39,47 U/ml) diğer saflaştırma adımlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kısmi saflaştırılmış lipaz karakterize edilmiş ve optimum çalışma sıcaklığı 40 °C (45,05 U/ml), tampon pH'sı pH 8.0 (45,17 U/ml), tampon konsantrasyonu 50 mM (56,35 U/ml) ve substrat konsantrasyonu 27 mg/ml (48,6 U/ml) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, EK-2 izolatının lipid içeriği, sülfö-fosfo vanilin testi ile 26,08 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu çalışma, fermantasyon koşullarının optimizasyonunun ve enzim karakterizasyonu çalışmalarının EK-2 lipaz aktivitesinde önemli bir artışa yol açtığını göstermiştir. Bu sonuçlara göre,

ileriki çalışmalarda yüksek enzimatik aktiviteye sahip EK-2 lipazının biyodizel üretimi gibi biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması mümkündür.

Anahtar kelimeler: *Lipolitik aktivite, Aeromonas veronii, pNPP, parametre optimizasyonu*

Tez Danışman: Prof. Dr. şahlan ÖZTÜRK

Sayfa Adeti: 105



**OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF THE LIPASE ENZYME
PRODUCED BY SOME MICROORGANISMS**

(M. Sc. Thesis)

Ezgi KESKİN TALDARI

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

January 2019

ABSTRACT

In this study lipolytic activity of 24 tributyrin agar positive strains isolated from extreme environmental sources such as oil contaminated soil and spring water were examined with pNPP lipase assay. Isolates having higher lipase activity were identified as *Aeromonas veronii*. In the subsequent optimization and characterization studies, EK-2 (26 U/ml) strain possessing higher enzyme activity was used. To determine the best conditions for EK-2 lipase production, different fermentation conditions were performed and optimum incubation time and temperature were determined as 18 hours and 30 °C, optimum media pH as 7, optimum fat content and source was determined as 1% coconut oil, inorganic and organic nitrogen source were determined as ammonium sulfate and gelatin with respectively. At the optimized fermentation conditions, extracellular lipase was produced and partially purified by dialysis and ultrafiltration. It was determined that the total and specific activity of purified enzyme (39,47 U/ml) in the ultrafiltration step was higher than the other purification steps. The partially purified lipase was characterized and the optimum working temperature, buffer pH and concentration, substrate concentration was determined as 40 °C (45,05 U/ml), pH 8.0 (45,17 U/ml), 50 mM (56,35 U/ml) and 27 mg/ml (48,6 U/ml) with respectively. This study revealed that the optimization of fermentation conditions and enzyme characterization studies led to a significant increase in activity of EK-2 lipase. In addition, the lipid content of the EK-2 strain was determined as 26,08 µg/ml by sulfo-phospho vanillin assay. According to these results, it is possible to use EK-2 lipase with

high enzymatic activity in biotechnological applications such as biodiesel production in advanced studies.

Keywords: Lipolytic activity, Aeromonas veronii, pNPP, optimized parameters

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Page Number: 105



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
RESİMLER LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xvi
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
2.1. Lipazlar	3
2.2. Lipazların yapısı	4
2.3. Lipazların sınıflandırılması	6
2.4. Lipaz kaynakları	6
2.4.1. Mikrobiyal lipazlar	7
2.4.1.1. Bakteriyel lipazlar	7
2.4.1.2. Fungal lipazlar	7
2.4.1.3. Maya lipazları	7
2.5. Lipazların hücredeki lokasyonu	9
2.6. Mikrobiyal lipaz üretimine etki eden faktörler	10
2.6.1. Karbon kaynağı	10

2.6.2.	Azot Kaynağı	11
2.6.3	İnkübasyon süresi ve sıcaklığı	12
2.6.4.	Besiyeri pH'sı.....	13
2.6.5.	Yüzey-aktif maddeler.....	13
2.7.	Lipaz aktivitesine etki eden faktörler	14
2.7.1.	Sıcaklık.....	14
2.7.2.	pH.....	14
2.7.3.	Zaman.....	15
2.7.4.	Substrat.....	15
2.7.5.	Çeşitli maddelerin varlığı.....	16
2.8	Lipazların endüstrideki kullanımı ve biyoteknolojik önemi	16
2.8.1	Deterjanlar ve temizlik maddeleri	18
2.8.2.	Gıda	19
2.8.3.	Farmasötik.....	19
2.8.4.	Kozmetik	20
2.8.5.	Deri.....	20
2.8.6.	Kağıt.....	21
2.8.7	Biyodizel uygulamaları	21
2.8.8.	Diğer uygulamalar.....	22
2.9	Lipolitik aktivite tayin metotları	22
2.9.1	Kalitatif metotlar	23
2.9.2.	Kantitatif metotlar	23
2.10.	Saflaştırma yöntemleri	25
2.11	<i>Aeromonas</i> spp.	25
2.12.	<i>Aeromonas</i> spp.'de lipaz üretimi.....	26

3. BÖLÜM

MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1. Örneklerin toplanması	28
3.2. Lipolitik bakterilerin izolasyonu	28
3.3. Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kalitatif tayini	28
3.4. Lipolitik izolatların inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.....	29
3.5. Lipolitik izolatların Gram boyanma özelliğinin belirlenmesi.....	29
3.6. Lipolitik izolatların büyüme eğrilerinin belirlenmesi	29
3.7. Lipolitik izolatların koloni oluşturan birim sayısının hesaplanması	29
3.8. Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kantitatif tayini.....	30
3.9. Protein miktarının belirlenmesi.....	31
3.10. İzolatların tanımlanması.....	32
3.11. Fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu	33
3.11.1 İnkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.....	33
3.11.2 İnkübasyon süresinin belirlenmesi	33
3.11.3 Lipaz üretim besiyerinin belirlenmesi.....	33
3.11.3.1 Yağ kaynağının belirlenmesi.....	34
3.11.3.2 Yağ miktarının belirlenmesi.....	34
3.11.3.3. Azot kaynağının belirlenmesi	34
3.11.3.4. İnorganik azot kaynağının belirlenmesi	35
3.11.3.5 Besiyeri pH'sının belirlenmesi.....	35
3.12. Lipazın kısmi saflaştırılması	36
3.12.1 Santrifüj.....	36
3.12.2 Diyaliz.....	36
3.12.3 Ultrafiltrasyon	36

3.13.	Enzimin optimizasyonu ve karakterizasyonu.....	37	
3.13.1	Sıcaklığın lipaz aktivitesine etkisi.....	37	
3.13.2	pH'nın lipaz aktivitesine etkisi.....	37	
3.13.3	Tampon konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi.....	37	
3.13.4	Substrat konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi.....	37	
3.14.	Lipit miktarı tayini	38	
3.15.	İstatistiksel veri	38	
4. BÖLÜM			
BULGULAR.....			39
4.1.	İzolatların eldesi	39	
4.2.	Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kalitatif tayini.....	40	
4.3.	Lipolitik izolatların Gram boyanma özelliği.....	42	
4.4.	Lipolitik izolatların büyüme eğrileri.	42	
4.5.	Lipolitik izolatların koloni oluşturan birim sayıları	43	
4.6.	Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kantitatif tayini.....	44	
4.7.	İzolatların tanımlanması.....	45	
4.8.	Fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu	47	
4.8.1	İnkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.....	47	
4.8.2	İnkübasyon süresinin belirlenmesi	47	
4.8.3	Lipaz üretim besiyerinin belirlenmesi.....	48	
4.8.3.1.	Yağ kaynağının belirlenmesi.....	48	
4.8.3.2.	Yağ miktarının belirlenmesi.....	49	
4.8.3.3.	Azot kaynağının belirlenmesi	50	
4.8.3.4.	İnorganik azot kaynağının belirlenmesi	51	
4.8.3.5.	Besiyeri pH'sının belirlenmesi.....	52	

4.9.	Lipazın kısmi saflaştırılması	53	
4.10.	Enzimin optimizasyonu ve karakterizasyonu.....	54	
4.10.1	Sıcaklığın lipaz aktivitesine etkisi.....	54	
4.10.2	pH'nın lipaz aktivitesine etkisi.....	55	
4.10.3	Tampon konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi.....	55	
4.10.4	Substrat konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi.....	56	
4.11.	Lipit miktarı tayini	57	
5. BÖLÜM			
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....			59
KAYNAKLAR			72
ÖZGEÇMİŞ			89

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Lipaz üreten mikroorganizmalar	8
Tablo 2.2. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları	17
Tablo 2.3. Ticari olarak üretilen mikrobiyal lipazlar.....	18
Tablo 4.1. İzolatların kodları ve alındıkları yerler.....	39
Tablo 4.2. İzolatların tribütrin agardaki lipolitik aktiviteleri.....	41
Tablo 4.3. İzolatların cfu/ml değerleri.....	43
Tablo 4.4. BLAST sonuçlarına göre izolatların türleri.....	46
Tablo 4.5. Farklı saflaştırma basamaklarındaki lipazın toplam ve spesifik aktivitesi... 54	54
Tablo 4.6. Farklı sıcaklıklarda lipazın toplam ve spesifik aktivitesi	54
Tablo 4.7. Farklı tampon pH'sında lipazın toplam ve spesifik aktivitesi.....	55
Tablo 4.8. Farklı tampon konsantrasyonlarında lipazın toplam ve spesifik aktivitesi ..	56
Tablo 4.9. Farklı substrat konsantrasyonunda lipazın toplam ve spesifik aktivitesi	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Lipazın enzimatik reaksiyonu	4
Şekil 2.2.	İnsan pankreas lipazının üç boyutlu yapısı	5
Şekil 2.3.	Spesifik olmayan lipaz reaksiyonu, 1,3-spesifik lipaz reaksiyonu	6
Şekil 2.4.	Lipaz katalizli transesterifikasyon reaksiyonu	22
Şekil 2.5.	pNPP'nin lipaz katalizli hidroliz reaksiyonu	24
Şekil 3.1.	pNP standart eğrisi	30
Şekil 3.2.	BSA standart eğrisi	32
Şekil 4.1.	EK-2 izolatının büyüme eğrisi	42
Şekil 4.2.	EK-55 izolatının büyüme eğrisi	43
Şekil 4.3.	Seçilen izolatların pNPP testindeki lipaz aktiviteleri	45
Şekil 4.4.	Enzim aktivitesi ve kültürün inkübasyon sıcaklığı arasındaki ilişki	47
Şekil 4.5.	Enzim aktivitesi ve kültürün inkübasyon süresi arasındaki ilişki	48
Şekil 4.6.	Yağ kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi	49
Şekil 4.7.	Yağ oranının lipaz aktivitesine etkisi	50
Şekil 4.8.	Azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi	51
Şekil 4.9.	İnorganik azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi	52
Şekil 4.10.	Besiyeri pH'sının lipaz aktivitesine etkisi	53
Şekil 4.11.	EK-2 izolatındaki lipit miktarı	58

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. <i>Aeromonas caviae</i> CSB04'ün taramalı elektron mikroskobu fotoğrafı.....	26
Resim 4.1. EK-1 izolatının tribütrin agardaki şeffaf zon görüntüsü	40
Resim 4.2. EK-41 izolatının gram boyaması	42
Resim 4.3. pNP'nin farklı derişimlerdeki solüsyonları.....	44
Resim 4.4. EK-55 (a) ve EK-33 (b) izolatlarının pNPP testindeki renk değişimi.....	44
Resim 4.5. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .	45
Resim 4.6. Farklı yağ kaynağı içeren besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü	49
Resim 4.7. Hindistancevizi yağın farklı oranlarda içeren besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü	50
Resim 4.8. Farklı azot kaynağı içeren besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü	51
Resim 4.9. Farklı inorganik kaynağı içeren besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü.....	52
Resim 4.10. Farklı pH'daki besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü.....	53
Resim 4.11. EK-2 izolatının spv testindeki renk değişimi.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Atm	Atmosfer basıncı
BSA	Sığır serum albümini
cfu	Koloni oluşturan birim
DNA	Deoksiribonükleik asit
kDa	Kilodalton
L	Litre
ml	Mililitre
mg	Miligram
M	Molar
mM	Milimolar
OD	Optik yoğunluk
pNP	<i>p</i> -nitrofenil
pNPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitat
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
spv	Sülfo fosfo vanilin
U	Ünite
μ	Mikro
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
α	Alfa
β	Beta
%	Yüzde
°C	Santigrat derece

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Lipazlar (EC.3.1.1.3. triaçilgliserol açilhidrolaz) sulu ortamda triaçilgliseritlerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolizini, susuz ortamda ise bunun tam tersi olan transesterifikasyon ve ester sentezini katalizleyen bir enzim grubudur [1]. Lipazlar, substrat özgüllüğü, regiyoselektiflik (bölgesel seçicilik) ve kiral seçicilik gibi bazı benzersiz özelliklere sahiptirler. Lipazların bir kısmı ise serbest yağ asitlerinin endüstriyel üretimi, faydalı esterlerin ve peptitlerin sentezi için önemlidir [2]. Bu potansiyellerinden dolayı lipazlar yenilenebilir yakıtlar dâhil birçok endüstri tarafından ilgi çekici bulunmuşlardır. Lipazların bazı önemli endüstriyel uygulamaları arasında gıda endüstrisinde pastane ürünleri ve içkilerin raf ömrünün uzatılması, mandıra endüstrisinde süt, peynir ve tereyağının tadının iyileştirilmesi, süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaştırılması, tereyağının lipolizi gibi çalışmalar yer alır [3]. Bunun yanı sıra lipazlar deri endüstrisinde deri ürünlerindeki yağın hidrolizinde kullanılırken, deterjan endüstrisinde kumaşlardaki yağın temizlenmesi için çamaşır tozlarına katkı maddesi olarak eklenmektedirler [4]. Buna ek olarak lipazlar kozmetik endüstrisinde çeşitli ürünlerin üretiminde, farmasötik endüstrisinde ise rasemik karışımların eldesinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca lipazlar biyodizel sentezi gibi alanlarda çeşitli ürünlerin üretimi için katalizör olarak kullanılmaktadırlar [2].

Lipazlar bakteri, maya, mantar, bitki ve hayvanlar gibi çok çeşitli kaynaklardan izole edilebildikleri halde bunların arasında bakteriyel lipazlar yüksek verimle elde edilmeleri, mikroorganizmaların hızlı büyümesi ve genetik manipülasyon kolaylığı açısından ticari olarak oldukça önemlidirler [5]. Potansiyel endüstriyel uygulamaları ve kararlılıkları dolayısıyla günümüzde bakteriyel lipazlara çok büyük bir ilgi vardır. *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* spp. gibi çeşitli bakteri ve mantarlar endüstriyel uygulamalar için lipaz üretimi ve saflaştırmasında rutin olarak kullanılmaktadırlar [6]. *Bacillus subtilis* lipazı LipA, *Bacillus thermocatenulatus* lipazı BTL2, *Geobacillus stearothermophilus* lipazı T6, *Staphylococcus* sp. lipazı Lp12, *Pseudomonas cepacia* lipazı PS, *Candida antarctica* lipazı B (CalB), *Aspergillus awamori* BTMFW032 lipazı gelişmiş özelliklere sahip

mikrobiyal lipazlara 6rnektir [7,8].

Lipaz 6reten mikroorganizmalar, s6t atıkları, end6striyel atıklar, yağlı tohumlar, 66r6yen yiyecekler veya yağ ile kirlenmiş toprak, g6bre yığınları ve sıcak su kaynakları gibi 6eşitli habitatlarda bulunmuştur [9]. 6zg6ll6k, stabilite, pH ve sıcaklık gibi yeni ve spesifik 6zelliklere sahip biyokataliz6rlere olan talep g6n ge6tik6e artmaktadır. Lipaz 6reten mikroplar doğada yaygın olarak dağıldıklarından, biyoteknolojik olarak 6ne 6ıkan 6zelliklere sahip lipaz 6reten mikropları izole etmek i6in doğal yaşam alanlarının araştırılmasına ihtiya6 duyulmaktadır [10].

Bu 6alışmanın amacı Nevşehir ili 6evresindeki ekstrem koşullardan izole edilen mikroorganizmaların lipaz 6retimi bakımından araştırılıp y6ksek lipolitik aktivite g6sterenlerin se6ilerek tanımlanması, se6ilen izolatlardan maksimum lipaz 6retimini sağlanması i6in fermantasyon koşullarının optimize edilmesi, lipazın p6rifikasyon ve karakterizasyonunun yapılmasıdır. Ayrıca 6alışmada se6ilen izolatın lipit i6eriğinin belirlenmesi de ama6lanmıştır. B6ylece hem y6ksek lipit i6eriğine hem de y6ksek lipaz 6retim potansiyeline sahip olan izolatın biyodizel 6retiminde kullanılması s6z konusu olacaktır.

2. BÖLÜM

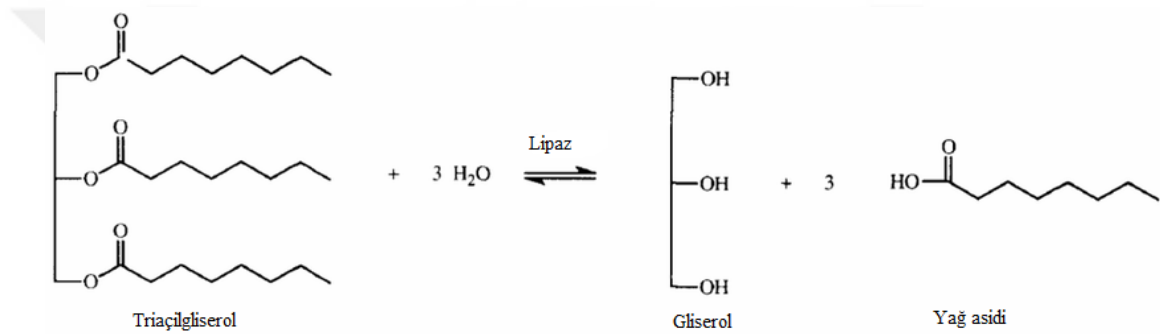
2.1. Lipazlar

Enzimler bütün organizmalarda bulunan doğal katalizörlerdir. Enzim aracılı reaksiyonlar yüksek özgüllük derecesi, ılımlı reaksiyonu koşulları, yan reaksiyonların azalması, daha ucuz ve pratik olması gibi sebeplerle kimyasal süreçlere tercih edilmektedirler. Kemoselektiflik, regiyoselektiflik, ılımlı koşullarda çalışabilme yetenekleri doğal ürünlerin sentezinde ve modifikasyonunda enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır [11]. Enzimler çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadırlar. Endüstriyel uygulamalar sürekli bir değişim içinde olduğundan daha iyi özelliklere sahip, yeni enzimler hep talep görmektedir. Bu talebi karşılamak adına enzim üretimi bir endüstriye dönüşmüştür [12].

Lipazlar en önemli endüstriyel enzim gruplarından bir tanesidir ve pazar değerlerine göre proteazlardan ve karbonhidratlardan sonra üçüncü en büyük enzim grubunu oluştururlar. Son yıllarda dikkat çeken biyotransformasyon ve biyoteknoloji araçları olarak görülen lipazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanımının artması lipazların enzim endüstrisindeki öneminin artmasını sağlamıştır. Böylece saflaştırılmış ve karakterize edilmiş olan bakteri lipazlarının sayısı günden güne artmıştır [11]. Birçok mikroorganizma lipaz üreticisi olarak tanımlansa da, mantarlardan *Rhizopus* sp., *Candida* sp. ve *Rhizomucor* sp., bakterilerden ise *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. ve *Chromobacterium* sp. ticari lipaz üretimi için kullanılan en yaygın kaynaklardandır [8].

Lipazların endüstriyel alanda önemli biyokatalizörler olmasının başlıca sebepleri arasında mükemmel kemoselektivite, regiyoselektivite ve stereoselektivite göstermeleri, organik çözücülerde stabil olmaları, mikroorganizmalar kullanılarak yüksek miktarda ve kolayca üretilebilmeleri, bir çok lipazın kristal yapılarının biliniyor olması, kofaktöre ihtiyaç duymamaları ve yan reaksiyonları katalizlememeleri yer almaktadır [13]. Bu özellikleri sayesinde lipazlar her zaman enzim endüstrisinin dikkat çeken unsurları arasında yer almıştır ve gıda, ilaç, deterjan, biyosensör, biyodizel, kozmetik, organik kimya ve zirai kimya gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda geniş kullanım alanı bulmaktadır [14].

Lipazlar ilk olarak Claude Bernard tarafından 1856 yılında keşfedilmiştir [15]. 1901 yılında ise mikrobiyolog Christiaan Eijkmann birçok bakterinin lipaz üretilip ve salgılayabileceğini bildirmiştir [16]. Esterazların alt grubunda yer alan lipazlar enzim sınıflandırmasına göre E.C.3.1.1.3 grubunda bulunmaktadır ve triaçilgliserol ester hidrolazların bir üyesidir. Lipazlar sulu ortamda uzun-zincirli triaçilgliseritlerin di-açil gliserol, mono-açil gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalizlerler (Şekil 2.1.). Susuz ya da çok az su bulunan ortamlarda ise hidrolizin tersi olan transesterifikasyon reaksiyonunu katalizlerler. Lipazlar ayrıca esterifikasyon, interesterifikasyon, asidoliz, alkoliz ve aminoliz reaksiyonlarını da katalizleyebilirler [2].

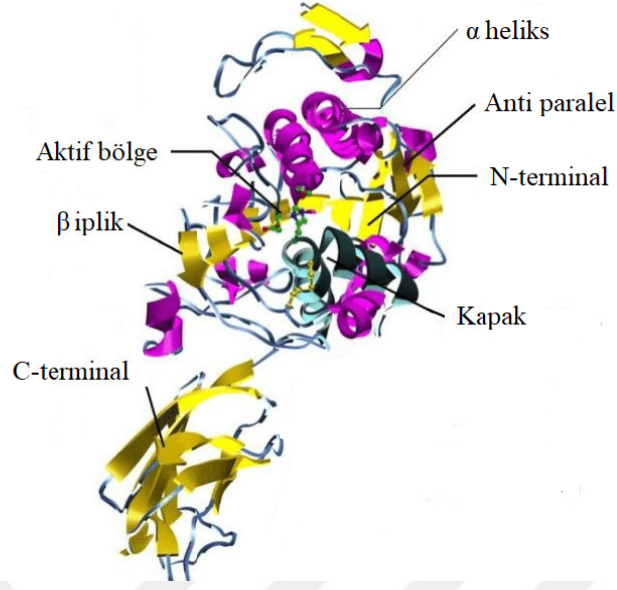


Şekil 2.1. Lipazın enzimatik reaksiyonu (triaçilgliserol substratının sentezi veya hidrolizi) [17]

Genel olarak lipazlar 20-75 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahiptirler. Çoğu lipaz 4-9 pH aralığında optimum aktiviteye sahiptir. Lipazların büyük bir kısmı 25-70 °C arasındaki sıcaklıklarda çalışabilirken ve optimum çalışma sıcaklıkları genellikle 40-50 °C arasındadır. Ayrıca ısıya oldukça dayanıklıdır ve bazı termofilik mikroorganizmaların ürettiği lipazların, daha yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite gösterdiği de bilinmektedir [18,19].

2.2. Lipazların yapısı

Doğada genetik olarak birbirinden farklı lipaz enzimleri bulunur ve bunlar farklı protein katlanmaları sergilerler. Buna karşın üç boyutlu yapısı açığa çıkarılan çoğu lipazın α heliks ve β ipliklerden oluşan α/β hidrolaz protein katlanması üzerine inşa edildiği görülmüştür. Lipaz çekirdeği, altı adede kadar α sarmal (A – F) ile bağlanan sekiz farklı β iplik ($\beta 1 - \beta 8$) içeren merkezi bir β tabakadan oluşur (Şekil 2.2.) [20].



Şekil 2.2. İnsan pankreas lipazının üç boyutlu yapısı [21]

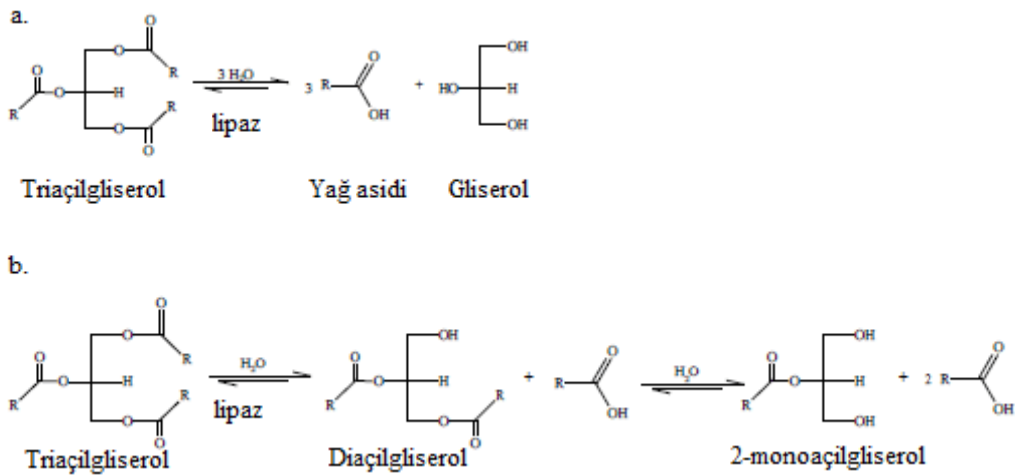
Lipazın üç boyutlu yapısı üç alandan oluşur. Bu alanlar substratın yüzeyini ayırmaya yarayan "temas bölgesi", substrat molekülünün ekstraksiyonundan ve fonksiyonel alanla ilişkisinden sorumlu olan "hidrofobik bölge" ve üçlü katalitik aminoasitleri içeren "aktif bölge" olarak isimlendirilir [20]. Lipazların aktif bölgesi serin nükleofili, bir asit kalıntısı (aspartik asit veya glutamik asit) ve bir histidin içerir ve kimotripsin benzeri bir hidroliz mekanizması kullanır. Çoğu lipaz dizisi Gly-Xxx-Ser-Xxx-Gly veya Ala-Xxx-Ser-Xxx-Gly korunmuş bölgesini içerir. Nükleofilik Ser rezidüsü, bu korunmuş pentapeptit içinde iplik 5'in C-terminal ucunda yer alır ve 'nükleofilik dirsek' olarak adlandırılan karakteristik bir β – dönüş α motifi oluşturur [22]. Substrat hidrolizi, katalitik bölgedeki Ser oksijeninin nükleofilik saldırısı ile başlar ve bir 'oksianyon deliği' oluşur. Oksianyon deliği, lipaz aktif bölgesinin bir başka önemli bileşenidir, çünkü kataliz sırasında reaksiyonun ara maddesi olarak oluşan oksijen iyonunun negatif yükünü stabilize eder. Geçiş halinin stabilize edilmesi, reaksiyon için gerekli aktivasyon enerjisini düşürür ve böylece katalizi teşvik eder. Bu yüzden oksianyon deliği lipazın katalitik aktivitesinde önemli rol oynar [23].

Lipazların üç boyutlu konformasyonları ve ortamda su bulunup bulunmaması, katalitik aktivitelerini ve stabiliteelerini etkiler [19]. Birçok lipaz enzimi aktif bölgelerinde bir veya iki α heliksten oluşan kapak benzeri bir yapı içerir ve bu bölge lipazın aktivitesini

belirler. Sabit olmayan bu kapak bölgesinin açılıp kapanması sayesinde lipaz aktif ya da inaktif forma geçebilir. Hidrofobik ortamlarda lipaz konformasyonel bir değişime uğrayarak kapak açılır ve aktif bölgeden uzaklaşır. Serbest kalan aktif bölge substrat ile etkileşime girerek lipaz aktif forma geçer [24].

2.3. Lipazların sınıflandırılması

Substrat seçiciliğine göre lipazlar 1,3-spesifik lipazlar, yağ asidine spesifik lipazlar ve spesifik olmayan lipazlar olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. 1,3-spesifik lipazlar, trigliseridlerin hem sn-1 hem de sn-3 numaralı pozisyonundaki ester bağlarının hidrolizini katalizlemektedirler (Şekil 2.3.). Bu lipaz grubuna insan pankreatik lipazı, *Aspergillus niger*, *Rhizomucor delemar*, *Rhizomucor miehei* ve *Mucor javanicus* lipazları verilebilir [25, 26].



Şekil 2.3. (a) Spesifik olmayan lipaz reaksiyonu, (b) 1,3-spesifik lipaz reaksiyonu [27]

Yağ asidine spesifik lipazlar, cis-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun zincirli yağ asitlerin esterlerini hidrolize ederler. Yağ asidine spesifik lipazların en yaygın örneği oleik aside spesifisite gösteren *Geotrichum candidum* lipazıdır. Spesifik olmayan lipazlar ise yağ asidinin pozisyonundan bağımsız olarak yağ asitleri ile gliserid arasındaki bağların hidrolizi katalizlemektedirler (Şekil 2.3.). Bu lipazların örnekleri *Candida rugosa*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* lipazlarıdır [25, 26].

2.4. Lipaz kaynakları

Lipazların çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaları, lipaz kaynaklarına olan ilgiyi de tazelemiştir. Lipaz kaynakları arasında hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve mikroorganizmalar yer almasına rağmen, endüstriyel uygulamalarda daha çok maya ve bakterilerden elde edilen lipazlar kullanılmaktadır [28]. Bu duruma mikrobiyal lipazların, katalitik aktivitelerin çeşitliliği, nötr veya alkali pH değerlerinde daha yüksek aktivite göstermeleri, yüksek verimi, genetik manipülasyon kolaylığı, hızlı büyümeleri, kolay üretilmeleri, kültür koşullarının ucuzluğu ve mevsimsel değişimlerden etkilenmemeleri düzenli olarak tedarik edilebilmeleri gibi avantajlar taşımaları neden olmaktadır [2].

2.4.1 Mikrobiyal lipazlar

Mikrobiyal lipazlar denince psikrotrofik bakteriler, mayalar ve küf mantarlarından elde edilen lipazlar akla gelmektedir. Lipaz üreten başlıca mikroorganizmalar Tablo 2.1’de verilmiştir.

2.4.1.1 Bakteriyel lipazlar

Bakteriyel lipazlar ilk olarak 1901 yılında *Serratia marescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında keşfedilmiştir. Bu tarihten itibaren başka bakteri türleri tarafından üretilen birçok yeni mikrobiyal lipaz keşfedilmiştir [29]. Lipaz üreten başlıca gram (-) bakterilere *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., koliformlar ve *Serratia marescens* örnek olarak verilebilir. Lipaz üreten başlıca gram (+) bakterilere ise *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp. ve *S. carnosus* örnek olarak verilebilir [30].

2.4.1.2. Fungal lipazlar

Lipaz üreten funguslara *Mucor lipolyticum*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* örnek olarak verilebilir [30].

2.4.1.3 Maya lipazları

Lipaz üreten mayalara *C. antarctica*, *C. curvata*, *C. cylindracea*, *C. deformans*, *C. foliorum*, *C. lipolytica*, *C. mogii*, *C. paralipolytica*, *C. quilliermondii*, *C. tropicalis*, *C.*

tsukubaensis, *C. utilis*, *H. anomala*, *M. lipolytica*, *P. acaciae*, *R. pilimona*, *R. rubra*, *S. carlsbergensis*, *S. cerevisiae*, *S. lipolytica*, *S. vini*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *T. apicola*, *T. candida*, *T. ernobii* ve *Y. lipolytica* örnek olarak verilebilir [30].

Tablo 2.1. Lipaz üreten mikroorganizmalar [30]

Bakteriler		
Gram [-] Bakteriler	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Alcaligenes</i> sp. <i>Aeromonas</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp.	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. putida</i> <i>Serratia marescens</i>
Gram [+] Bakteriler	<i>Micrococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp.	<i>B. stearothermophilus</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>
Funguslar		<i>Mucor lipolyticum</i> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Humiloca lanuginosa</i> <i>Aspergillus niger</i>
Mayalar	<i>Candida</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Saccharomyces</i> sp. <i>Saccharomycopsis</i> sp. <i>Torulopsis</i> sp.	<i>C. antarctica</i> , <i>C. auriculariae</i> , <i>C. curvata</i> , <i>C. cylindracea</i> , <i>C. deformans</i> , <i>C. foliorum</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. mogii</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. paralipolytica</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. tsukubaensis</i> , <i>C. quillermondii</i> <i>Hansenula anomala</i> <i>Mycotorula lipolytica</i> <i>Pichia acaciae</i> <i>R. pilimona</i> , <i>R. rubra</i> <i>S. carlsbergensis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. lipolytica</i> , <i>S. vini</i> <i>Saccharomycopsis lipolytica</i> <i>T. apicola</i> , <i>T. candida</i> , <i>T. ernobii</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>

2.5. Lipazların hücredeki lokasyonu

Bakteriyel lipazlar hücre içi, membrana bağlı veya hücre dışı olabilir. Hücre dışı lipazlar, kültür ortamından geri kazanılır ve daha sonra saflaştırılırken, hücre içi lipazlar ise hücre içinde veya hücre duvarında kalır [31]. *B. clausii* yalnızca hücre içi lipaz üreten bir tür olarak rapor edilmiştir. Sadece hücre içi lipaz üreten izolatlar gliserol ve basit lipidler içeren ortamlarda gelişebilirken, uzun zincirli trigliseritler üzerinde gelişmezler [32]. Ertuğrul ve çalışma arkadaşları 2007 yılında, *Bacillus sp.* içerisinde hem hücre içi hem de hücre dışı lipaz üretimini rapor etmişlerdir [33]. Boekema ve arkadaşları 2007 yılında, membrana bağlı şaperonlar tarafından birikmiş hücre içi lipazın salgılanmasının bir sonucu olarak hücre dışı lipaz üretimini gözlemlemişlerdir [34].

Bakteriler tarafından üretilen lipolitik enzimlerin hücre dışına transferi belli yollar aracılığıyla olmaktadır. Gram-pozitif bakterilerde, salgılanan enzimler tek bir sitoplazmik membranı geçerler. Gram-pozitif bakterilerin bir kısmı içerdikleri bir sinyal sayesinde Sek (genel protein sekresyonu)-bağımlı yol ile yer değiştirirler. Gram negatif bakteriler ise hem iç hem de bir dış membrana sahip oldukları için dış ortama salgılanacak proteinlerin bu iki membranı da geçmesi gerekmektedir. Gram-negatif bakterilerde salgılanacak olan enzimler de Sek (genel protein sekresyonu)-bağımlı yol ile iç zardan geçebilirler. Ayrıca hem gram negatif hem de bazı gram pozitif bakteriler tarafından kullanılan diğer bir yol ise bu yolu kullanan proteinlerin, sinyal dizilerinde ikiz arjinin translokasyon motifi içermeleri sebebiyle Tat (Twin-Arginin Translocation) olarak adlandırılan yoldur. Sec ve Tat sekresyon yolları hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde proteinlerin iç zar boyunca yer değiştirmelerine aracılık etmektedirler [35].

Gram negatif bakterilerde lipazın dış ortama salgılanmasında Tip I (ABC transporter) ve tip II sekresyon aracılı yollar ve ‘kendinden salgılanan‘ enzimler olmak üzere iki farklı tipte salgı sistemi bulunmaktadır. Tip I Salgılama Sistemi’nde (T1SS), üç protein alt biriminden oluşan bir yapı kullanılarak lipaz dış ortama taşınır. Bu yapı bir iç zar ATPaz’ı, iç ve dış zar arasında köprü görevi gören bir membran füzyon proteini ve bir dış zar proteininden oluşmaktadır. Tip II Salgılama Sistemi (T2SS) ise, Sek ve Tat

sekresyon yolaklarına dayanmaktadır. Katlanmamış durumdaki bakteriyel lipazlar, sekresyon yolakları aracılığıyla katlanmanın gerçekleşeceği periplazmik boşluğa salgılanır. Burada lipaz-spesifik foldaz denilen şaperon yardımı ile katlanan lipazlar daha sonra bir taşıyıcı kompleks tarafından dış ortama taşınmaktadır [36, 37].

2.6. Mikrobiyal lipaz üretimine etki eden parametreler

Bakteriyel lipazlar çoğunlukla hücre dışıdır ve beslenme ile ilgili ve çeşitli fizyokimyasal faktörlerden büyük ölçüde etkilenirler. Lipaz üretimine etki eden parametrelerin çalışılması ve optimum kültür ortamının oluşturulması ile maksimum düzeyde lipaz üretimi sağlanabilir. Bu parametreler arasında karbon ve azot kaynakları, aktivatörler, stimulatörler ve inhibitörler, yüzey-etki ajanları, inkübasyon süresi ve sıcaklığı ve besiyeri pH'sı koşulları yer alır [38].

2.6.1. Karbon kaynağı

Karbon kaynağı, lipaz üretim medyasının ana bileşeni olduğu gibi lipaz üretiminin bir indükleyicisi olarak da kullanılabilir. Lipazların üretimi için kültür ortamlarında glikoz, sukroz, fruktoz, maltoz ve polisakkaritler gibi geleneksel karbon kaynakları kullanılır [39]. Geleneksel karbon kaynaklarının yanı sıra, yağlar, yağ asitleri, metil esterler, aralar, safra tuzları ve gliserol gibi hidrofobik substratların varlığı genellikle lipaz üretimini artırır [40, 41, 42].

Chaudhry Haider Ali ve arkadaşları 2015 yılında *Exiguobacterium* sp. lipazı için lipaz üretim ortamına zeytinyağı, fıstık yağı, kolza yağı, mısır yağı, ayçiçeği yağı ve badem yağı gibi farklı yağları ekledikleri çalışmada, zeytinyağının lipaz üretimini arttırdığını rapor etmişlerdir [43].

Rathi ve arkadaşlarının *Burkholderia cepacia* lipazı ile 2001 yılında yaptıkları çalışmada 16 farklı ticari yağın lipaz üretimine etkisini araştırmış ve daha yüksek lipaz aktivitesi sırasıyla hurma yağı, ardından hindistan cevizi yağı ve hardal yağı varlığında gözlenmiştir [44].

Pogaku ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada ise glikoz, sakaroz, maltoz, laktoz, nişasta gibi karbon kaynakları arasında *Staphylococcus* sp. LP12'den lipaz

üretimini arttıran optimum karbon kaynağının nişasta olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada sentetik ve doğal lipit karbon kaynaklarının da lipaz üretimine etkisi araştırılmış ve *Staphylococcus* sp. LP12 lipazı üretiminin uzun karbon zincirli doğal yağlarda (hindistancevizi yağı, öğütülmüş fındık yağı ve zeytinyağı) daha fazla olduğu bulunmuştur [45].

2.6.2. Azot kaynağı

Lipaz üreten organizmanın büyümesini ve sonuç olarak fermantasyon işlemini düzenlemek için lipaz üretim medyasında bir azot kaynağının bulunması gerekmektedir [46,47]. Bakteriyel hücre büyümesi için maya ekstraktı, pepton, tripton ve sığır eti ekstraktı gibi organik azot kaynakları önemlidir [48].

Lipaz üretimi için besiyerinde azot kaynağı olarak pepton ve maya ekstraktı kullanılan türlere örnek olarak çeşitli *Bacillus* spp (ör. *B. alcalophilus*, *B. licheniformis* H1), çeşitli psödomonadlar (örn. *Pseudomonas* sp., *P. fragi*, *P. fluorescens* BW 96CC) ve *Staphylococcus haemolyticus* verilebilir [49-54].

Oh ve çalışma arkadaşları, tarafından 1999 yılında gerçekleştirilen çalışmada *S. haemolyticus* L62'nin lipaz üretim besiyerinde tripton ve maya ekstraktı birlikte kullanılmıştır [53].

Chaudhry Haider Ali ve arkadaşları 2015 yılında *Exiguobacterium* sp. lipazı için lipaz üretim ortamına maya ekstraktı, pepton, tripton, jelatin ve sığır eti ekstraktı gibi farklı organik azot kaynakları ekledikleri çalışmada, lipaz üretimini en çok maya ekstraktının arttırdığını rapor edilmiştir [43].

Pogaku ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada ise sığır ekstraktı, maya ekstraktı, proteoz pepton, tripton gibi azot kaynakları arasında *Staphylococcus* sp. LP12'den lipaz üretimini arttıran optimum organik azot kaynağının pepton olduğu bulunmuştur [45].

Besiyerinde amonyum sülfat, amonyum klorür, potasyum nitrat ve diamonyum hidrojen fosfat gibi inorganik azot kaynaklarının bulunması bazı durumlarda lipaz üretimini arttırmaktadır.

Chaudhry Haider Ali ve arkadaşları 2015 yılında *Exiguobacterium* sp. lipazı için lipaz üretim ortamına amonyum sülfat, amonyum klorür, üre, amonyum fosfat ve potasyum nitrat gibi farklı inorganik azot kaynakları ekledikleri çalışmada, amonyum sülfat haricindeki kaynakların lipaz üretimini azalttığını rapor etmişlerdir [43].

Rathi ve arkadaşlarının *Burkholderia cepacia* lipazı ile 2001 yılında yaptıkları çalışmada test edilen çeşitli inorganik ve organik azot kaynakları arasında daha yüksek spesifik aktivite di-amonyum hidrojen ortofosfat ve potasyum nitrat varlığında gözlenmiştir [44].

Pogaku ve arkadaşları ise 2010 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada *Staphylococcus* sp. LP12'den lipaz üretimini arttıran optimum tuzun potasyum nitrat olduğunu rapor etmişlerdir [45].

Kamaladevi ve arkadaşlarının 2014 yılındaki çalışmasında amonyum sülfat, amonyum karbonat, jelatin, tripton ve potasyum nitrat gibi azot kaynakları arasında *Aeromonas veronii* tarafından lipaz üretimini en çok arttıranın jelatin olduğu belirtilmiştir [55].

2.6.3. İnkübasyon süresi ve sıcaklığı

İnkübasyon süresinin enzim üretimi ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. İnkübasyon sıcaklığı bakterinin gelişimini etkileyen önemli faktörlerdendir. Genellikle bakterinin optimum üreme sıcaklığı aynı zamanda bakterinin en çok lipaz ürettiği sıcaklıktır.

Chaudhry Haider Ali ve çalışma arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada *Exiguobacterium* sp. BBX7 izolatından maksimum lipaz üretimi için en uygun süre 48 saat olarak bildirilmiştir [43].

Rathi ve çalışma arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada inkübasyon periyodunun *B. cepacia* tarafından lipaz üretimine etkisi araştırılmış ve çalışılan farklı inkübasyon periyotlarından (12, 24, 36, 48, 60 ve 72 sa.) 24 saatin enzim üretimi için optimum inkübasyon süresi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca enzim üretiminin logaritmik fazda başladığı ve durağan fazda zirveye ulaştığı görülmüştür. Aynı çalışmada 25-55 °C arasında değişen sıcaklıkların lipaz üretimi üzerindeki etkileri incelendiğinde ise, 50

°C'nin hem büyüme hem de enzim üretimi için optimum sıcaklık olduğu gözlenmiştir [44].

Pogaku ve arkadaşları 2010 yılında *Staphylococcus* sp. LP12'nin inkübasyon sıcaklığını 25-65 °C arasında değişen sıcaklıklara ayarlayarak, lipaz üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisini inceledikleri çalışmada LP12 izolatının maksimum lipaz ürettiği sıcaklığı 45 °C olarak rapor etmiştir [45].

2.6.4. Besiyeri pH'sı

Besiyerinin başlangıç pH'sı bakteri üremesini ve dolayısıyla lipaz üretimini etkilemektedir. Genellikle bakteri üremesi için optimum pH değeri lipaz üretimi için de idealdir.

Chaudhry Haider Ali ve çalışma arkadaşları tarafından besiyeri pH'sının lipaz üretimine etkisi *Exiguobacterium* sp BBX7 izolatını farklı başlangıç pH değerlerindeki (5-9) besiyerinde inkübe ederek araştırılmıştır ve elde edilen bulgulara göre BBX7 izolatının lipaz üretimi için nötral pH'yı tercih ettiği bildirilmiştir [43].

Rathi ve çalışma arkadaşları 2001 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada besiyeri pH'sının *B. cepacia* tarafından lipaz üretimine olan etkisini incelemek için farklı tamponlar (pH 3-6 için sitrat-fosfat tamponları, pH 7 için sodyum-fosfat tamponu, pH 8-9 için Tris-HCl tamponu, pH 10 için glisin-NaOH, pH 11 için fosfat-NaOH tamponu ve pH 12 için KCl-KOH tamponu) kullanarak, üretim ortamının pH'sını pH 3-12 arasına ayarlamış ve lipaz üretimi için optimum pH'nın 7 olduğunu bildirmişlerdir [44].

Pogaku ve arkadaşlarının 2010 yılında *Staphylococcus* sp LP12 ile yaptıkları çalışmada söz konusu izolat için maksimum lipaz üretiminin gerçekleştiği pH değeri pH 8 olarak belirtilmiştir [45].

2.6.5 Yüzey-aktif maddeler

Sümfaktan varlığı, maksimum lipaz üretimi için önemli ön koşullardan biridir [43].

Chaudhry Haider Ali ve arkadaşları 2015 yılında *Exiguobacterium* sp lipazı için lipaz

üretim ortamına SDS, Tween 20, Tween 80, ve Triton X-100 ise gibi farklı yüzey aktif maddelerini ekledikleri çalışmada, sırasıyla Tween 80 ve Tween 20'in lipaz üretimini arttırdığını, SDS ve Triton X-100'ün ise lipaz üretimini azalttığını tespit etmişlerdir [43].

Pogaku ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada besiyerine eklenen çeşitli yüzey-aktif maddelerinin lipaz üretimine etkisi incelenmiştir ve *Staphylococcus* sp LP12 lipazı üretiminin Tween 80 varlığında arttığı, Tween 20 ve Triton X varlığında ise azaldığı belirtilmiştir [45].

2.7. Lipaz aktivitesine etki eden faktörler

2.7.1. Sıcaklık

Bir reaksiyonun hızı, sıcaklıktaki her 10 °C'lik artışla yaklaşık iki katına çıkar ve enzimin yüksek sıcaklıklarda kararlı olması reaksiyonun verimliliğini büyük oranda artırılabilir. Bu yüzden lipazların termal kararlı olması istenen bir özelliktir [56].

Lipazlar esas olarak mezofilik ve termofilik mikroorganizmalardan elde edilir ve sırasıyla 35-50 °C ve 60-80 °C'de optimum aktiviteye sahiptir [57]. Çoğu mezofilik lipaz 70 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kararsız olmasına rağmen termo kararlı lipazlar organik çözücüler ve deterjanların varlığında 100 °C'ye kadar aktivite gösterirler [58]. Örneğin, hipertermofilik arke *Pyrobaculum caldifonti* ve *Pyrococcus furiosus* ve aşırı termofilik bakteriler *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* ve *Caldanaerobacter subterraneus*'den elde edilen termostabil lipazlar 90 °C'de aktivite gösterebilirler [59-61].

2.7.2. pH

Moleküller arası elektrostatik bir protein ve substratının arasındaki ilişkiyi etkileyen faktörlerin başında gelir. Bir enzimin moleküler yüzeyi üzerindeki elektrostatik potansiyellerin dağılımı, pH'ın işlevlerinden biridir ve belli dereceye kadar o enzimin pH aktivite profilini belirler [62]. Enzim-substrat ilişkisini etkileyen bir başka faktör de enzimin aktif bölgesindeki kalıntıların varlığı ve dağılımıdır. Enzimin düzgün bir şekilde çalışabilmesi için bu kalıntıların uygun pH'ta ve uygun iyonik durumda olması

gerekmektedir. Substratların çoğunun ayrı iyonik özellikleri olduğu için enzimin optimum aktivite gösterebilmesi için substratın özel iyonik türlerine ihtiyaç duyulabilir [63].

Enzimin reaksiyon hızının pH'dan büyük ölçüde etkilendiği durumlarda, iyonize edilebilir kalıntıların aktif bölgede olduğu düşünülür. pH'a karşı duyarlılık genellikle katalizde yer alan kalıntıların iyonlaşma durumundaki bir değişikliği veya substrata bağlamayı yansıtır [64].

Genel olarak, lipazlar alkali veya nötr optimum pH'a sahiptir ve pH 4-11 arasında stabilite gösterirler. Lipazların büyük çoğunluğu organik çözücülerde stabildir [20]. Neelambari ve arkadaşları 2011 yılında *Aeromonas hydrophila* lipazının pH 5-11 arasında aktivitesini korurken, pH 7,5-9,5 değerlerinde artan stabilite gösterdiğini belirlemişlerdir [65]. Charoenpanich ve arkadaşları 2011 yılında *Aeromonas* sp. EBB-1 lipazının pH 6-8 değerlerinde 6 saat inkübasyondan sonra aktivitesinin %80'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [66]. Sethi ve arkadaşları 2016 yılında *A. terreus*'tan elde edilen lipazın karakterizasyonunda, ilgili lipazın pH 6-9 değerlerinde kararlı olduğunu göstermiştir [67].

2.7.3. Zaman

Sethi ve arkadaşları 2016 yılında inkübasyon periyodunun (enzim-substrat reaksiyon süresi) lipaz üzerindeki etkisini, substrat ve enzimin 37 °C'de farklı süreler boyunca (10-90 dk) inkübe edilmesiyle araştırmışlardır. Maksimum aktivitenin 30 dk inkübasyondan sonra elde edildiğini ve bu süreden sonra lipaz aktivitesinde düşüş olduğunu belirtmişlerdir [67].

2.7.4. Substrat

Enzim üretiminin ekonomik değeri, optimum üretim için kullanılan substrat ile yakından ilişkilidir. Çeşitli substratların lipaz üretimi üzerinde faydalı etkileri bilinmektedir [55].

Kamaladevi ve arkadaşlarının 2014 yılında tuz sahasından izole edilen *Aeromonas veronii* ile yaptıkları çalışmada, susam yağı, hindistan cevizi yağı, neem yağı, ayçiçeği

yağı, dizel ve sıvı parafin gibi farklı substratların enzim aktivitesine etkisini incelemiş ve en yüksek aktiviteyi neem yağı varlığında gözlemlemişlerdir [55].

Charoenpanich ve arkadaşları 2011 yılında saflaştırılmış *Aeromonas* sp. EBB-1 lipazının, farklı karbon zinciri uzunluğundaki *p*-nitrofenil (pNP) esterlerine (pNP-asetat (C2), bütirat (C4), kaprilat (C8), kaprat (C10), laurat (C12), miristat (C14), palmitat (C16) ve stearat (C18) olan ilgisini araştırırken, ilgili lipazın en yüksek aktiviteyi *p*-nitrofenil palmitat (pNPP) substratı ile gösterdiğini bulmuştur [66].

Lee ve çalışma arkadaşları 2003 yılında *Aeromonas* sp. LPB 4 lipazının substrat olarak pNP-propiyonat ve pNP-kaprat kullanıldığında daha yüksek aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir [68].

2.7.5. Çeşitli maddelerin varlığı

Çeşitli yüzey aktif maddelerin varlığı lipazın katalitik aktivitesini etkilemektedir. Lipazların katalitik aktivitesi için substratın emülsiyon içinde bulunması önem taşır. Lipazlar “arayüzey aktivasyonu” süreci dahil olmak üzere çok karmaşık katalitik etki mekanizmaları sunarlar. Aktif bölgeye erişim, mobil kapağın açık ya da kapalı konumda olmasıyla düzenlenir ve enzimin aktif veya inaktif olması sağlanır [69]. Su ile kapağın hidrofobik yüzü arasındaki olumsuz etkileşimi engelleyen emülgatörler bulunmaktadır ve her bir lipaz reaksiyonu için uygun emülsiyon yapının belirlenmesi oldukça önemlidir [70].

Rathi ve arkadaşları 2001 yılındaki çalışmalarında *B. cepacia* tarafından üretilen enzimin karakterizasyonu için Triton X-100, Tween 20, Tween 80, SDS, saponin, sodyum kolat, sodyum taurokolat gibi çeşitli yüzey aktif maddelerin varlığında enzim örneğini inkübe ederek bu maddelerin enzim aktivitesine etkisini test etmişlerdir ve enzimin hem iyonik hem de iyonik olmayan yüzey aktif maddelerde stabil olduğunu tespit etmişlerdir [44].

2.8. Lipazların endüstrideki kullanımı ve biyoteknolojik önemi

Lipazların yüksek özgülük dereceleri, organik çözücülerde kullanılabilimleri ve termostabiliteyi deterjan endüstrisi, gıda endüstrisi, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi,

sulu ortamlarda organik sentez ve biyo-dönüşüm oleo kimya endüstrisi gibi bir çok endüstriyel alanda kullanılmalarına olanak sağlamıştır [42]. Lipazların başlıca uygulamaları Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2: Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları [71]

Endüstri	Görevi	Ürün ya da uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Yağ lekelerinin kumaşlardan çıkarılması
Süt Ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynir olgunlaşması, Tereyağı yağının modifikasyonu	Süt, peynir ve tereyağındaki tatlandırıcı maddelerin geliştirilmesi
Fırın ürünleri	Lezzet iyileştirme	Raf ömrü uzaması
İçkiler	Geliştirilmiş aroma	İçkiler
Yemek sosu	Kalite iyileştirme	Mayonez, soslar,
Sağlıklı yiyecekler	Transesterifikasyon	Sağlıklı yiyecekler
Et ve balık	Lezzet geliştirme	Et ve balık ürünleri; yağ giderme
Yağ	Transesterifikasyon, hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol, mono- ve digliseritler
Kimyasallar	Enantioselektiflik, sentez	Kiral yapı taşları, kimyasallar
Farmasötik	Transesterifikasyon, hidroliz	Özel lipitler, sindirim yardımcıları
Kozmetik	Sentez	Emülgatörler, nemlendiriciler
Deri	Hidroliz	Deri ürünler
Kağıt	Hidroliz	Gelişmiş kaliteye sahip kağıt
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması

Küresel enzim pazarının mevcut piyasasında lipazlar, proteazlar ve amilazların ardından

üçüncü sırada yer almaktadırlar. 2020 yılında ise lipaz enziminin yıllık pazarının 590,5 milyon dolara ulaşması ön görülmektedir [72]. Birçok mikrobiyal lipaz, Amano Enzyme Inc (Japonya), Biocatalysts (İngiltere), Novozyme (Danimarka), Genencor (ABD) ve Unilever (Hollanda) gibi dünya çapındaki enzim üreticileri tarafından ticarileştirilmiştir [73]. Ticari olarak üretilen mikrobiyal lipazlar Tablo 3’de gösterilmiştir [13]. Mevcut lipaz piyasası az sayıda üretici tarafından yönetilmekte ve bu lipazların endüstriyel uygulamaları çoğunlukla deterjan endüstrisi, tatlandırıcılar, süt ürünleri, kimyasallar, kağıt hamuru ve kağıt, deri ve biyoyakıt alanlarındadır. [74].

Tablo 2.3: Ticari olarak üretilen mikrobiyal lipazlar [13]

Kökeni	Organizma	Biyoteknolojik kullanım	Üretici
Mantar	<i>Candida rugosa</i>	Organik Sentez	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica A/B</i>	Organik Sentez	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Deterjan katkısı	Novo Nordisk, Boehringer Mannheim
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Gıda	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bakteri	<i>Burkholderia cepacia</i>	Organik Sentez	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Organik Sentez	Asahi, Biocatalysts

2.8.1. Deterjanlar ve temizlik maddeleri

Yağları hidrolize edebilmelerinden dolayı, lipazlar deterjan ve temizlik maddeleri endüstrisinde önemli oranda kullanılırlar. Deterjan üretiminde kullanılacak lipazların stabil olmaları, düşük substrat özgülüğü, nispeten sert yıkama koşullarına

dayanabilmeleri ve alkali pH'da (pH 8-11) çalışabilmeleri gibi özelliklere sahip olması beklenmektedir. Protein mühendisliği ile bu özelliklere sahip olan lipazlar toz ve sıvı deterjanlar için uygun yıkama koşulları ile uyumlu hale gelir ve deterjan endüstrisinde kullanılabilir [75]. Novo Nordisk (Danimarka) tarafından ilk ticari lipaz Lipolase™ 1994 yılında üretilmiş ve deterjan üretimindeki artan lipaz ihtiyacını karşılamak amacıyla kullanılmıştır [13].

2.8.2. Gıda

Yağlar gıdaların önemli bileşenleri arasında yer alır. Bir trigliseritin beslenme değeri yağ asidinin gliserol omurgasındaki yeri, yağ asidinin zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi gibi faktörlerden önemli ölçüde etkilenir. Lipazlar, gliseritteki yağ asidi zincirlerinin yerini değiştirerek ve bir veya daha fazla yağ asidini yenileriyle değiştirerek lipidlerin özelliklerini değiştirmemizi sağlar. Bu şekilde, nispeten ucuz ve daha az arzu edilen bir lipid daha değerli bir yağa dönüştürülebilir [76]. Değeri yüksek bir triaçilgliserol olan kakao yağı 1,3 pozisyonunda doymuş yağ asitleri (palmitik veya stearik asit) 2 pozisyonunda ise doymamış yağ asidi (oleik asit) içerir ve yaklaşık 37 °C'lik bir erime noktasına sahiptir. Kakao yağı, ağızda eridiğinde yarattığı ferahlama hissi nedeniyle çikolata ve şekerleme endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidroliz ve sentez reaksiyonları içeren lipaz tabanlı teknoloji daha az değerli yağlardan kakao yağı eşdeğeri elde edilmesine imkan sağlar. 1976 yılında Unilever, immobilize lipaz kullanılarak kakao yağı mükemmel üretilen hidroliz ve sentez reaksiyonlarından oluşan bir yöntem için patent almıştır, bu teknoloji günümüzde Quest-Loders Crockland, tarafından immobilize *R. miehei* lipazı kullanılarak uygulanmaktadır [77].

Lipazlar çeşitli içeceklerin lezzetini geliştirmek; peynirin olgunlaşmasını hızlandırmak, unlu mamüllerin raf ömrünü uzatmak, et ve balık ürünlerinden de yağların çıkarılması için kullanılmıştır. Ayrıca bira ve şarap yapımı; sütün işlenmesi; meyve, et ve sebzelerin işlenmesi; şeker ve şekerlemelerin işlenmesi ve fruktoz üretimi de gıda endüstrisinde lipazların yaygın olarak kullanıldığı alanlardandır [42].

2.8.3. Farmasötik

İlaçların çoğu kiraldır ve sadece belirli aktif stereoisomer istenen biyolojik aktiviteye

sahipken, diğerk stereoizomerler sağlığa zararlı yan etkiler gösterebilmektedir [78]. Lipazlar regioselektif oldukları için kiral moleküllerin enantiyomerleri arasında ayırım yapabilirler. Bu özelliklerinden dolayı lipazlar, farmasötik alanda kullanılan önemli biyokatalizörlerdendir. Farmasötik endüstrisinde lipazların kullanıldığı alanlardan bazıları enantiomerik bileşiklerin ve rasemik esterlerin üretimi, sentetik reaksiyonların katalizi, optik olarak aktif kiral bileşiklerin hazırlanması için kinetik rezolüsyon işlemidir. HIV'e karşı kullanılan homokiral bileşiklerin üretilmesi, alkaloidlerin, antibiyotiklerin, sindirim yardımcılarının, vitaminlerin, anti-tümör, antienflamatuar ve antitromboz ajanların sentezi lipazların bu alandaki uygulamalarındandır [13]. Lipazların sentezinde kullanıldığı bazı ilaçlar naproksen ve ibuprofen gibi kiral antienflamatuar ilaçlar, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri gibi antihipertansif maddeler (örn., kaptopril, enalapril, zofenopril ve lisinopril), diltiazem gibi kalsiyum kanallarını bloke eden ilaçlar olarak sıralanabilir [79-81].

2.8.4. Kozmetik

Lipaz kullanılarak aroma ve koku bileşiklerinin sentezi mümkündür. Parfümlerde ve diğerk kişisel bakım ürünlerinde kullanılan aroma maddelerinde alifatik ve aromatik asitlerin esterleri, terpen alkolleri, aldehidleri ve fenolleri içeren alkoller yaygın olarak bulunurlar [82]. Priya ve Çadha 2003 yılındaki çalışmalarında parfüm ve güneş kremlerinde kullanılan hidrosinnamik asit esterlerinin *P. cepacia* lipazı katalizli sentezini incelemişlerdir [83]. Ağız suları ve tıraş kremleri bir nane aroması ve bir soğuma hissi sağlamak için mentol içerir. Lipaz katalizli reaksiyonlarla (-) - mentolün transesterifikasyonu ile enantiyomerik olarak saf (-) - mentol esterleri elde edilebilir. Doğal mentolün tüketilebilir bir madde olduğu göz önüne alındığında, mentolün esterleştirme işlemi ile yapay olarak üretilmesi akla yatkın bir yoldur. Mentol esterleri ve benzer bileşikler üretmek için *P. fluorescens* ve *P. cepacia*'nın lipazlarının kullanıldığı bir yöntem Chaplin ve arkadaşları tarafından patentlenmiştir [84]. *P. cepacia* lipazı kullanılarak (-) - mentolden -mentil metakrilat 16'nın enantioselektif sentezi de rapor edilmiştir [85]. Elde edilen bu son ürün polimerize edilerek sürekli salımlı parfüm olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak elde edilebilen Lipaz P (Amano) kullanılarak (±)-metil-7-epicucurbate'den lipaz katalizli olarak bir başka parfüm bileşeni olan bitki büyüme faktörü (-) - metil jasmonat sentezlenmektedir [86].

2.8.5. Deri

Deri endüstrisinde deri işlenirken deri altındaki yağ ve kılların giderilmesi işlemi önem arz etmektedir. Çeşitli kimyasalların kullanımı, ısı uygulanması ya da enzim kullanımı gibi çeşitli şekillerde bu işlem yapılmaktadır. Organik çözücüler ve yüzey aktif maddeler gibi kimyasalların kullanıldığı geleneksel yöntemlerde zararlı son ürünlerin üretilmesi çevreye zarar verebilir. Deri işlemede lipaz veya proteaz gibi enzimlerin kullanımı daha çevre dostu bir yaklaşım olduğu için de tercih edilmektedir [2].

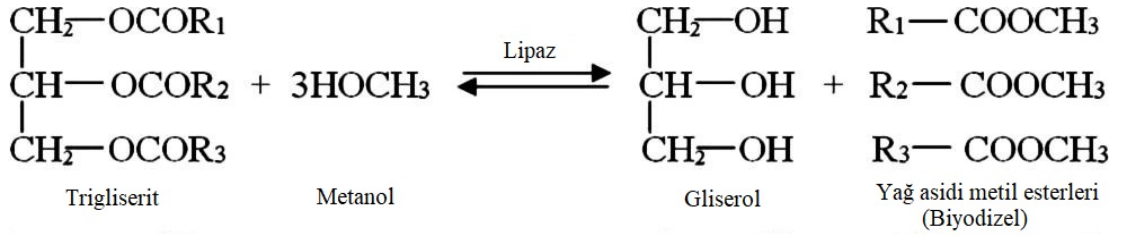
2.8.6. Kağıt

Lipazlar kağıt endüstrisinde kağıt hamuru ve kağıt imalatında kullanılır. Lipazların görevi reçineyi, kağıt yapımı için üretilen hamurdan çıkartmaktır. Reçine ya da ahşabın hidrofobik bileşenleri genellikle kağıt üretiminde sorunlara yol açar [23]. Nippon Paper Industries (Japonya) tarafından, *C. rugosa*'dan elde edilen fungal lipaz kullanılarak reçinedeki trigliseritlerin% 90'ının hidrolize edilebildiği bir yöntem geliştirilmiştir [13].

2.8.7. Biyodizel uygulamaları

Küresel ısınma ve fosil yakıtların tükenmesi gibi dünya çapındaki sorunların çözümü için alternatif enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroorganizmalar, bitkiler, mikroalgler ve hayvansal yağlar gibi çeşitli materyaller kullanarak biyodizel üretimi bu soruna önerilen etkili çözümlerden biridir [87]. Biyodizelin diğer enerji kaynaklarına kıyasla sahip olduğu avantajlar arasında petrol türevi olmaması ve daha az zehirli olması ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilmesi; biyolojik olarak parçalanabilir olması sayılabilir [88]. Dünya genelinde biyodizel kullanımının artması petrole olan bağımlılığın azalmasına ve petrolden kaynaklı sorunların önüne geçilmesine sebep olacaktır [89].

Biyodizel esas olarak, bitkisel, hayvansal, mikrobiyal veya atık yağların trigliseridlerinin kısa zincirli bir alkol (metanol veya etanol) ile bir katalizör varlığında transesterifikasyonu ile sentezlenir [90].



Şekil 2.4. Lipaz katalizli transesterifikasyon reaksiyonu [90]

Transesterifikasyon için kullanılan katalizörler asitler, bazlar, serbest veya immobilize enzimler olabilir. Alkali veya asit katalizörlerle kıyaslandığında enzimler tekrar kullanılabilir olmaları, daha az basamakta ve daha az enerji kullanarak biyodizel üretilmesine olanak sağlamaları, yan ürün olarak daha yüksek kalitede gliserol açığa çıkarması gibi özelliklerinden dolayı potansiyel olarak daha yararlıdır [91]. Bakteriler ve funguslardan elde edilen lipazlar, mikroorganizmalara özgü avantajlarından dolayı transesterifikasyon için diğer kaynaklardan elde edilen lipazlara göre daha yaygın olarak kullanılır. Biyodizel sentezi için en çok kullanılan bakteriyel lipaz *P. cepacia* lipazıdır [92].

2.8.8. Diğer uygulamalar

Lipazlar bilimsel araştırmalarda hidroliz, sentez, analiz reaksiyonları ve biyotransformasyonlar için araştırma araçları olarak kullanılır [42]. Ayrıca lipazlar atık suların arıtılması, yağ işleme fabrikalarının ve restoranların atıklarının temizlenmesi gibi çeşitli biyoremediasyon çalışmalarında da kullanılmaktadır [93].

2.9. Lipolitik aktivite tayin metotları

Enzimlerin endüstride etkin bir şekilde kullanılabilmesi için kritik adımlardan biri enzim preparatlarının enzimatik aktivitesinin belirlenmesidir. Bu yüzden lipaz aktivitesini ölçmek için uygun ve doğru yöntemler oluşturmak büyük öneme sahiptir. Uygun reaksiyonların ve substratların seçimi, aktivite analizi için çok önemlidir. Bu nedenle, temel prensipleri (kinetik veya son nokta), substrat seçiciliği, duyarlılık ve uygulanabilirliği açısından farklılık gösteren çok çeşitli lipaz analiz yöntemleri geliştirilmiştir [94].

Lipazın katalizör sistemleri sulu bazlı ortamlar ve organik ortamlar olmak üzere iki

kategoriye ayrılabilir. Yaygın olarak, lipaz suda iyi çözünebilir ve stabil olan bir enzimdir. Bununla birlikte lipaz substratları genellikle suda çözünmez. Bu nedenle, substratlar önce organik çözücüler içinde çözülmeli ve daha sonra tampon ile karıştırılmalıdır [95].

2.9.1. Kalitatif metotlar

Doğal uzun zincirli trigliseridlerle kıyaslandığında tributrin lipazlar için daha avantajlı bir substrattır. Bu avantajların başında çeşitli emülgatörlere ihtiyaç duymaksızın zeytinyağında homojen olarak dağılması gelmektedir. Ayrıca bilinen tüm lipazlar tributrini katalizleyebilirler. Tributrinin hidroliziyle oluşan ürünler suda çözünürdür ve geniş bir pH aralığında titre edilebilir. Bu gibi nedenlerle sentetik tributrin substratı, lipazların birçok çalışmada kullanılmaktadır [96]. Tributrinin kalitatif lipaz analizlerinde kullanılması tributrin substratının agara eklenmesiyle yapılmaktadır. Agar plakta mikroorganizma üremesi olan kısımlarda şeffaf zon oluşumu ilgili mikroorganizmanın lipaz üretimine işaret etmektedir [97].

Tween 80 de lipaz aktivitesinin kalitatif tayininde sıklıkla kullanılan substratlardandır. İlk yöntemde anlatılana benzer olarak, agar plakta şeffaf zon oluşumu lipolitik aktiviteyi işaret etmektedir [98].

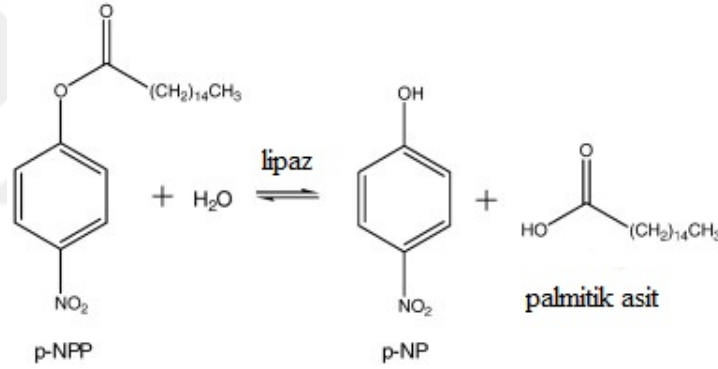
pH göstergeleri olan fenol kırmızısı, Victoria mavisi gibi kromojenik substratlar içeren plaklar da lipolitik aktivitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Lipoliz sonucunda serbest kalan yağ asitleri pH'ta düşüşe neden olur ve göstergenin renginde değişiklik olur [99].

Lipolitik aktivite tayininde yararlanılan bir diğer yöntemde ise Rodamin B agar kullanılmaktadır. Bu yöntemde Rodamin B agar içeren plaklarda oluşan floresan turuncu haleler lipolizi göstermektedir. Floresan ışımaya, Rodamin B'nin uzun zincirli bir yağ asit konjugatının oluşmasından kaynaklanmaktadır [100].

2.9.2. Kantitatif metotlar

Lipaz aktivite analiz yöntemlerinin çoğu, substrat olarak çeşitli zincir uzunluğundaki yağ asitlerinin pNP esterlerini (pNP-palmitat, pNP-laurat, pNP-kaprilat, pNP-asetat,

pNP-valerat vb.) kullanan hidrolitik analizlere dayanır [101]. Lipaz aktivitesinin kantitatif olarak tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerin başında Winkler ve Stuckmann tarafından belirlenen pNPP analizi gelmektedir [102]. Bu test protokolünün esası, pNPP'nin enzimatik hidroliziyle açığa çıkan pNP'nin 410 nm'de kolorimetrik tahminine dayanmaktadır. Bir birim enzim aktivitesi, dakikada 1 µmol nitrofenol serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanır. Winkler ve Stuckmann tarafından belirlenen orjinal yöntemde, 10 ml çözücü (izopropanol) içinde çözülmüş pNPP (30 mg) ve 90 ml fosfat tamponu (pH 7,0) içinde çözülmüş sodyum deoksikol ve arabik gam ile hazırlanan ve son pNPP konsantrasyonu 790 µm olan substrat solüsyonununun 2,4 ml'sine, 0,1 ml enzim solüsyonu eklenir ve reaksiyon istenen sıcaklıkta ve inkübasyon süresinde gerçekleştirilir. Açığa çıkan ürün miktarı (pNP), spektrofotometrik olarak tahmin edilir [102].



Şekil 2.5. pNPP'nin lipaz katalizli hidroliz reaksiyonu [103]

Bu yöntem hızlı ve basit olması gibi nedenlerle titrimetri gibi rutin olarak kullanılan diğer protokollerden daha avantajlıdır. Bununla birlikte, pNPP'nin substrat olarak kullanıldığı bu yöntemde çoğu zaman substratın sulu ortamda düşük çözünürlüğü bir sorun olmaktadır. Enzim reaksiyonunu takiben oluşan bulanıklığın pNPP'nin suda çözünmemesinden mi yoksa reaksiyon sonucunda açığa çıkan yağ asitlerinden mi kaynaklandığı tam olarak anlaşılmayabilir. Bu karışıklığa meydan vermemek için pNPP'nin suda çözünmemesinden kaynaklı bu bulanıklığı reaksiyon çözeltisinden çıkarmak gerekmektedir. Triton X-100 bu amaçla substrat solüsyonuna eklenen maddelerdendir. Triton X-100, pNPP'nin enzimatik hidrolizine bağlı olarak salınan yağ asitlerinin dispersiyonuna ve böylece şeffaf bir çözelti elde edilmesine neden olan bir

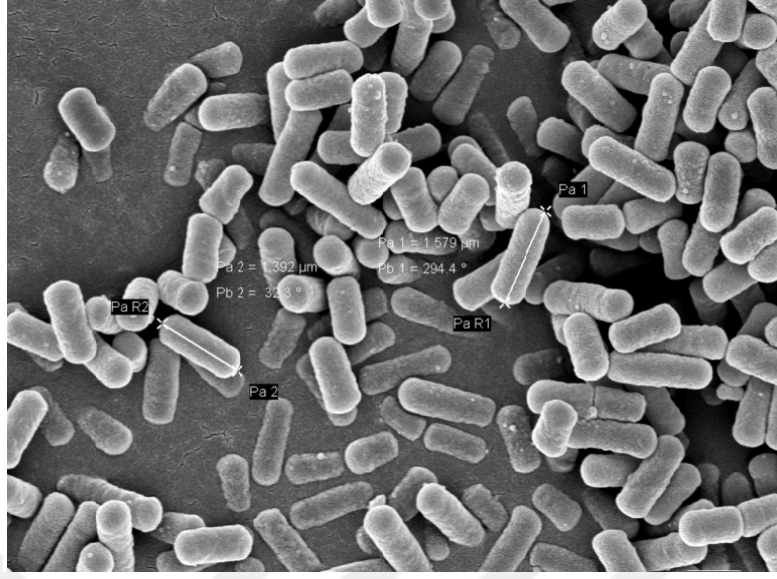
sümfaktandır. Ayrıca ortama bir yüzey aktif maddenin eklenmesi, reaksiyon karışımında bulunan organik ve sulu faz arasındaki yüzey gerilimini azaltır ve emülsifikasyon oranını arttırır [104].

2.10. Saflaştırma yöntemleri

Bakteriyel lipaz, üç ana tekniğı birleştiren fermantasyon süreçleri kullanılarak elde edilir: daldırmalı fermantasyon, katı hal fermantasyonu ve immobilize hücre fermantasyonu. Ancak, fermantasyon süreci sonucunda, arzu edilen bileşenlerin yanı sıra, arzu edilmeyen yan ürünler de üretilir. Bu yüzden fermante broth belli yöntemlerle saflaştırılmalıdır [105]. Ticari lipazlar genellikle hücre dışı olduğundan, saflaştırma işlemleri geniş olmakla birlikte kolaydır. Öncelikle mikrobiyal hücreleri uzaklaştırmak için kültür ortamı santrifüj ya da filtre edilir. Ham enzim kaynağı olarak kabul edilen hücre içermeyen süpernatant konsantre edilmek için ultrafiltrasyon, amonyum sülfat ile çöktürme gibi ön saflaştırma adımlarına tabi tutulur [106]. Bunu takiben çöktürme, jel filtrasyonu, afinite kromatografisi ve iyon değişimi kromatografisi gibi tekniklerin bir kombinasyonu ile lipazların saflaştırılması sağlanmaktadır [42, 107]. İmmünopürifikasyon ve membran teknolojisi gibi yöntemler de lipaz saflaştırılmasında kullanılan yeni stratejilerdendir [108].

2.11. *Aeromonas* spp.

Aeromonas spp. Aeromonadaceae familyasında yer alan fakültatif anaerobik, kemoorganotrofik, katalaz ve oksidaz pozitif, gram-negatif mikroorganizmalardır. Genelde çubuk şeklinde olup tek kutuplu flagellum taşırlar ve hareketlidirler. *Aeromonas* spp. Enterobacteriaceae ile birçok biyokimyasal özelliğı paylaşmasına rağmen, oksidaz testinde pozitif olmaları ile kolayca ayırt edilirler. Genel olarak, bu cinsin üyeleri karakteristik olarak üç biyokimyasal olarak farklılaştırılmış gruba (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* ve *Aeromonas sobria*) ayrılır ve bunlara son zamanlarda yeni türler eklenmiştir [109]. *Aeromonas caviae* CSB04'ün taramalı elektron mikroskobu (SEM) fotoğrafı Resim 2.1'de sunulmuştur [110].



Resim 2.1. *Aeromonas caviae* CSB04'ün taramalı elektron mikroskobu fotoğrafı [110]

Aeromonas spp. 22-35 °C arasındaki sıcaklıklarda büyürler, ancak birkaç türde büyüme 0-45 °C aralığındaki sıcaklıklarda olabilir [111]. Tüm *Aeromonas* spp. pH 4,5-9 arasında gelişebilir fakat optimum pH aralığı 5,5-9 arasındadır. *Aeromonas* spp. % 0-4 arasındaki sodyum klorür konsantrasyonunda optimum büyüme gösterirler [112].

Aeromonas spp. neredeyse tüm çevresel nişlerden izole edilebilecek, her yerde bulunan organizmalardır. Genellikle sucul ortamlarda bulunan bu mikroorganizmalar et, süt ve sebzeler gibi farklı gıda maddelerinden de izole edilebilirler [113]. *Aeromonas* cinsine ait bakterilerin bulunduğu sucul ortamlara yüzey suları, yeraltı suyu, klorlu içme suyu, klorsuz içme suyu, şişelenmiş maden suyu örnek verilebilir [114-116].

Aeromonas spp. oksidaz, katalaz, nitrat redüktaz, lipaz, proteaz, amilaz gibi çeşitli hücre dışı enzimler üretirler, bu enzimler aeromonadların ekolojileri, sağkalımı ve patojenitesinde rol oynamaktadırlar [117].

2.12. *Aeromonas* spp.'de lipaz üretimi

Aeromonas spp., konak hücrenin plazma zarının değiştirilmesinde rol oynayan ve bu sayede enfeksiyonun şiddetini artıran dört farklı hücre dışı lipaz (lip, lipH3, pla ve plc) salgırlar [118].

A. hydrophila lipazı Anguita ve arkadaşları tarafından, *A. sorbia* LP004 lipazı ise Lotrakul ve Dharmstithi tarafından rapor edilmiştir [119,120]. Neelambari ve arkadaşları 2011 yılında denizden izole edilen tuza tolerantlı *A. hydrophila* izolatının lipaz ürettiğini belirlemiş ve enzim üretimi için optimum koşulları araştırmışlardır [65]. Charoenpanich ve arkadaşları 2011 yılında *Aeromonas sp* EBB-1 lipazını rapor etmişlerdir [66]. Lee ve çalışma arkadaşları ise 2003 yılında *Aeromonas sp* LPB 4 lipazını saflaştırıp karakterizasyonunu yapmışlardır [68]. Kamaladevi ve çalışma arkadaşları tarafından 2014 yılında gerçekleştirilen çalışmada tuz sahasından izole edilen *A. veronii* lipazı rapor edilmiştir [55].



3. BÖLÜM

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin toplanması

Çalışmada kullanılan örnekler ekstrem çevre şartlarından elde edilmiştir. Toprak örnekleri Nevşehir ilçesi Gülşehir civarındaki patates fabrikası atık alanı, mandıra süt toplama alanı gibi yağ ile kontamine edilmiş topraklardan, su örnekleri ise Aksaray civarındaki (Aşağı Ziga, Narlıgöl, Koç Pınarı) kaynak sularından alınmıştır. Yağ ile kontamine toprak örnekleri toprak yüzeyinin 4-5 cm altından steril spatüller ile alınmış ve steril kaplara konulmuştur. Örnekler ilerleyen analizlerde kullanılmak üzere laboratuvara transfer edilmiştir.

3. 2. Lipolitik bakterilerin izolasyonu

Yağ ile kontamine toprak örnekleri seri dilüsyonla 10^{-1} den 10^{-8} e seyreltilmiş ve yayma ekim yöntemiyle tribütrin agar besiyeri içeren petrilere ekilmiştir. Tribütrin agar besiyeri 10 g/L agar-agar, 5 g/L pepton ve 3 g/L pepton içerecek şekilde hazırlanıp 121 °C'de 15 dk 1,5 atm basınç altında otoklavla sterilize edilir ve 60 °C'ye soğutulan besiyerine % 0,1 tribütrin ilave edilir. Tribütrin agar besiyeri içeren plaklara yayma ekim ile ekilen örnekler 37 °C'de 24-48 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24-48 saatlik inkübasyon süresi sonunda şeffaflık zonu gösteren 80 koloni saflaştırılmıştır. Bu izolatlara ait örnek kodları ve alındıkları bölgeler Tablo 4.1'de verilmiştir.

3. 3. Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kalitatif tayini

Lipaz aktivitesinin kalitatif tayininde tribütrin agar kullanılmıştır. İzolatların aktif kültürlerinin OD_{600} değerleri eşitlenmiş ve zon çaplarının belirlenmesi için, tribütrin agarda açılan zonlara her izolattan 100'er µl mikropipet ile ekilmiştir. Petri kapları 37 °C'de 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tribütrin agarda iyi ve orta çapta zon oluşturan 24 izolat kalitatif ve kantitatif lipaz analizlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen izolatlardan EK-1, EK-13 ve EK-41'in şeffaf zon fotoğrafları Resim 4.1'de verilmiştir. Ayrıca tüm izolatların tribütrin agarda

oluşturdukları şeffaf zon çapları Tablo 4.2’de verilmiştir. İzolatlar daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere gliserol stoklar içerisinde -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3. 4. Lipolitik izolatların inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

Seçilen izolatların üreme ve sıcaklık ilişkisi 25, 30 ve 37 °C olmak üzere seçilen 3 farklı sıcaklık için araştırılmıştır. 24. Saatteki OD₆₀₀ değerleri değerlendirilerek optimum inkübasyon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiş ve sonraki inkübasyonlar bu sıcaklıkta yapılmıştır.

3.5. Lipolitik izolatların Gram boyanma özelliğinin belirlenmesi

Gliserol stokdaki izolatlar 2 kere nutrient broth besiyerinde aktifleştirildikten sonra nutrient agar besiyeri içeren petrilere tek koloni ekimi ile ekilmiştir. Seçilen tek koloniler Gram boyama ile boyanıp örneklerin ışık mikroskopunda 100x immersiyon objektifinde incelemeleri sonucu Gram boyanma özelliği belirlenmiştir. EK-41 izolatının 100x objektifteki görüntüsü Resim 4.2.’de verilmiştir.

3.6. Lipolitik izolatların büyüme eğrilerinin belirlenmesi

Gliserol stoktan 2 kere aktifleştirilen örneklerin OD₆₀₀ değerleri 1’e eşitlenerek, nutrient broth besiyerine ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Her saat başında örneklerin OD₆₀₀’deki absorbansları ölçülerek büyüme eğrileri oluşturulmuştur. Böylece bütün izolatların büyüme fazları ile zaman ilişkisi belirlenmiştir. İzolatlardan EK-2 ve EK-55’in büyüme eğrilerine (Şekil 4.1 ve 4.2) sonuçlar kısmında yer verilmiştir.

3.7. Lipolitik izolatların koloni oluşturan birim sayısının hesaplanması

Gliserol stoktan 2 kere aktifleştirilen örneklerin OD₆₀₀ değerleri eşitlenerek, eşit OD₆₀₀ değerindeki (OD₆₀₀=1) örneklerden 10⁻¹ ve 10⁻⁸ aralığında seri dilüsyonlar yapılmıştır. Serum fizyolojikte seyreltilen örnekler nutrient agara yayma ekim ile ekilerek 30 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda plakta oluşan koloniler sayılarak elde edilen değerler aşağıdaki formüle yerleştirilerek ml’deki koloni oluşturan birim (cfu/ml) sayısı hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 4.3’te verilmiştir.

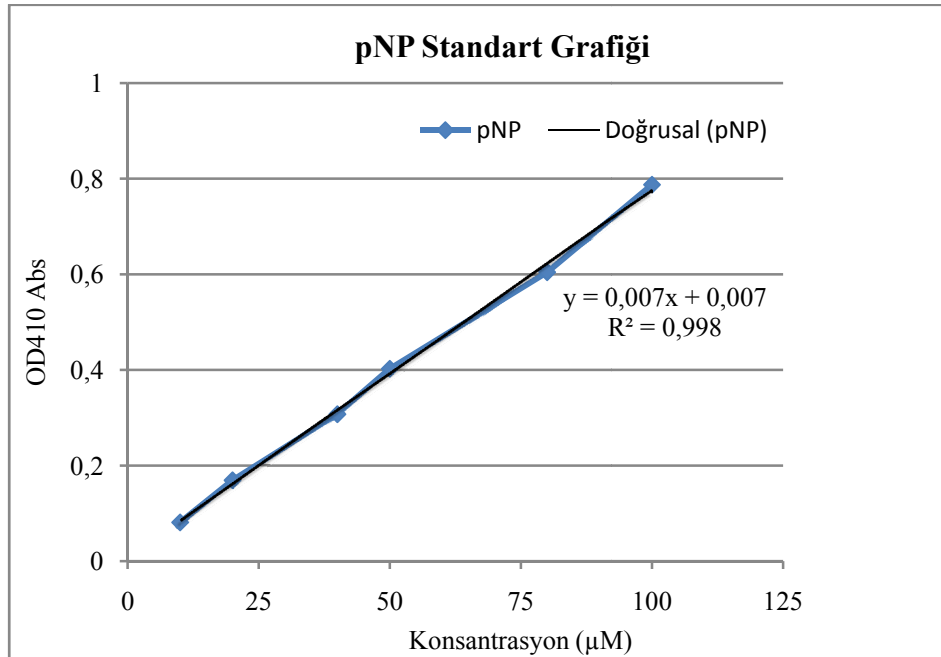
$$\frac{cfu}{ml} = \frac{C}{V * d (n1 + (0,1 * n2))} \quad (3.1)$$

Bu formüle göre; cfu/ml ml'deki mikroorganizma sayısını, C sayımı yapılan tüm petrilere koloni sayısını, V sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacmi (ml), n1 ilk seyreltiden yapılan sayımlarda sayılan petri kutusu adedini, n2 ikinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayılan petri kutusu adedini, d ise sayımın yapıldığı ardışık iki seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranını ifade etmektedir.

3.8. Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kantitatif tayini

Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kantitatif tayininde birkaç değişiklikle Winkler ve Stuckman tarafından belirlenen pNPP testinden yararlanılmıştır [102]. Bu metod pNPP'nin enzimatik hidrolizi sonucunda meydana gelen pNP'nin OD₄₁₀ nm'de kolorimetrik olarak tespitine dayanmaktadır.

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde pNP standart eğrisinden (Şekil 3.1) yararlanılmıştır. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen (100 µM) pNP'den seri dilüsyonlar hazırlanmış (Resim 4.3.) ve OD₄₁₀ nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Bu grafiğin denkleminde yararlanılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir.



Şekil 3.1. pNP standart eğrisi

pNPP testinde kullanılacak izolatlar gliserol stoklardan 2 kez aktifleştirilmiştir. Aktif izolatlar %3'lük ekimle (OD₆₀₀=0,8) nutrient broth besiyerinde 30 °C'de logaritmik fazın sonuna kadar inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür ortamı 5000 g'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membrandan geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat enzim aktivitesi tayini için ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. İlerleyen deneylerde ise enzim kaynağı olarak saflaştırma basamaklarından elde edilen örnekler kullanılmıştır.

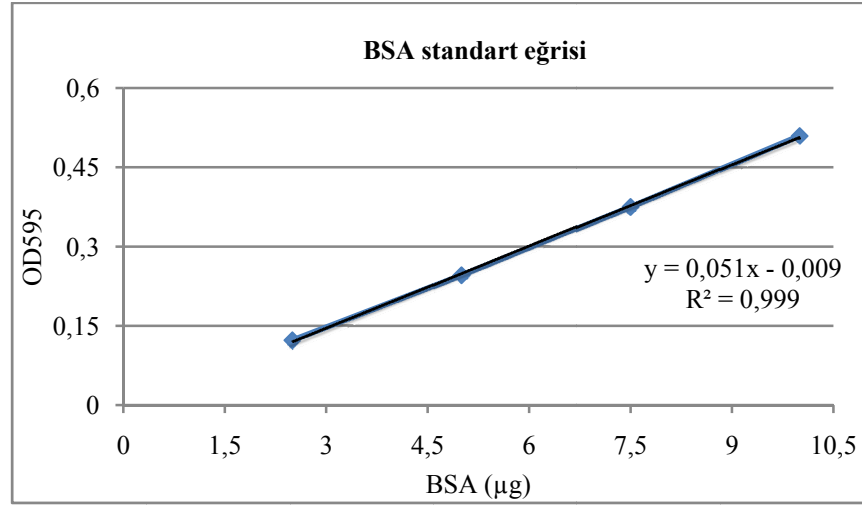
Lipaz testi için A ve B solüsyonu olarak adlandırılan iki farklı solüsyon hazırlanmıştır. A solüsyonu 27 mg pNPP/1 ml izopropanol içerirken, B solüsyonu 9 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8), % 0.11 arabic gum ve % 0,44 Triton X-100 içermektedir. Denemelerden önce A ve B solüsyonları karıştırılıp test solüsyonu elde edilmiştir. 100 µl süpernatant ve 900 µl test solüsyonu karıştırılıp 30 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. OD₄₁₀ nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri ve pNP standart eğrisi kullanılarak aşağıdaki formüle göre enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Enzim aktivite sonuçları Şekil 4.3'te, EK-33 ve EK-55 izolatlarının pNPP testinde inkübasyon sonrasındaki görüntüleri ise Resim 4.4'te gösterilmiştir. Deneylerde kör olarak inkübasyonda kullanılan besiyeri kullanılmıştır.

$$Aktivite = \frac{\Delta C \times VT \times SF}{T \times VE} \quad (3.2)$$

Bu formüle göre; aktivite enzim aktivitesini (U/ml dk), ΔC absorbans/eğimi, VE toplam enzim hacmini, T zamanı (dk), VT toplam reaksiyon hacmini, SF ise seyreltme faktörünü ifade etmektedir.

3.9. Protein miktarının belirlenmesi

Örneklerin içerdiği protein miktarının belirlenmesi için Bradford protein testi uygulanmıştır [121]. Derişimi bilinen bovin serum albuminden (BSA) seri dilüsyonlarla seyreltme yapılmış ve 595 nm'de absorbans değerleri ölçülerek BSA standart eğrisi (Şekil 3.2.) çizilmiştir. Testte pNPP testinde kullanılan örneklerin 100 µl'si kullanılmıştır ve toplam protein miktarı belirlenmiştir. İlerleyen deneylerde ise enzim kaynağı olarak saflaştırma basamaklarından elde edilen örnekler kullanılmıştır.



Şekil 3.2. BSA standart eğrisi

Bradford protein testi ile örneklerdeki protein miktarı belirlenmiştir. Bu veriler kullanılarak Spesifik Aktivite hesaplanmıştır. Deneylerde kör olarak inkübasyonda kullanılan besiyeri kullanılmıştır.

$$\text{Spesifik Aktivite} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Toplam Aktivite}}{\text{Toplam Protein}} \quad (3.3)$$

3.10. İzolatların tanımlanması

İzolatların tanımlanması 16S rRNA gen bölgesi dizisinin sekanslanması ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için enzim aktivitesi yüksek olan 6 izolat seçilmiştir. İzolatların genomik DNA izolasyonu GeneJet Genomic DNA kiti ile kit protokolüne göre yapılmıştır. Saflaştırılmış DNA Univ-1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') ve Univ-27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır [122]. PCR cihazında reaksiyon koşulları ön denatürasyon 95 °C'de 4 dk, 35 döngüden oluşan denatürasyon 95 °C'de 1 dk, bağlanma 59 °C'de 1 dk, uzama 72 °C'de 1,5 dk, ve son uzama 72 °C'de 10 dk olarak uygulanmıştır. Resim 4.5.'te PCR ürününün agaroz jel elektroforezi görüntüsü yer almaktadır. Çoğaltılan 16S rRNA bölgesinin sekans analizi hizmet alımı ile BM Labosis (BM Lab. Sist. Ltd. Şti.) tarafından yapılmıştır. 16S rRNA bölgesinin sekans sonuçları BLAST programı ile değerlendirilerek izolatların türleri *Aeromonas veronii* olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre çıkan ilk tür Tablo 4.4'te verilmiştir.

3.11. Fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu

Enzim aktivitesi en yüksek olan *A. veronii* EK-2 izolatu fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu için kullanılmıştır.

3.11.1. İnkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

Yatık agardan aktifleştirilen EK-2 izolatu %3'lük ekimle ($OD_{600}=0,8$) lipaz üretim besiyerine ekilmiş ve 30 ve 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür ortamı 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membrandan geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. Şekil 4.4.'te farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki enzim aktivite sonuçları verilmiştir. Enzim aktivitesi sonuçlarına göre sonraki deneylerde optimum inkübasyon sıcaklığı 30 °C olarak kullanılmıştır.

3.11.2. İnkübasyon süresinin belirlenmesi

Yatık agardan aktifleştirilen EK-2 izolatu %3'lük ekimle ($OD_{600}=0,8$) lipaz üretim besiyerine ekilmiş ve 30 °C'de farklı sürelerde (18, 24, 36, 48, 72 saat) inkübe edilmiştir. Bu sürelerin sonunda plak besiyerine seyreltmelerle yayma ekim yapılarak koloni oluşturan birim sayısı da belirlenmiştir. Elde edilen kültür ortamı 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membrandan geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. Şekil 4.5'te farklı inkübasyon sürelerindeki enzim aktivite sonuçları ve koloni oluşturan birim sayıları sunulmuştur. Enzim aktivitesi sonuçlarına göre sonraki deneylerde optimum inkübasyon süresi 18 saat olarak kullanılmıştır.

3.11.3. Lipaz üretim besiyerinin belirlenmesi

Lipaz üretim besiyeri olarak Ali ve arkadaşları tarafından belirlenen içeriği maya ekstraktı (% 0,2), KH_2PO_4 (% 0,1), K_2HPO_4 (% 0,1), $MgSO_4$ (% 0,05), $(NH_4)_2SO_4$ (% 0,5 w/v), NaCl (% 0,1) ve zeytinyağı (% 1) olan besiyeri kullanılmıştır [43]. Lipaz üretim besiyeri bileşenleri ve besiyeri pH'sı değiştirilerek, bileşenlerin EK-2 izolatından lipaz üretimine etkisi incelenmiştir. Bu sayede EK-2 izolatından maksimum verimle lipaz üretiminin gerçekleştiği optimum besiyeri bileşimi belirlenmiştir.

3.11.3.1. Yağ kaynağının belirlenmesi

7 farklı yağ kaynağı (zeytinyağı, ayçiçeği yağı, mısır yağı, fındık yağı, badem yağı, susam yağı, hindistancevizi yağı) %1 v/v oranında kullanılarak lipaz üretim besiyeri hazırlanmıştır. Yatık agardan aktifleştirilen EK-2 izolatu %3'lük ekimle ($OD_{600}=0,8$) farklı yağ kaynakları içeren her bir lipaz üretim besiyerine ekilmiş ve 30 °C'de çalkalamalı sistemde 18 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür ortamı 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membrandan geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. Farklı yağ kaynağı içeren besi ortamlarındaki enzim aktivite sonuçları Şekil 4.6'da, örneklerin görüntüsü ise Şekil 4.6'da verilmiştir. Enzim aktivitesi sonuçlarına göre sonraki deneylerde besiyerinde yağ çeşidi olarak hindistan cevizi yağı kullanılmıştır.

3.11.3.2 Yağ miktarının belirlenmesi

6 farklı yağ oranı (% 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3) kullanılarak farklı lipaz üretim besiyerleri hazırlanmıştır. Yatık agardan aktifleştirilen EK-2 izolatu %3'lük ekimle ($OD_{600}=0,8$) farklı yağ oranı içeren her bir lipaz üretim besiyerine ekilmiş ve 30 °C'de çalkalamalı sistemde 18 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür ortamı 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membrandan geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. Farklı oranlarda Hindistan cevizi yağı içeren besi ortamlarındaki enzim aktivite sonuçları Şekil 4.7.'de, örneklerin görüntüsü ise Resim 4.7.'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi sonuçlarına göre sonraki deneylerde hindistan cevizi yağı besiyerine %1 v/v oranında eklenerek kullanılmıştır.

3.11.3.3. Azot kaynağının belirlenmesi

4 farklı azot kaynağı (maya ekstraktı, et ekstraktı, pepton, jelatin) %0,2 w/v oranında kullanılarak farklı lipaz üretim besiyerleri hazırlanmıştır. Yatık agardan aktifleştirilen EK-2 izolatu %3'lük ekimle ($OD_{600}=0,8$) farklı azot kaynağı içeren her bir lipaz üretim besiyerine ekilmiş ve 30 °C'de çalkalamalı sistemde 18 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür ortamı 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membrandan geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. Farklı azot kaynağı içeren besi ortamlarındaki enzim aktivite sonuçları

Şekil 4.8.'de, örneklerin görüntüsü ise Resim 4.8.'de sunulmuştur. Enzim aktivitesi sonuçlarına göre sonraki deneylerde lipaz üretim besiyerinde azot kaynağı olarak jelatin kullanılmıştır.

3.11.3.4. İnorganik azot kaynağının belirlenmesi

8 farklı azot kaynağı (amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, amonyum nitrat $(\text{NH}_4)(\text{NO}_3)$, amonyum fosfat $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, amonyum karbonat $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, amonyum oksalat $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$, amonyum klorür NH_4Cl , potasyum nitrat KNO_3 , üre $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) % 0,5 w/v oranında kullanılarak farklı lipaz üretim besiyerleri hazırlanmıştır. Yatık agardan aktifleştirilen EK-2 izolatı %3'lük ekimle ($\text{OD}_{600}=0,8$) farklı inorganik azot kaynağı içeren her bir lipaz üretim besiyerine ekilmiş ve $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'de çalkalamalı sistemde 18 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür ortamı 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membrandan geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. Farklı inorganik azot kaynağı içeren besi ortamlarındaki enzim aktivite sonuçları Şekil 4.9'da, örneklerin görüntüsü ise Resim 4.9.'da verilmiştir. Enzim aktivitesi sonuçlarına göre sonraki deneylerde lipaz üretim besiyerinde inorganik azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullanılmıştır.

3.11.3.5. Besiyeri pH'sının belirlenmesi

Farklı pH değerlerinde (pH 4-10) lipaz üretim besiyerleri hazırlanmıştır. Yatık agardan aktifleştirilen EK-2 izolatı %3'lük ekimle ($\text{OD}_{600}=0,8$) farklı pH'taki lipaz üretim besiyerlerine ekilmiş ve $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'de çalkalamalı sistemde 18 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür ortamı 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membrandan geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır. Farklı pH değerine sahip besi ortamlarındaki enzim aktivite sonuçları Şekil 4.10.'da, örneklerin görüntüsü ise Resim 4.10.'da gösterilmiştir. Enzim aktivitesi sonuçlarına göre sonraki deneylerde pH'sı 7 olan lipaz üretim besiyeri kullanılmıştır.

Fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu sonuçlarına göre sonraki deneylerde lipaz üretim besiyeri içeriği jelatin (%0,2 w/v), KH_2PO_4 (%0,1), K_2HPO_4 (%0,1), MgSO_4 (%0,05), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%0,5), NaCl (%0,1), hindistan cevizi yağı (%1) ve pH'sı

7 olacak şekilde hazırlanmış ve bu besiyerinde örnekler 30 °C’de 18 saat boyunca inkübe edilmişlerdir.

3.12. Lipazın kısmi saflaştırılması

3.12.1 Santrifüj

Yatık agardan aktifleştirilen EK-2 izolatu %3’lük ekimle ($OD_{600}=0,8$) optimal lipaz üretim besiyerine ekilerek 30 °C’de 18 saat inkübe edilmiştir. Kültür ortamı 5000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek hücre pelletinin çöktürülmesi sağlanmıştır. Süpernatant 0,2 mm tek kullanımlık membrandan (Ministart, sartorius) geçirilerek filtre edilmiş ve filtrat lipazın kısmi saflaştırılması için kullanılmıştır. Ham filtratın protein miktarı Bradford Protein Testi ile hesaplanmıştır. Ayrıca ham filtratın enzimatik aktivitesi pNPP testi ile tayin edilmiş ve enzimatik aktivite sonuçları Tablo 4.5.’te verilmiştir.

3.12.2 Diyaliz

Örneklerin diyalizinde 10 kDa diyaliz kasedi ve Tris-HCl (pH:8 50 mM) tamponu kullanılmıştır. Diyaliz kasetleri kullanılmadan önce tampon ile muamele edilmiştir. Membran filtrat şırınga ile çekilerek diyaliz kasedine aktarılmıştır. Kasedin içindeki hava alınmıştır. Diyaliz kasedi içerisinde örneğin 200 katından fazla miktarda diyaliz tamponunun bulunduğu kaba yerleştirilmiş ve manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Diyaliz tamponu 3-4 saatte bir değiştirilmiş, bu aşama üç kez tekrarlanmış ve sonrasında örnek bir gece diyaliz tamponunda bırakılmıştır. Diyaliz işlemi sonunda diyalizatlar steril şırınga yardımıyla alınıp ultrafiltrasyon işlemine kullanılmıştır. Diyalizatın protein miktarı Bradford protein testi ile hesaplanmıştır. Ayrıca diyalizatın enzimatik aktivitesi pNPP testi ile tayin edilmiş ve enzimatik aktivite sonuçları Tablo 4.5.’te verilmiştir.

3.12.3 Ultrafiltrasyon

Örneklerin ultrafiltrasyonunda 10 kDa’luk santrifugal filtreler (Amicon Ultracel-10 K) kullanılmıştır. Diyalizat ultrafiltrasyon tüplerine aktarılmış ve 5000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ultrafiltrat toplanmış ve kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Ultrafiltratın protein miktarı Bradford Protein Testi ile

hesaplanmıştır. Ayrıca ultrafiltratın enzimatik aktivitesi pNPP testi ile tayin edilmiş ve enzimatik aktivite sonuçları Tablo 4.5.'te verilmiştir.

3.13. Enzimin optimizasyonu ve karakterizasyonu

Kısmi saflaştırılmış lipaz, enzimin karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Enzimin çalıştığı optimum sıcaklık, tampon pH'sı ve konsantrasyonu, ve substrat konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.13.1. Sıcaklığın lipaz aktivitesine etkisi

50 mM pH 8,0 Tris HCl tamponu kullanılarak pNPP lipaz testi farklı sıcaklıklarda (10-80 °C'de) gerçekleştirilmiş ve enzimin farklı sıcaklıklardaki aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz için optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu sıcaklık kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.

3.13.2. pH'nın lipaz aktivitesine etkisi

Reaksiyonda kullanılan 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi farklı pH'larda (pH 2-12) hazırlanarak pNPP lipaz testinde kullanılmış ve enzimin farklı pH'lardaki aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz için optimum tampon pH'sı 8 olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu tampon pH'sı kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7.'de sunulmuştur.

3.13.3. Tampon konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi

Reaksiyonda kullanılan pH 8,0 Tris-HCl tampon çözeltisi farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 mM) hazırlanarak pNPP lipaz testinde kullanılmış ve enzimin farklı tampon konsantrasyonlardaki aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz için optimum tampon konsantrasyonu 50 mM olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu tampon konsantrasyonu kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.8.'de verilmiştir.

3.13.4. Substrat konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi

Reaksiyonda kullanılan pNPP substrat çözeltisi (Solüsyon A) farklı konsantrasyonlarda (3,375, 6,75, 13,5, 27, 54, 108 mg/ml) hazırlanarak pNPP lipaz testinde kullanılmış ve enzimin farklı tampon konsantrasyonlardaki aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz için

optimum substrat konsantrasyonu 27 mg/ml olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu substrat konsantrasyonu kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.9.'da gösterilmiştir.

3.14. Lipit miktarı tayini

EK-2 izolatının lipit miktarını belirlemek için sulfo phospho vanillin (spv) testi kullanılmıştır [123]. Yatık agardan aktiveleştirilen EK-2 izolatı %3'lük ekimle ($OD_{600}=0,8$) azot kısıtlayıcı minimal besiyerinde (Na_2HPO_4 2,8 g/L, maya ekstraktı 0,01 g/L, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 0,05 g/L, amonyum ferrik sitrat 0,01 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02 g/L, glikoz 15 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L) 30 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür ortamından 1, 2, 4 ve 8 ml alınıp santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti 100 µl saf suda çözdürülmüş ve lipit miktarı tayini için kullanılmıştır. Bunun için çözünmüş hücreler steril cam tüplere aktarılmış ve 2 ml sülfürik asit (%95-98) ilave edildikten sonra 100 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonucunda tüpler buzda soğutulmuştur. Soğutulan tüplere 5 ml fosforik asit vanilin çözeltisi eklenerek (vanilin 0,012 g/L, etanol 0,2 ml/L, su 1,8 ml/L, fosforik asit 80 ml/L) tüpler 30 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde örneklerin 530 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometrede ölçülmüştür. Örneklerdeki lipit miktarı lipit standartlarından yararlanılarak oluşturulan lipit standart grafiği denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. EK-2 izolatındaki lipit miktarı Şekil 4.11.'de, örneklerin spv testindeki görüntüleri ise Resim 4.11.'de gösterilmiştir.

3.15. İstatistiksel veri

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21,0 programı kullanılarak analiz edilmiş ve analizler, uygun tanımlayıcı istatistiklerle sunulmuştur. Çalışmadaki bütün testler çift paralel çalışılmış ve ortalama sonuçlar verilmiştir.

4. BÖLÜM

BULGULAR

4.1. İzolatların eldesi

Çalışmada kullanılan örnekler ekstrem çevre şartlarından elde edilmiştir. Nevşehir ili çevresindeki toprak (Gülşehir patates fabrikası atık alanı, ve mandıra süt toplama alanı) ve su örneklerinden (Aşağı Ziga, Narlıgöl, Koç Pınarı'ndaki kaynak suları) elde edilen izolatlar kullanılmıştır. Elde edilen izolatlara verilen kodlar ve izolatların alındıkları yerler Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

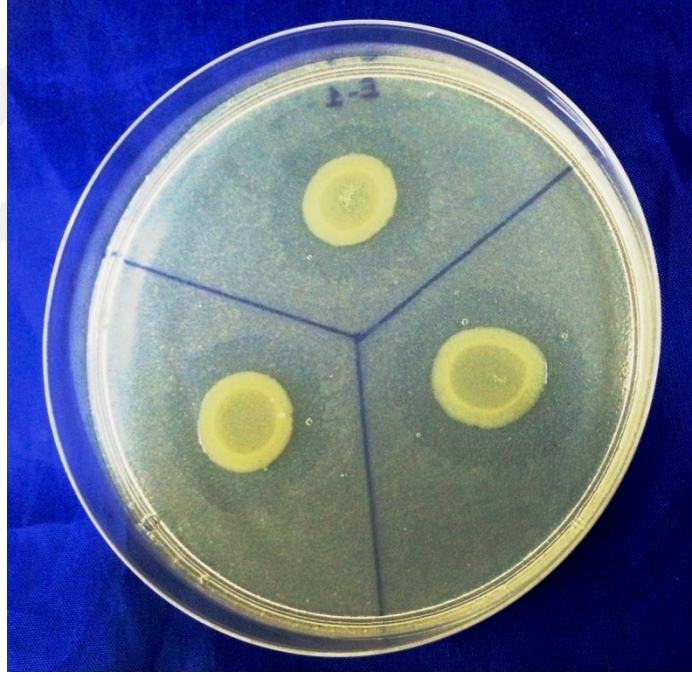
Tablo 4.1. İzolatların kodları ve alındıkları yerler

Örnek Kodu	Lokasyon	Örnek Kodu	Lokasyon	Örnek Kodu	Lokasyon	Örnek Kodu	Lokasyon
EK-1	Aşağı ziga	EK-21	Aşağı ziga	EK-41	Gülşehir	EK-61	Koç Pınarı
EK-2	Aşağı ziga	EK-22	Aşağı ziga	EK-42	Gülşehir	EK-62	Koç Pınarı
EK-3	Aşağı ziga	EK-23	Aşağı ziga	EK-43	Gülşehir	EK-63	Koç Pınarı
EK-4	Aşağı ziga	EK-24	Aşağı ziga	EK-44	Narlıgöl	EK-64	Koç Pınarı
EK-5	Aşağı ziga	EK-25	Aşağı ziga	EK-45	Narlıgöl	EK-65	Koç Pınarı
EK-6	Aşağı ziga	EK-26	Gülşehir	EK-46	Narlıgöl	EK-66	Koç Pınarı
EK-7	Aşağı ziga	EK-27	Gülşehir	EK-47	Narlıgöl	EK-67	Koç Pınarı
EK-8	Aşağı ziga	EK-28	Gülşehir	EK-48	Narlıgöl	EK-68	Koç Pınarı
EK-9	Aşağı ziga	EK-29	Gülşehir	EK-49	Narlıgöl	EK-69	Koç Pınarı
EK-10	Aşağı ziga	EK-30	Gülşehir	EK-50	Narlıgöl	EK-70	Koç Pınarı
EK-11	Aşağı ziga	EK-31	Gülşehir	EK-51	Narlıgöl	EK-71	Koç Pınarı
EK-12	Aşağı ziga	EK-32	Gülşehir	EK-52	Narlıgöl	EK-72	Koç Pınarı
EK-13	Aşağı ziga	EK-33	Gülşehir	EK-53	Narlıgöl	EK-73	Koç Pınarı
EK-14	Aşağı ziga	EK-34	Gülşehir	EK-54	Narlıgöl	EK-74	Koç Pınarı
EK-15	Aşağı ziga	EK-35	Gülşehir	EK-55	Narlıgöl	EK-75	Koç Pınarı
EK-16	Aşağı ziga	EK-36	Gülşehir	EK-56	Koç Pınarı	EK-76	Koç Pınarı
EK-17	Aşağı ziga	EK-37	Gülşehir	EK-57	Koç Pınarı	EK-77	Koç Pınarı
EK-18	Aşağı ziga	EK-38	Gülşehir	EK-58	Koç Pınarı	EK-78	Koç Pınarı
EK-19	Aşağı ziga	EK-39	Gülşehir	EK-59	Koç Pınarı	EK-79	Koç Pınarı
EK-20	Aşağı ziga	EK-40	Gülşehir	EK-60	Koç Pınarı	EK-80	Koç Pınarı

4.2. Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kalitatif tayini

Yağ ile kontamine toprak ve su örneklerinden izole edilen 80 izolatın OD₆₀₀ değerleri eşitlenerek tribütrin agara ekimi yapılmıştır. Bunların arasından tribütrin agarda oluşturdukları şeffaf zon çapı en büyük olan 24 tanesi kalitatif ve kantitatif lipaz aktivite analizlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Lipaz aktivitesi kalitatif olarak izolatların tribütrin agarda şeffaf zon oluşturması ile belirlenmiştir. İzolatların OD₆₀₀ değerleri eşitlenen aktif kültürleri tribütrin agara ekilerek 37 °C'de 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir ve inkübasyon süresi sonunda oluşan zon çapları ölçülmüştür. EK-1 izolatına ait tribütrin agarda şeffaf zon görüntüsü Resim 4.1.'de sunulmuştur.



Resim 4.1. EK-1 izolatının tribütrin agardaki şeffaf zon görüntüsü

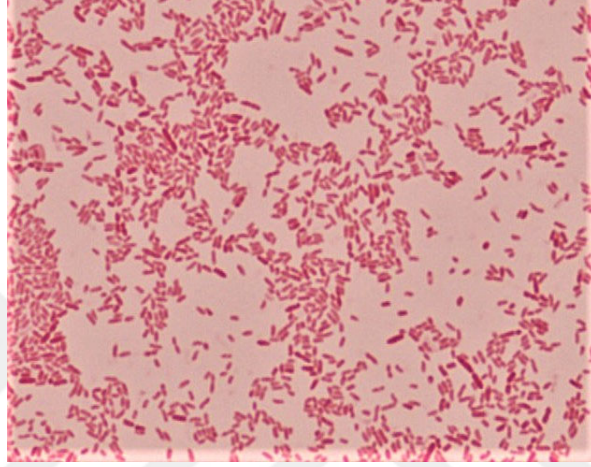
24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda iyi ve orta çapta zon oluşturan 24 izolatın tribütrin agarda oluşturdukları şeffaf zon çapları Tablo 4.2.'de verilmiştir. Tribütrin agarda 48 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek şeffaf zon çapına sahip izolatlar 27 mm şeffaf zon çapıyla EK-1, EK-3, EK-55 izolatları olurken, en düşük zon çapına sahip izolat 17 mm şeffaf zon çapıyla EK-38 izolatı olmuştur.

Tablo 4.2. İzolatların tribütrin agardaki lipolitik aktiviteleri

İzolat	Zon çapı mm (24 saat)	Zon çapı mm (48 saat)
EK-1	21±1	27±2
EK-2	20±1	26±1
EK-3	21±1	27±1
EK-4	19±1	24±1
EK-5	19±1	24±1
EK-12	20±0,4	25±0,4
EK-13	20±1	25±0,4
EK-16	18±1	24±1
EK-18	20±2	26±2
EK-21	19±1	24±1
EK-23	20±2	25±3
EK-31	20±1	25±0,4
EK-32	19±1	25±2
EK-33	15±2	19±2
EK-34	20±1	24±1
EK-38	16±1	17±1
EK-40	20±1	24±2
EK-41	19±0,4	25±1
EK-42	19±1	24±1
EK-43	18±1	24±2
EK-53	20±1	24±1
EK-55	19±1	27±2
EK-56	18±1	24±2
EK-57	19±1	24±2

4.3. Lipolitik izolatların Gram boyanma özelliği

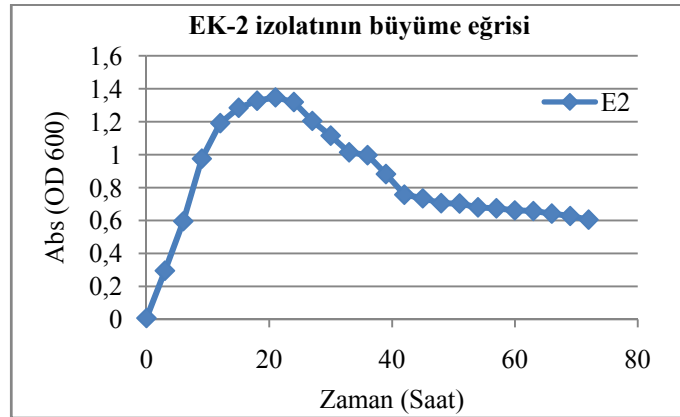
İzolatların Gram boyama ile boyanıp ışık mikroskopunda 100x immersiyon objektifinde incelemeleri sonucu Gram boyanma özelliği belirlenmiştir. Buna göre izolatların hepsi Gram negatif olarak görülmüştür. EK-41 izolatının 100x objektifteki görüntüsü Resim 4.2.'de verilmiştir.



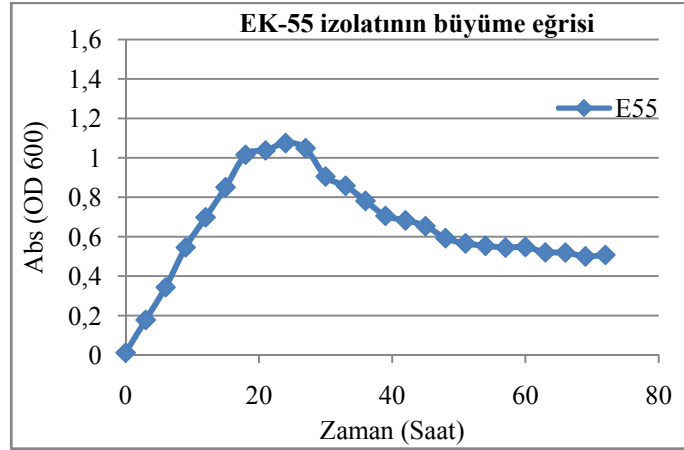
Resim 4.2. EK-41 izolatının gram boyaması

4.4. Lipolitik izolatların büyüme eğrileri

Her saat başında örneklerin OD₆₀₀'deki absorbansları ölçülerek büyüme eğrileri oluşturulmuş ve bütün izolatların büyüme fazları ile zaman ilişkisi belirlenmiştir. İzolatlardan EK-2 ve E-55'in büyüme eğrisi Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. EK-2 izolatının büyüme eğrisi



Şekil 4.2. EK-55 izolatının büyüme eğrisi

4.5. Lipolitik izolatların koloni oluşturan birim sayıları

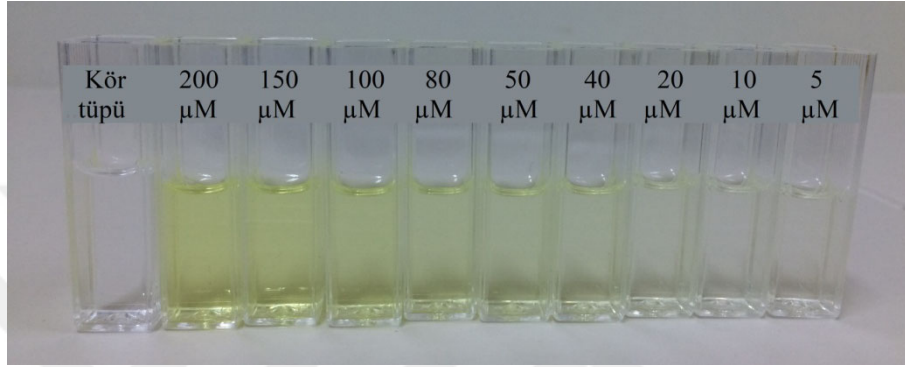
İzolatların koloni oluşturan birim sayıları (cfu/ml) hesaplanarak Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.3. İzolatların cfu/ml değerleri

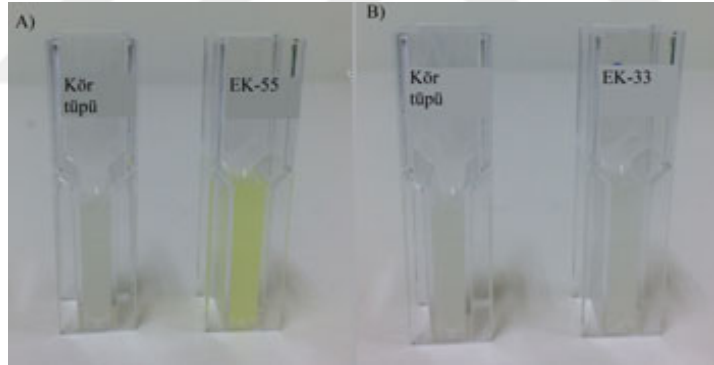
İzolat	cfu/ml	İzolat	cfu/ml
EK-1	1,8x10 ⁹	EK-32	6,4x10 ⁹
EK-2	2,0x10 ⁹	EK-33	1,9x10 ⁹
EK-3	1,6x10 ⁹	EK-34	6,0x10 ⁹
EK-4	5,5x10 ⁹	EK-38	3,9x10 ⁹
EK-5	3,3x10 ⁹	EK-40	5,6x10 ⁹
EK-12	2,6x10 ⁹	EK-41	5,7x10 ⁹
EK-13	2,4x10 ⁹	EK-42	5,9x10 ⁹
EK-16	2,2x10 ⁹	EK-43	3,6x10 ⁹
EK-18	2,8x10 ⁹	EK-53	2,1x10 ⁹
EK-21	4,8x10 ⁹	EK-55	3,2x10 ⁹
EK-23	4,9x10 ⁹	EK-56	3,7x10 ⁹
EK-31	3,9x10 ⁹	EK-57	3,6x10 ⁹

4.6. Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kantitatif tayini

Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kantitatif tayininde pNPP testi kullanılmıştır. Testi değerlendirmek için pNP'nin bilinen derişimlerinden 410 nm'de ölçüm yapılarak standart grafiği elde edilmiştir. Resim 4.3.'te farklı konsantrasyonlardaki pNP solüsyonları ve körün görüntüsü yer almaktadır.



Resim 4.3. pNP'nin farklı derişimlerdeki solüsyonları



Resim 4.4. EK-55 (a) ve EK-33 (b) izolatlarının pNPP testindeki renk değişimi

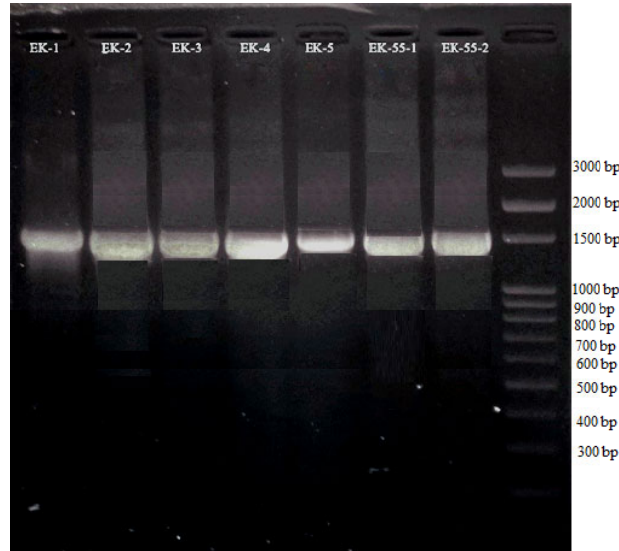
Tribütrin agarda iyi derecede şeffaflık zonu oluşturan 24 izolatın lipaz aktivitesi pNPP testi ile ölçülmüş ve aktivite sonuçları Şekil 4.3.'te gösterilmiştir. Buna göre pNPP testinde en yüksek aktivite gösteren izolat 26 U/ml aktivite ile EK-2 izolatı olmuştur. Onu izleyen izolatlar ise sırasıyla 23 U/ml, 17 U/ml ve 15'er U/ml, U/ml aktivite ile EK-5, EK-1, EK-3, EK-4, ve EK-55 izolatları olmuştur. pNPP testinde en düşük aktivite gösteren izolat ise 1 U/ml aktivite ile EK-38 izolatı olmuştur.



Şekil 4.3. Seçilen izolatların pNPP testindeki lipaz aktiviteleeri

4.7. İzolatların tanımlanması

Kalitatif ve kantitatif enzim aktivitesi yüksek olan 6 izolatın (EK-1, EK-2, EK-3, EK-4, EK-5, EK-55) genomik DNA izolasyonu Gene Jet Genomic DNA kiti ile kit protokolüne göre yapılmıştır ve 16S rRNA bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Resim 4.5.te PCR ürününün agaroz jel elektroforezi görüntüsü yer almaktadır.



Resim 4.5. İzolatların 16S rRNA gen bölgelerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

16S rRNA bölgesinin sekans sonuçları BLAST programı ile değerlendirilerek izolatların türleri *Aeromonas veronii* olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre çıkan ilk tür Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. BLAST sonuçlarına göre izolatların türleri

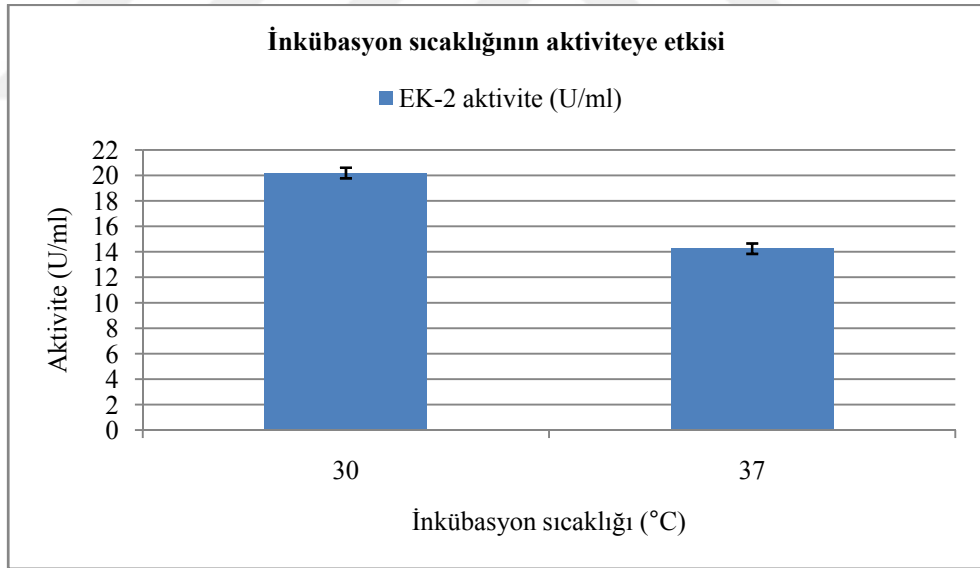
Sample	Description	Ident	Accession
EK-1 Forward	<i>Aeromonas veronii</i> partial 16S rRNA gene, isolate HL2RS4	1	LT797513.1
EK-1 Reverse	<i>Aeromonas veronii</i> strain BB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	KF446249.1
EK-2 Forward	<i>Aeromonas veronii</i> partial 16S rRNA gene, isolate HL2RS4	0,99	LT797513.1
EK-2 Reverse	<i>Aeromonas veronii</i> strain SM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	KY886140.1
EK-3 Forward	<i>Aeromonas veronii</i> partial 16S rRNA gene, isolate HL2RS4	0,99	LT797513.1
EK-3 Reverse	<i>Aeromonas veronii</i> strain BB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	KF446249.1
EK-4 Forward	<i>Aeromonas veronii</i> strain PYLGC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	KY767542.1
EK-4 Reverse	<i>Aeromonas veronii</i> strain GZ09007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	MF033458.1
EK-5 Forward	<i>Aeromonas veronii</i> partial 16S rRNA gene, isolate HL2RS4	1	LT797513.1
EK-5 Reverse	<i>Aeromonas veronii</i> strain SM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	KY886140.1
EK-55 Forward	<i>Aeromonas veronii</i> strain PYLGC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	KY767542.1
EK-55 Reverse	<i>Aeromonas veronii</i> strain GZ09007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	MF033458.1

Yüksek enzim aktivitesi gösteren türlerin hepsi *A. veronii* olarak bulunduğu için bunların arasında en iyi enzim aktivitesini gösteren *A. veronii* EK-2 izolatı seçilerek, yapılacak olan optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

4.8. Fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu

4.8.1. İnkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

A. veronii EK-2 izolatı 30 ve 37 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kültür ortamının santrifüjü ile elde edilen süpernatantın filtratı enzim aktivitesi tayini için kullanılmış ve Şekil 4.4’te EK-2 izolatının farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki enzim aktivite sonuçları verilmiştir. Buna göre EK-2 izolatı 30°C’de inkübe edildiğinde 20,19 U/ml, 37°C’de inkübe edildiğinde ise 14,25 U/ml aktivite göstermiştir. İzolatın daha yüksek aktivite gösterdiği inkübasyon sıcaklığının 30 °C olduğu belirlenmiş ve sonraki deneylerde izolatlar 30°C’de inkübe edilmiştir.

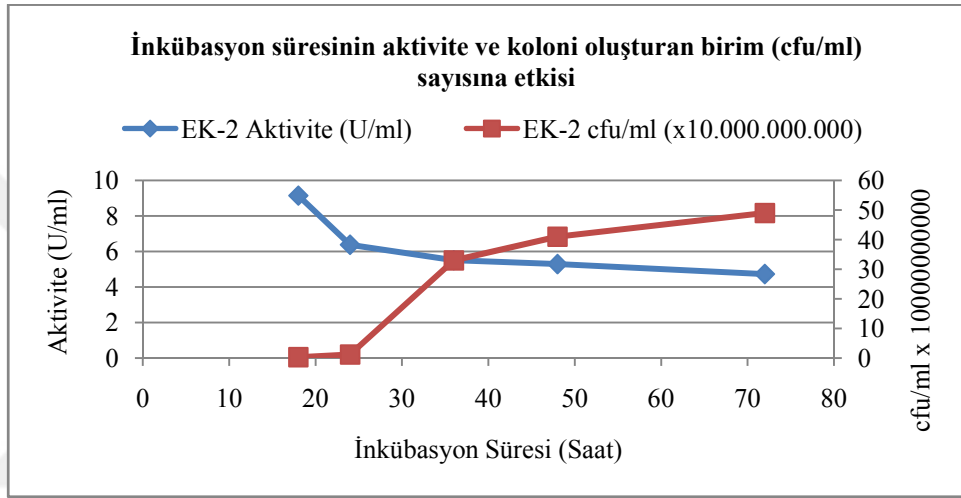


Şekil 4.4. Enzim aktivitesi ve kültürün inkübasyon sıcaklığı arasındaki ilişki

4.8.2. İnkübasyon süresinin belirlenmesi

A. veronii EK-2 izolatı 30 °C’de farklı sürelerde (18, 24, 36, 48, 72 saat) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda her süre için cfu/ml hesaplanmıştır. Kültür ortamının santrifüjü ile elde edilen süpernatantın filtratı enzim aktivitesi tayini için kullanılmış ve Şekil 4.5’te EK-2 izolatının farklı inkübasyon sürelerindeki enzim

aktivite sonuçları ve koloni oluşturan birim sayısı ilişkisi verilmiştir. Buna göre EK-2 izolatı 18 saat inkübe edildiğinde 9,15 U/ml ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir. İzolatın büyüme eğrisi ile karşılaştırıldığında enzim aktivitenin logaritmik fazın sonlarına doğru en yüksek değere ulaştığı durgunluk ve ölüm fazlarında ise aktivitenin düştüğü belirlenmiştir. İzolatın daha yüksek aktivite gösterdiği inkübasyon süresi 18 saat olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde izolatlar 30 °C’de 18 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 4.5. Enzim aktivitesi ve kültürün inkübasyon süresi arasındaki ilişki

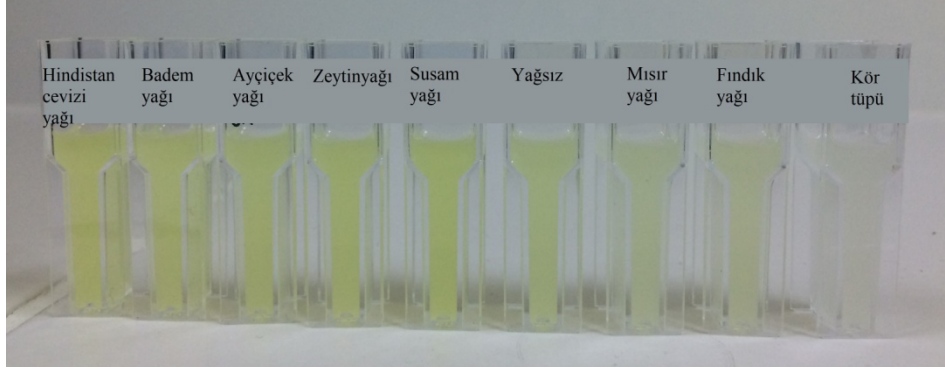
4.8.3. Lipaz üretim besiyerinin belirlenmesi

Ali ve arkadaşları tarafından belirlenen, içeriği maya ekstraktı (% 0,2), KH_2PO_4 (% 0,1), K_2HPO_4 (% 0,1), MgSO_4 (% 0,05), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% 0,5 w/v), NaCl (% 0,1) ve zeytinyağı (% 1) olan lipaz üretim besiyeri bileşenleri modifiye edilerek, *A. veronii* EK-2 için optimum besiyeri belirlenmiştir [123].

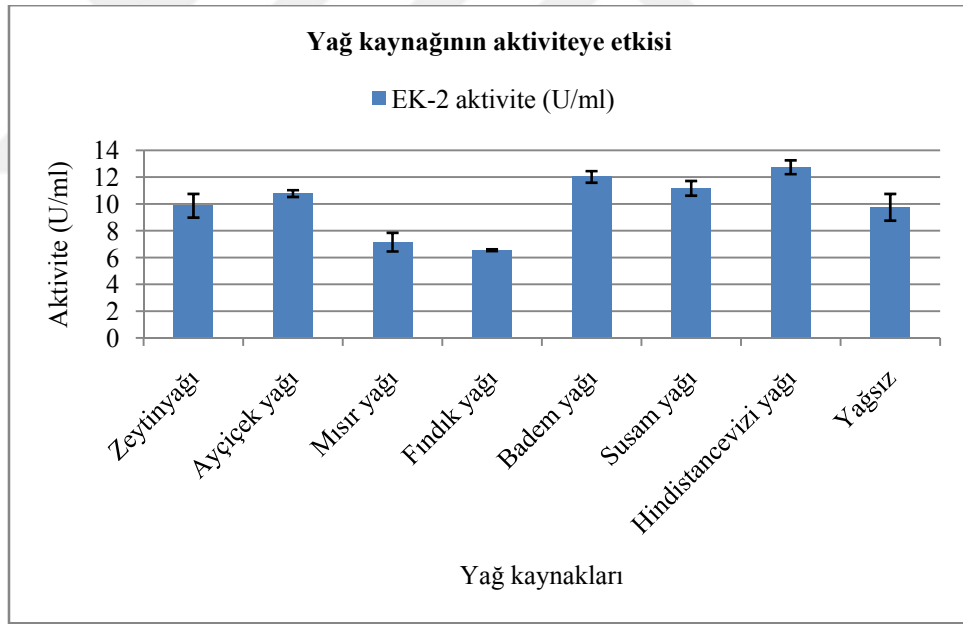
4.8.3.1. Yağ kaynağının belirlenmesi

7 farklı yağ kaynağı (zeytinyağı, ayçiçeği yağı, mısır yağı, fındık yağı, badem yağı, susam yağı, hindistancevizi yağı) %1 v/v oranında kullanılarak hazırlanan lipaz üretim besiyerinde geliştirilen *A. veronii* EK-2 izolatının enzim aktivite sonuçları Şekil 4.6.’da, pNPP testindeki görüntüsü ise Resim 4.6.’da verilmiştir. Buna göre EK-2 izolatının en yüksek aktivite gösterdiği yağ kaynağı hindistancevizi yağı (12,74 U/ml) olmuştur. En

düşük aktivite gösterilen yağ kaynağı ise fındık yağı (6,55 U/ml) olmuştur. Sonraki deneylerde izolatlar için yağ kaynağı olarak hindistancevizi yağı kullanılmıştır.



Resim 4.6. Farklı yağ kaynağı içeren besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü (Soldan sağa: Hindistancevizi yağı, badem yağı, ayçiçek yağı, zeytinyağı, susam yağı, yağ içermeyen ortam, mısır yağı, fındık yağı, kör)

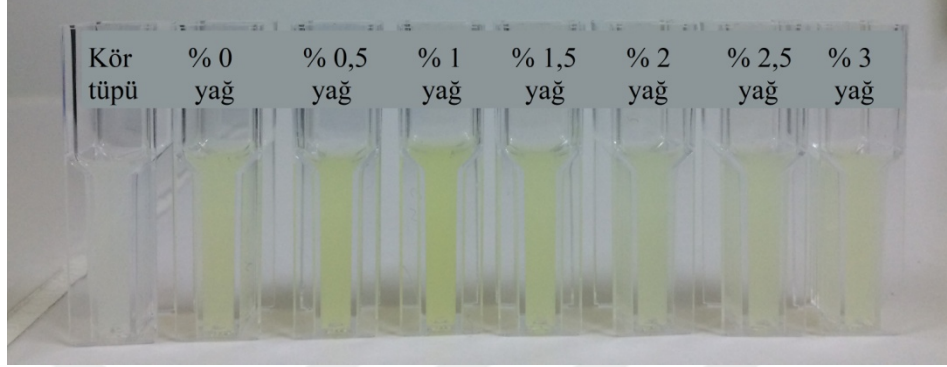


Şekil 4.6. Yağ kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi

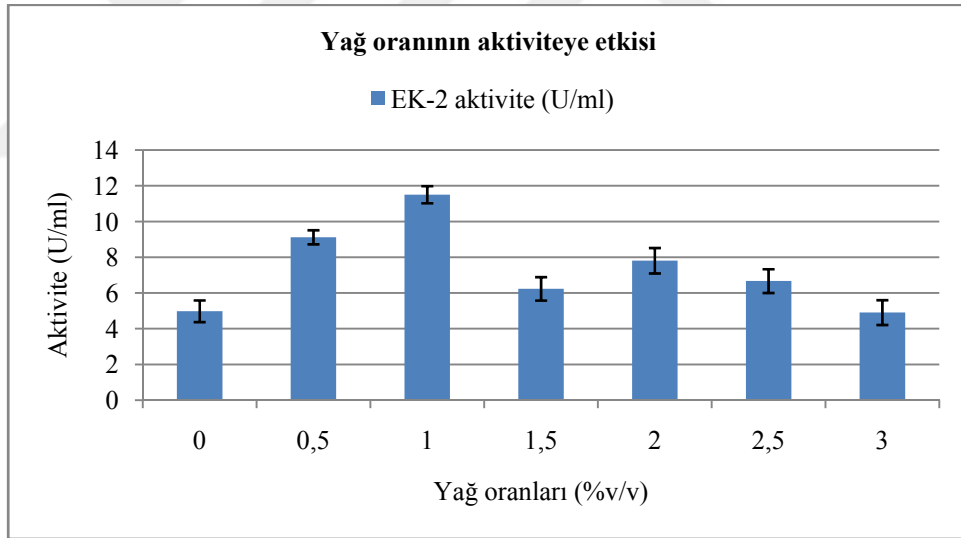
4.8.3.2. Yağ miktarının belirlenmesi

Farklı oranlarda (% 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3) hindistancevizi yağı eklenerek hazırlanan lipaz üretim besiyerinde geliştirilen *A. veronii* EK-2 izolatının enzim aktivite sonuçları Şekil 4.7.'de, pNPP testindeki görüntüsü ise Resim 4.7'de gösterilmiştir. Buna göre EK-2 izolatının en yüksek aktivite gösterdiği yağ oranı %1 hindistancevizi yağı (11,5 U/ml)

olmuştur. En düşük aktivite gösterilen yağ oranı ise 4,91 U/ml ile %3 hindistancevizi yağı olmuştur. Sonraki deneylerde besiyerine %1 v/v oranında ilave edilmiş hindistan cevizi yağı yağ kaynağı olarak kullanılmıştır.



Resim 4.7. Hindistancevizi yağını farklı oranlarda içeren besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü (Soldan sağa: kör, %0, %0,5, %1, %1,5, %2, %2,5, %3)

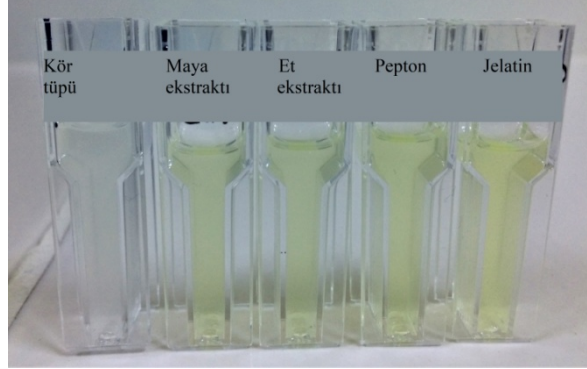


Şekil 4.7. Yağ oranının lipaz aktivitesine etkisi

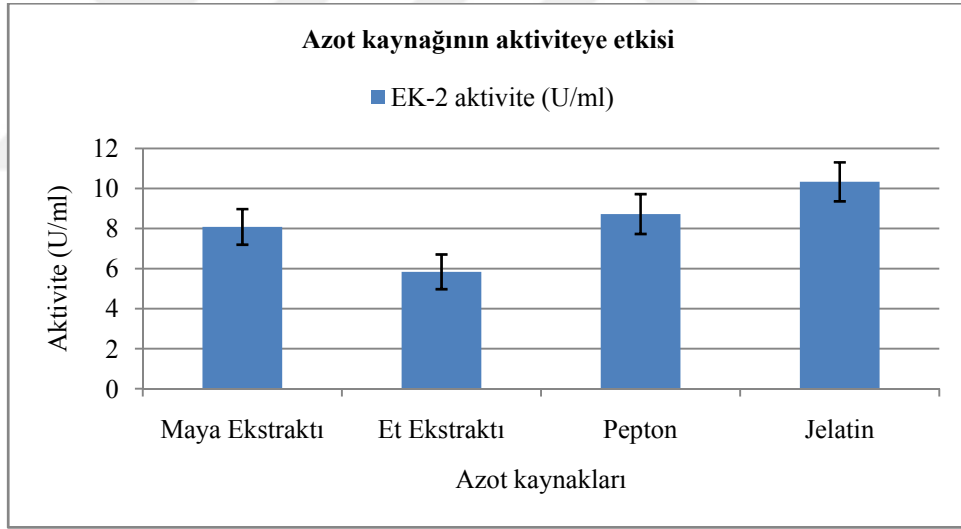
4.8.3.3. Azot kaynağının belirlenmesi

%2 w/v oranında farklı azot kaynağı (maya ekstraktı, et ekstraktı, pepton, jelatin) içeren besiyerlerinde geliştirilen *A. veronii* EK-2 izolatının enzim aktivite sonuçları Şekil 4.8.'de, pNPP testindeki görüntüsü ise Resim 4.8.'de sunulmuştur. Buna göre EK-2 izolatının en yüksek aktivite gösterdiği azot kaynağı jelatin (10,33 U/ml) olmuştur. En düşük aktivite gösterilen azot kaynağı ise 5,84 U/ml ile et ekstraktı olmuştur. İlerleyen

deneylerde besiyerine %2 w/v oranında ilave edilmiş jelatin azot kaynağı olarak kullanılmıştır.



Resim 4.8. Farklı azot kaynağı içeren besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü (Soldan sağa: Kör, Maya ekstraktı, Et Ekstraktı, Pepton, Jelatin)

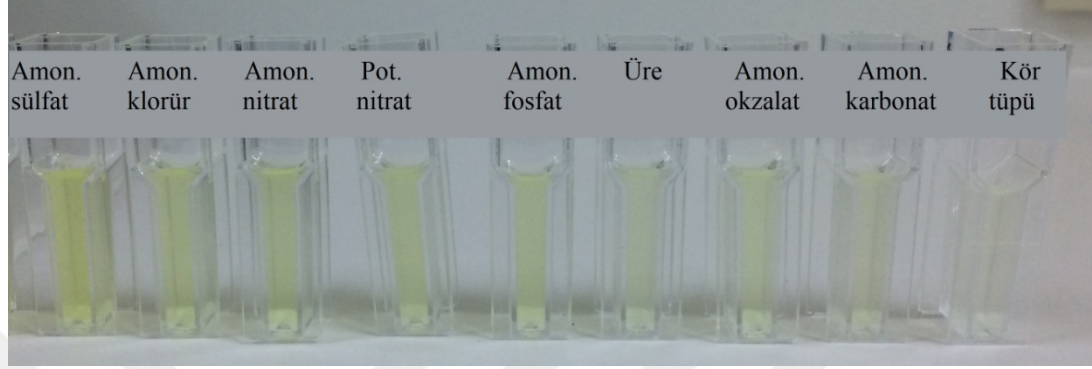


Şekil 4.8. Azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi

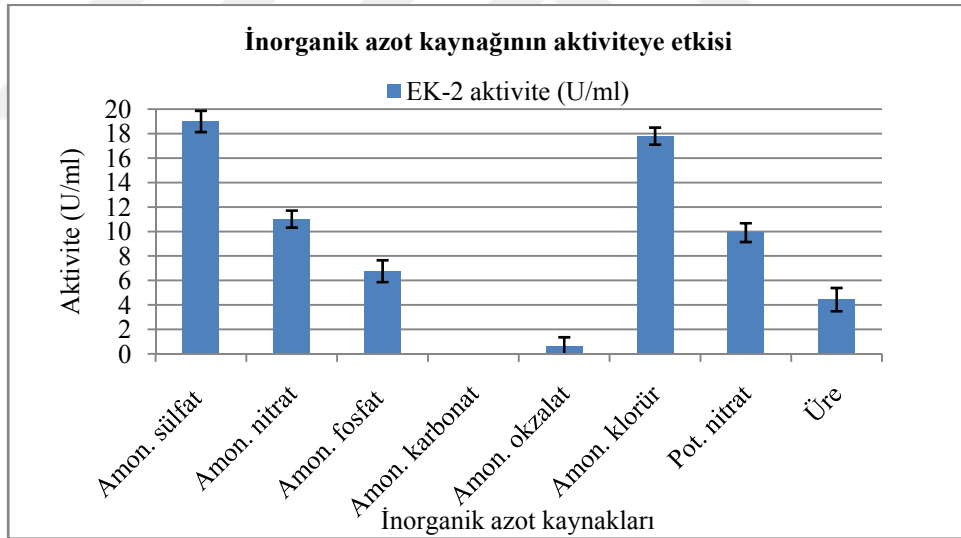
4.8.3.4. İnorganik azot kaynağının belirlenmesi

8 farklı azot kaynağı (amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum fosfat, amonyum karbonat, amonyum oksalat, amonyum klorür, potasyum nitrat, üre) % 0,5 w/v oranında kullanılarak hazırlanan lipaz üretim besiyerinde geliştirilen *A. veronii* EK-2 izolatının enzim aktivite sonuçları Şekil 4.9.'da pNPP testindeki görüntüsü ise Resim 4.9.'da verilmiştir. Buna göre EK-2 izolatının en yüksek aktivite gösterdiği inorganik azot kaynağı amonyum sülfat (18,99 U/ml) olmuştur. En düşük aktivite gösterilen azot

kaynağı ise 0,05 U/ml ile amonyum karbonat olmuştur. İlerleyen deneylerde besiyerine %0,5 w/v oranında ilave edilmiş amonyum sülfat inorganik azot kaynağı olarak kullanılmıştır.



Resim 4.9. Farklı inorganik kaynağı içeren besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü (Soldan sağa: Amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum nitrat, potasyum nitrat, amonyum fosfat, üre, amonyum okzalit, amonyum karbonat, kör)

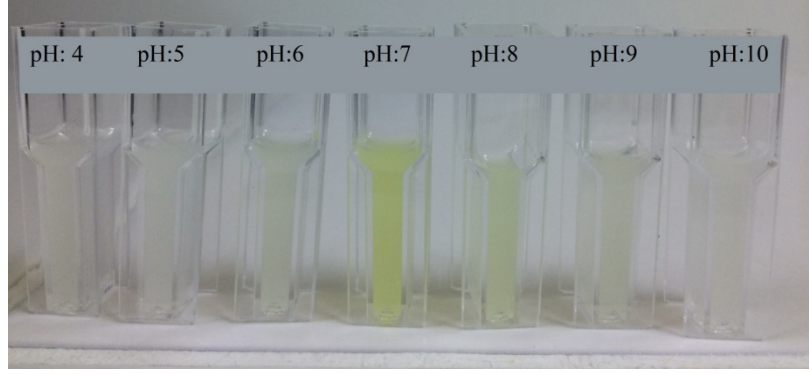


Şekil 4.9. İnorganik azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi

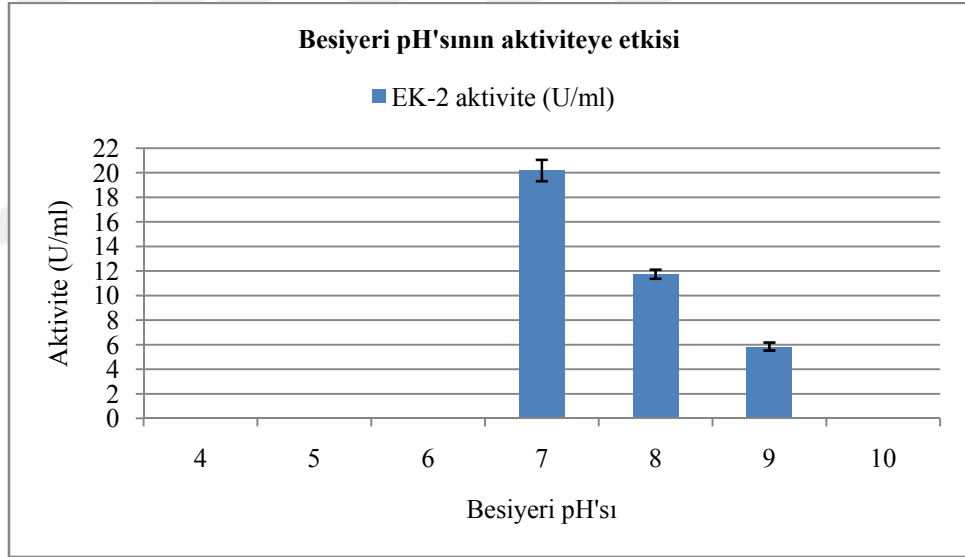
4.8.3.5. Besiyeri pH'sının belirlenmesi

Farklı pH değerlerinde (pH 4-10) hazırlanan lipaz üretim besiyerinde geliştirilen *A. veronii* EK-2 izolatının enzim aktivite sonuçları Şekil 4.10.'da, pNPP testindeki görüntüsü ise Resim 4.10.'da gösterilmiştir. Buna göre EK-2 izolatının en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri pH 7 (20,18 U/ml) olmuştur. Bunu 11,73 U/ml ile pH 8 izlemiştir. pH 9'da 5,85 U/ml aktivite kaydedilmiştir. pH 4, 5, 6 ve 10 değerlerinde

hazırlanan lipaz üretim besiyerinde geliştirilen izolatlarda ise kayda değer bir aktivite ölçülememiştir.



Resim 4.10. Farklı pH'daki besiyerlerinde inkübe edilen örneklerin pNPP testindeki görüntüsü (Soldan sağa: pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10)



Şekil 4.10. Besiyeri pH'sının lipaz aktivitesine etkisi

4.9. Lipazın kısmi saflaştırılması

A. veronii EK-2 lipazının kültür ortamından saflaştırılması için, santrifüj, diyaliz ve ultrafiltrasyon teknikleri uygulanmıştır. *A. veronii* EK-2 lipazının farklı saflaştırma basamaklarındaki enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite Tablo 4.5.'te verilmiştir. Sonuçlara göre saflaştırma basamakları arttıkça toplam aktivite, toplam protein ve spesifik aktivite değerleri artmıştır. Ultrafiltrasyon sonrası elde edilen kısmi saflaştırılmış örnekte aktivite 39,47 U/ml, protein miktarı 0,043 mg/ml, spesifik aktivite ise 912 (U/mg) ile en yüksek değere sahiptir.

Tablo 4.5. Farklı saflaştırma basamaklarındaki lipazın toplam ve spesifik aktivitesi

Farklı Saflaştırma Basamakları	Toplam Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Santrifüj	20,83±0,39	0,030±0,0010	703±13
Diyalizat	26,17±0,42	0,036±0,0012	733±12
Ultrafiltrat	39,47±0,42	0,043±0,0012	912±10

4.10. Enzimin optimizasyonu ve karakterizasyonu

4.10.1 Sıcaklığın lipaz aktivitesine etkisi

50 mM pH 8,0 Tris HCl tamponu kullanılarak pNPP lipaz testi farklı sıcaklıklarda (10-80 °C) gerçekleştirilmiş ve enzimin farklı sıcaklıklardaki aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz için optimum sıcaklık 45,05 U/ml toplam aktivite, ve 1037 mg/ml spesifik aktivite ile 40 °C olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu sıcaklık kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.6.'da gösterilmiştir. Buna göre EK-2 lipazın 10 °C'den 70 °C'ye kadar aktivite göstererek geniş sıcaklık aralıklarında kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Tablo 4.6. Farklı sıcaklıklarda lipazın toplam ve spesifik aktivitesi

Sıcaklık (°C)	Toplam Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
10	6,37±0,66	0,043±0,0005	147±5
20	37,97±0,46	0,043±0,0005	874±6
30	43,22±0,52	0,043±0,0005	995±4
40	45,05±0,67	0,043±0,0005	1037±8
50	37,02±0,61	0,043±0,0005	852±5
60	36,76±0,86	0,043±0,0005	846±7
70	11,62±0,44	0,043±0,0005	267±6
80	-	0,043±0,0005	-

-: aktivite saptanamamıştır.

4.10.2. pH'nın lipaz aktivitesine etkisi

Reaksiyonda kullanılan 50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi farklı pH'larda (pH 2-12) hazırlanarak pNPP lipaz testinde kullanılmış ve enzimin farklı pH'lardaki aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz için optimum tampon pH'sı 45,17 U/ml toplam aktivite, ve 1040 mg/ml spesifik aktivite ile pH 8,0 olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu tampon pH'sı kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7.'de sunulmuştur. Buna göre EK-2 lipazın alkali pH değerlerinde daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.7. Farklı tampon pH'sında lipazın toplam ve spesifik aktivitesi

Tampon pH'sı	Toplam Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
2	-	0,043±0,0005	-
4	3,02±0,40	0,043±0,0005	69±1
6	3,29±0,44	0,043±0,0005	76±5
8	45,17±0,51	0,043±0,0005	1040±4
10	44,17±0,30	0,043±0,0005	1017±6
12	-	0,043±0,0005	-

-: aktivite saptanamamıştır.

4.10.3. Tampon konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi

Reaksiyonda kullanılan pH 8,0 Tris-HCl tampon çözeltisi farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 mM) hazırlanarak pNPP lipaz testinde kullanılmış ve enzimin farklı tampon konsantrasyonlardaki aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz için optimum tampon konsantrasyonu 56,35 U/ml toplam aktivite, ve 1297 mg/ml spesifik aktivite ile 50 mM olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu tampon konsantrasyonu kullanılmıştır. Lipazın en az aktivite gösterdiği tampon konsantrasyonu ise 37,13 U/ml toplam aktivite, ve 855 mg/ml spesifik aktivite ile 200 mM olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.8.'de verilmiştir. Buna göre EK-2 lipazın 200 mM'den 5 mM'ye kadarki tampon konsantrasyonlarında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.8. Farklı tampon konsantrasyonlarında lipazın toplam ve spesifik aktivitesi

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Toplam Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
200	37,13±0,62	0,043±0,0005	855±12
150	46,53±0,61	0,043±0,0005	1071±21
100	55,04±0,80	0,043±0,0005	1267±23
50	56,35±0,55	0,043±0,0005	1297±17
25	44,52±0,64	0,043±0,0005	1025±20
10	42,95±0,95	0,043±0,0005	988±20
5	42,72±0,66	0,043±0,0005	983±22

4.10.4. Substrat konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi

Reaksiyonda kullanılan pNPP substrat çözeltisi (Solüsyon A) farklı konsantrasyonlarda (3,375, 6,75, 13,5, 27, 54, 108 mg/ml) hazırlanarak pNPP lipaz testinde kullanılmış ve enzimin farklı tampon konsantrasyonlardaki toplam ve spesifik aktivitesi belirlenmiştir. Lipaz için optimum substrat konsantrasyonu 48,6 U/ml toplam aktivite, ve 1119 mg/ml spesifik aktivite ile 27 mg/ml olarak belirlenmiş ve sonraki deneylerde bu substrat konsantrasyonu kullanılmıştır. Lipaz aktivitesinin en az olduğu substrat konsantrasyonu ise 7,88 U/ml toplam aktivite, ve 181 mg/ml spesifik aktivite ile 3,375 mg/ml olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.9.'da gösterilmiştir. Lipaz aktivitesi 3,375 mg/ml'den 27 mg/ml substrat konsantrasyonuna kadar olan substrat konsantrasyonunda artış göstermiş, sonrasında ise düşmüştür. 108 mg/ml substrat konsantrasyonda ise enzim aktivitesi saptanamamıştır. Daha yüksek konsantrasyonda substrat içeren çözeltilerde substratın yeterince çözünmemesinden dolayı enzim aktivitesinin düştüğü düşünülmektedir.

Yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonucunda *A. veronii* EK-2 lipazının optimum çalışma sıcaklığı 40 °C, optimum çalışma pH'sı pH:8, ideal tampon konsantrasyonu, 50 mM Tris-HCl ve ideal substrat konsantrasyonu 27 mg/ml pNPP olarak belirlenmiştir.

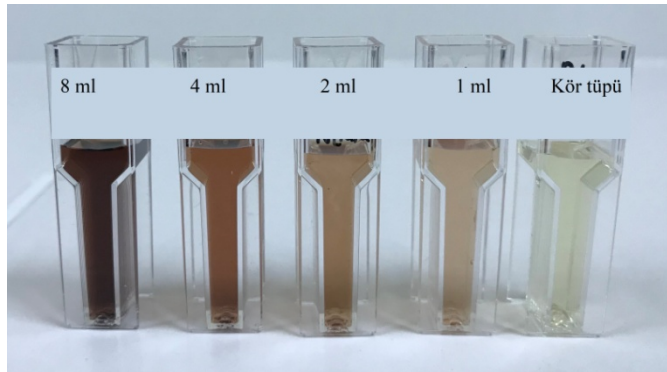
Tablo 4.9. Farklı substrat konsantrasyonunda lipazın toplam ve spesifik aktivitesi

Substrat Konsantrasyonu (mg/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Toplam Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
3,375	7,88±0,79	0,043±0,0005	181±5
6,75	20,38±0,41	0,043±0,0005	469±11
13,5	41,84±0,44	0,043±0,0005	963±14
27	48,60±0,50	0,043±0,0005	1119±26
54	40,84±0,62	0,043±0,0005	940±25
108	-	0,043±0,0005	-

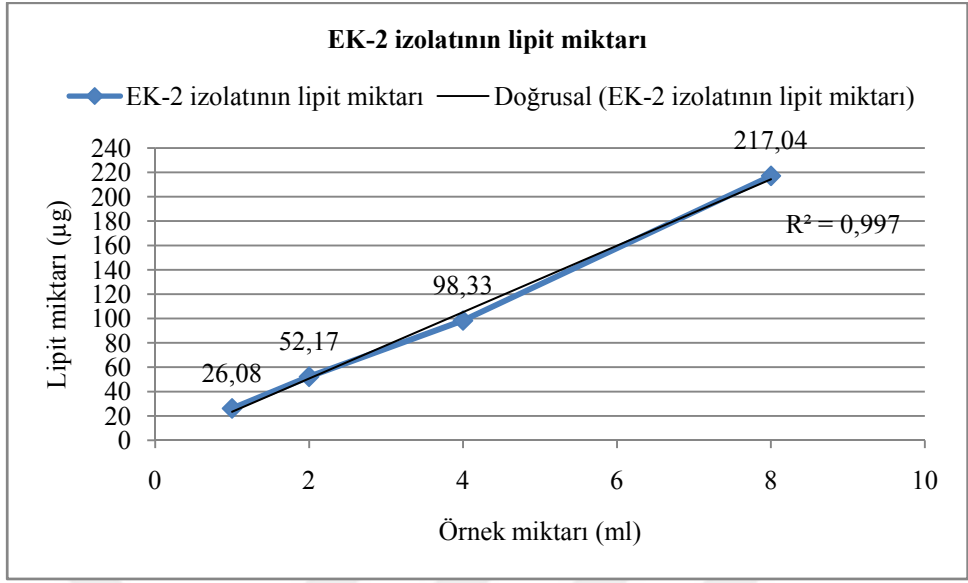
-: aktivite saptanamamıştır.

4.11. Lipit miktarı tayini

EK-2 kodlu izolatın lipit miktarını belirlemek için sulfo phospho vanillin (spv) testi kullanılmıştır. Kültür ortamının 1, 2, 4 ve 8 ml'sindeki lipit miktarı lipit standartlarından yararlanılarak oluşturulan lipit standart grafiği denklemi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.11.'de gösterilmiştir. Resim 4.11.'de ise örneklerin spv testindeki görüntüleri sunulmuştur. Sonuçlar EK-2 izolatının 1 ml'sinde 26,08 µg lipit bulunduğunu göstermiştir.



Resim 4.11. EK-2 izolatının spv testindeki renk değişimi (Soldan sağa; 8, 4, 2, 1 ml ve kör)



Şekil 4.11. EK-2 izolatındaki lipit miktarı

5.BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Enzimlerin, çeşitli kimyasal işlemlerde birçok uygulamada kullanılmasına bağlı olarak enzimolojiye olan ilgi son yıllarda artmıştır [124]. Çok yönlü uygulamalarından dolayı lipazlar, proteazlardan ve amilazlardan sonra en çok kullanılan üçüncü enzim grubudur [125]. Lipazlar (triacilgliserol ester hidrolaz, EC 3.1.1.3), yağ-su arayüzünde, serbest yağ asitleri ve gliserol oluşturmak üzere triacilgliserollerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen lipolitik karboksilester hidrolazlardır. Lipazlar ayrıca esterifikasyon, interesterifikasyon, transesterifikasyon, asidoliz ve aminoliz reaksiyonlarını da gerçekleştirebilirler [2].

Lipazlar, substrat özgülüğü, regiyoselektiflik ve kiral seçicilik gibi özellikleri sayesinde endüstride önemli bir yere sahiptirler [2]. Gıda, kozmetik, deri, deterjan, kağıt ve farmasötik endüstrilerinde ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda katalizör olarak kullanılmaktadır. Her endüstriyel uygulama enzimin farklı spesifik özelliklerini gerektirebileceğinden, yeni lipaz kaynaklarının bulunması için bir ilgi vardır [33].

Doğada hemen her yerde bulunan lipazlar çeşitli bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilir. Ancak endüstriyel lipazlar üretmek için en çok tercih edilen kaynak mikroorganizmalardır. Mikrobiyal lipazlar çeşitli organik çözücülerde, sulu ya da susuz ortamlarda, ekstrem sıcaklık ve pH'da kataliz gerçekleştirme yetenekleri, genetik manipülasyon kolaylığı, hızlı ve seri üretim gibi nedenlerle dikkat çekmektedirler [4]. Lipaz sentezleyen bakteriler, mayalar ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmalar endüstriyel atıklar, bitkisel yağ işleme fabrikaları, mandıralar, yağla kirlenmiş topraklar, sular gibi habitatlarda bulunurlar [126].

Son yıllarda lipazların çeşitli alanlardaki kullanımının katlanarak artmasına bağlı olarak lipaz üretiminin kalitatif ve kantitatif olarak iyileştirmesine yönelik çalışmalar çoğalmıştır [45]. Mikroorganizmalarla lipaz üretimi, izolata, büyüme ortamının bileşimine, inkübasyon koşullarına, pH, sıcaklığa ve karbon ve azot kaynakları gibi besin faktörlerine göre değişmekte ve bu faktörlerin optimizasyonu sayesinde lipaz üretiminde ciddi artış olabilmektedir [126].

Bu çalışmada çevresel kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların lipolitik aktivitesi incelenmiş, yüksek lipolitik aktivite gösteren türler seçilmiş, tanımlanan türlerden en yüksek enzim üretiminin gerçekleştiği koşullar araştırılmış ve optimize edilmiş, lipaz enzimi saflaştırılmış ve enzimin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Nevşehir ili çevresindeki ekstrem çevre şartlarından izole edilmiştir. Bu çalışmada lipolitik bakterilerin taranmasında tribütrin agar kullanılmıştır. Tribütrin agar ekstrasellüler lipaz üreten mikroorganizmaların taranmasında standart olarak sıklıkla kullanılmaktadır [94]. Yağ ile kontamine olmuş toprak ve kaynak sularından tribütrin agarda şeffaf zon oluşturan 80 bakteri izole edilmiştir.

Lipazlar doğada birçok yerde bulunmasına karşın, ekstrem çevre şartlarında optimum pH ve sıcaklık gibi fizyokimyasal özellikler bakımından endüstriyel kullanıma daha elverişli hücre dışı lipaz salgılayan mikroorganizmaların bulunacağı düşünülmektedir. Mobarak-Qamsari ve arkadaşları tarafından 2011 yılında gerçekleştirilen çalışmada yağlı ortamın, lipaz üreten mikroorganizmanın izolasyonu için daha iyi bir ortam sağladığı rapor edilmiştir [127]. Aly ve arkadaşları 2012 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, yağ ile kontamine olmuş toprak, kum ve atık sulardan lipaz üreten mikroorganizma elde ettiklerini bildirmişlerdir [128]. Rajan ve arkadaşları ise, yağ fabrikası, akaryakıt istasyonları ve restoranların atık boşaltma alanlarından alınan yağ ile kontamine olmuş toprakların lipolitik mikroorganizmaların gelişmesi ve lipaz üreten mikroorganizmaların izolasyonu için iyi kaynaklar olduğunu rapor etmişlerdir [129].

Tribütrin agarda iyi ve orta çapta şeffaf zon oluşturan 24 izolat kalitatif ve kantitatif analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu çalışmada lipaz aktivitesinin kalitatif tayininde tribütrin agar kullanılmıştır. Tribütrin agarda en yüksek zon çapına sahip izolatlar 27 mm şeffaf zon çapına sahip EK-1, EK-3, EK-55 izolatları olmuştur, bunu 26 mm zon çapıyla EK-2, ve EK-18 izolatları izlemiştir. Tribütrin agarda yüksek lipaz aktivitesine sahip olan izolatların tamamının aynı su kaynağından alındığı görülmektedir. Tribütrin agarda en düşük zon çapına sahip izolat ise 17 mm şeffaf zon çapına sahip EK-38 izolatı olmuştur. Tribütrin agarda düşük lipaz aktivitesine sahip bu

izolatın ise yağ ile kontamine toprak alanından alındığı görülmektedir. İzolatların geneli değerlendirildiğinde hem yağ ile kontamine toprak (17-25 mm), hem de sudan (24-27 mm) izole edilen mikroorganizmaların tribütrin agarda yüksek zon çapı oluşturduğu görülmüştür.

Ekstrasellüler lipaz aktivitesinin kalitatif tayininde çeşitli metotlar olmakla beraber; tribütrinin bilinen tüm lipazlar tarafından hidrolize edilebilmesi, zeytinyağında homojen olarak dağılabilmesi gibi özellikleri sayesinde tribütrin agarda şeffaf zon oluşumu lipolitik izolatların taranması için, en yaygın kullanılan metottur [94,96]. Pallavi ve arkadaşları 2015 yılındaki çalışmalarında *Pseudomonas* sp. LP8 izolatının tribütrin agardaki zon çapının 25 mm olduğunu belirtmişlerdir [130]. Bu çalışmadaki izolatların tribütrin agardaki zon çapının daha yüksek olması, çalışmada lipolitik aktivitesi daha yüksek türlerin elde edildiğini göstermektedir. Bu çalışmayla benzer şekilde Aly ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada yağ ile kontamine olmuş topraktan izole edilmiş *Streptomyces exfoliates* LB 10 izolatının tribütrin agardaki zon çapının en yüksek 28 mm olduğu rapor edilmiştir [128].

Kantitatif analiz, çeşitli izolatların lipolitik aktivitelerini karşılaştırmak için önemlidir. Bu çalışmada lipaz aktivitesinin kantitatif analizlerde pNPP testi uygulanmış ve bir birim enzim aktivitesi, dakikada 1 µmol nitrofenol serbest bırakan enzim miktarı olarak belirlenmiştir. pNPP testinde en yüksek aktivite gösteren izolat EK-2 (26 U/ml) olurken yüksek aktivite gösteren diğer izolatlar sırasıyla EK-5 (23 U/ml), EK-1 (17 U/ml), EK-3 (15 U/ml), EK-4 (15 U/ml), ve EK-55 (15 U/ml) olmuştur. pNPP testinde daha yüksek aktivite gösteren türlerin hepsi su kaynaklı izolatlardır. pNPP testinde en düşük aktivite gösteren izolat ise EK-38 (1 U/ml) izolatı olmuştur. Buna göre kantitatif lipaz aktivitesi tayin sonuçlarının kalitatif lipaz aktivitesi tayin sonuçları ile korelasyon içinde olduğu ($r:0,57$) görülmektedir.

Kantitatif lipaz aktivitesinin tayininde pNP esterlerinin hidrolizi hızlı ve basit olması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir [104]. Lipaz aktivitesinin kantitatif tayininde başka pNP esterlerinin kullanıldığı çalışmalar literatürde bulunmakla beraber, pNPP'nin çeşitli mikrobiyal lipazlar tarafından substrat olarak kullanılması sebebiyle bu çalışmada pNPP testi tercih edilmiştir. Yang ve arkadaşları tarafından *Burkholderia*

ubonensis lipazının aktivite tayininde, Unni ve arkadaşları tarafından *Pseudomonas aeruginosa* lipazının aktivite tayininde, Yoo ve arkadaşları tarafından *Ralstonia* sp. lipazının aktivite tayininde, Zheng ve arkadaşları tarafından *Acinetobacter* sp. XMZ-26 lipazının aktivite tayininde, Demir ve Tükel tarafından ise *Spirulina platensis* lipazının aktivite tayininde pNPP'nin substrat olarak kullanıldığı bilinmektedir [131-135].

Ertuğrul ve arkadaşları tarafından zeytin öğütme fabrikasının atık suyundan elde edilen *Bacillus* sp. lipazı ile yapılan çalışmada lipaz aktivitesinin kantitatif tayini için pNPP testini kullanmış ve lipaz aktivitesini 15 U/ml olarak belirlemiştir [33]. Sharma ve arkadaşları tarafından 2011 yılında gerçekleştirilen çalışmada ise pNPP testinde en yüksek aktiviteye sahip KS4 izolatının (0,612 U/ml) aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [136]. Bu çalışmadaki izolatların pNPP testindeki aktivitesinin diğer çalışmalara kıyasla daha yüksek olması, çalışmada lipolitik aktivitesi daha yüksek türlerin elde edildiğini göstermektedir.

Hem kalitatif lipaz tayini hem de kantitatif lipaz tayininde yüksek lipolitik aktivite gösteren 6 tür (EK-2, EK-5, EK-1, EK-3, EK-4, EK-55) tanımlanmak üzere seçilmiştir. 16S rRNA gen bölgesi dizisinin sekanslanması ile seçilen izolatlar *Aeromonas veronii* olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada *A. veronii* olarak tanımlanan türlerin hepsi kaynak suyundan izole edilmiştir. *Aeromonas* cinsi mikroorganizmaların genellikle yüzey suları, yeraltı suyu, klorlu içme suyu, klorsuz içme suyu, şişelenmiş maden suyu gibi sucul ortamlarda bulunduğu bilinmektedir [113-116].

Genel olarak *Aeromonas* sp.'nin ekstrasellüler lipaz ürettiği bilinmekle beraber, literatürde *A. veronii* lipazı diğer bakteriyel lipazlar kadar yoğun çalışılmamıştır. Kamaladevi ve çalışma arkadaşları ise tuz sahasından izole edilen *A. veronii* lipazını rapor etmiştir [55]. *Aeromonas* cinsindeki diğer türlerin ürettiği lipazlar da rapor edilmiştir. Neelambari ve arkadaşları *A. hydrophila* lipazını, Anguita ve arkadaşları *A. hydrophila* lipazını, Lee ve çalışma arkadaşları *Aeromonas* sp LPB 4 lipazını, Lotrakul ve Dharmstithi *A. sorbia* LP004 lipazını, Charoenpanich ve arkadaşları ise *Aeromonas* sp EBB-1 lipazını rapor etmişlerdir [65, 66, 68, 119, 120].

Tanımlanan izolatlar arasından en iyi enzim aktivitesine sahip olan *A. veronii* EK-2 seçilerek daha sonraki optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Öncelikle EK-2 izolatından lipaz üretimini arttırmak amacıyla fermantasyon koşullarında çeşitli değişiklikler yapılarak optimum koşullar araştırılmıştır. Bunun için sırasıyla, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, besiyeri pH'sı yağ kaynağı, yağ oranı, organik ve inorganik azot kaynakları optimize edilmiştir.

Bakteriyel lipaz üretimi, sıcaklık, pH, çalkalama, havalandırma, karbon ve azot kaynakları gibi birçok parametreden etkilenebilir [126]. Pogaku ve arkadaşları 2010 yılında *Staphylococcus* sp. Lp12'den lipaz üretiminin optimizasyonu için yaptıkları çalışmada, karbon kaynağı, azot kaynağı, yağ kaynağı ve yüzey aktif maddeler, besiyeri pH'sı ve sıcaklığının lipaz üretimine etkisini incelemiştirler [45]. Veerapagu ve arkadaşları tarafından 2013 yılında *Pseudomonas gessardi* ile yapılan çalışmada ise inkübasyon süresi ve sıcaklığı, besiyeri pH'sı ve sıcaklığı, çalkalama hızı, ekim konsantrasyonu, karbon kaynağı ve azot kaynağının lipaz üretimine etkisi incelenmiştir [137]. Bu çalışmada ise bakteriyel lipaz üretimini etkileyen inkübasyon süresi ve sıcaklığı, besiyeri pH'sı yağ kaynağı, yağ oranı, organik ve inorganik azot kaynakları parametreleri seçilerek optimizasyon deneylerinde kullanılmıştır.

A. veronii EK-2 izolatından lipaz üretiminin 30 °C'de (20,19 U/ml) daha yüksek olduğu gözlemlenirken 37 °C'de (14,25 U/ml) ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Buna göre EK-2 izolatının optimum üreme sıcaklığı olan 30 °C'nin aynı zamanda, EK-2'den lipaz üretimi için de optimum sıcaklık olduğu görülmektedir. Lipaz üretimi için optimum sıcaklık organizmadan organizmaya değiştiğinden, kontrol edilmesi gereken parametrelerin başında gelmektedir. Fermantasyon ortamında organizmanın üremesini ve gelişmesini etkilediği için ortam sıcaklığının lipaz üretimi üzerinde de önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca sıcaklığın hücre zarının fiziksel özelliklerini değiştirerek hücre dışı enzimlerin salgılanmasını etkilediği de düşünülmektedir [137].

Bu çalışmayla benzer şekilde lipaz üretimi için optimum sıcaklığın, mikroorganizmanın optimum geliştiği sıcaklık olduğu başka araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir. Veerapagu ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada *P. gessardi* izolatından lipaz enzim üretimi için optimum sıcaklığın 37 °C olduğu rapor edilmiştir [137].

Kulkarni ve Gadre *P. fluorescens* için optimum gelişmenin ve lipaz üretimin gerçekleştiği sıcaklığı 36 °C olarak tespit etmişlerdir [138].

A. veronii EK-2 izolatından lipaz üretiminin 18 saatlik inkübasyon sonucunda (9,15 U/ml) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. EK-2 izolatından en düşük lipaz üretimi ise 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda (4,73 U/ml) elde edilmiştir. İzolatın büyüme eğrisi ile karşılaştırıldığında enzim aktivitenin logaritmik fazın sonlarına doğru en yüksek değere ulaştığı durgunluk ve ölüm fazlarında ise aktivitenin düştüğü belirlenmiştir. Lipaz üretiminin kısa sürede maksimum seviyeye ulaşması ekimden kısa bir süre sonra lipazın hasat edilmesine olanak sağlayacağı için tercih edilen bir özelliktir. İlerleyen inkübasyon periyotlarında enzim seviyesinin azalması oluşan enzimin denatürasyonuna bağlı olabilmektedir [139].

Charoenpanich ve arkadaşları 2011 yılında *Aeromonas sp.* EBB-1 ile yaptıkları çalışmada lipaz aktivitesinin 9 saatlik inkübasyon sonunda tespit edilebilir olduğunu, 15 saatlik inkübasyonda ise maksimum değere ulaşmış sonrasında azaldığını rapor etmişlerdir [66]. Massadeh ve arkadaşlarının 2011 yılında *Bacillus stearothermophilus* lipazı ile yaptığı çalışmada maksimum lipaz aktivitesinin logaritmik fazın sonlarına denk gelen 24 saatlik inkübasyondan sonra elde edildiği, durgunluk ve ölüm fazlarında ise lipaz aktivitesinin azaldığı belirtilmiş ve büyümenin ilk aşamalarında mikroorganizmanın lipaza gereksinim duyduğu rapor edilmiştir [140]. Büyümenin yoğun olduğu bu aşamada mikroorganizmanın daha fazla ekstrasellüler lipaz salgılayarak besin ihtiyacını dış ortamdaki lipitlerden karşıladığı düşünülmektedir.

Besiyerindeki yağ kaynağının lipaz üretimine etkisi araştırılmıştır. *A. veronii* EK-2 izolatından lipaz üretimini en çok artıran yağ kaynaklarının sırasıyla hindistancevizi yağı (12,74 U/ml), badem yağı (12,02 U/ml), susam yağı (11,17 U/ml), ayçiçeği yağı (10,78 U/ml) ve zeytinyağı (9,87 U/ml) olduğu rapor edilmiştir. Bakteriyel lipazlar indüklenebilir enzimler olduğu için, lipaz aktivitesinin ekspresyonu için ana faktör her zaman karbon olmuştur. Bu nedenle genel olarak yağ gibi bir lipit kaynağının varlığı lipaz üretimini artırmaktadır [127]. Hindistancevizi yağıyla yüksek lipaz aktivitesi elde edilmesi, hindistancevizi yağının başlıca trigliseritler ve kısa zincirli yağ asitlerinden oluşan yüksek doymuş yağ asitleri içeriğinden kaynaklanabilir [141]. EK-2 izolatının

en düşük aktivite gösterdiği yağ kaynağı ise fındık yağı (6,55 U/ml) olmuştur. Bunun, enzimin spesifitesine veya fındık yağında lipaz inhibitörlerinin veya antiseptik maddelerin varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmayla benzer bir şekilde, Pogaku ve arkadaşları 2010 yılında *Staphylococcus* sp. Lp12 lipazı ile yaptıkları çalışmada, farklı yağ kaynakları arasından hindistancevizi yağının mikroorganizmadan lipaz üretimi için optimum yağ kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir [45]. Das ve arkadaşları 2017 yılında *Aspergillus tamarii* JGIF06'dan lipaz üretiminin hindistancevizi yağı varlığında en yüksek olduğunu belirtmişlerdir [141]. Neelambari ve arkadaşları 2011 yılında farklı karbon kaynaklarının *A. hydrophila* lipazının üretimine etkisini inceledikleri çalışmada hindistancevizi yağının (8,01 U/ml), Tween 80'den sonra lipaz üretimini en çok arttıran karbon kaynağı olduğunu belirlemişlerdir [65].

Hindistan cevizi yağının besiyerindeki ideal oranı araştırıldığında, ise hindistan cevizi yağının %1 v/v oranında (11,5 U/ml) eklenmesinin *A. veronii* EK-2 izolatından lipaz üretimine daha iyi etki ettiği gözlenmiştir. EK-2 izolatının en düşük aktivite gösterdiği yağ oranı ise %3 (4,91 U/ml) olmuştur. Ortamdaki lipid konsantrasyonundaki artışın, oksijenin difüzyonunu ve havalandırmayı belli oranda engelleyerek bakteri büyümesini ve lipaz sentezini olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir [141].

Das ve arkadaşları 2017 yılında *Aspergillus tamarii* JGIF06'dan lipaz üretiminin optimizasyonu için besiyerine değişen konsantrasyonlarda (%0,1-15 v/v) hindistancevizi yağı ilave ettikleri deneyde lipaz aktivitesinde büyük bir değişiklik olmadığını ancak en yüksek aktivitenin % 2.5 (v/v) yağ konsantrasyonunda olduğunu belirtmişlerdir [141].

Mikrobiyal lipazın optimum seviyede üretimi için, lipaz üreten mikroorganizmanın büyümesini ve dolayısıyla fermantasyon sürecini düzenleyen bir azot kaynağı da gereklidir. Bu yüzden besiyerindeki yağ kaynağının lipaz üretimine etkisi araştırılmıştır. Besiyerine eklenen azot kaynakları arasında *A. veronii* EK-2 izolatından lipaz üretimini en çok arttıran azot kaynağının jelatin (10,33 U/ml) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sırasıyla pepton ve maya ekstraktının besiyerindeki varlığının da lipaz üretimini indüklediği görülmüştür. EK-2 izolatının en düşük aktivite gösterdiği azot kaynağı ise et

ekstraktı (5,84 U/ml) olmuştur.

Bu çalışmadaki lipaz üretimi için optimum azot kaynağı, aynı cinsten başka bir bakteri tarafından lipaz üretimiyle ilgili diğer araştırmacıların bulguları ile uyumludur. Kamaladevi ve çalışma arkadaşları 2014 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada *A. veronii* lipazı için optimum azot kaynağının jelatin olduğunu rapor etmiştir [55]. Fatima ve arkadaşlarının 2015 yılında *P. putida*'dan lipaz üretimini optimize ettikleri çalışmada, en yüksek lipaz üretiminin pepton ve maya ekstraktı ile elde edildiği belirtilmiştir [39].

Besiyerindeki inorganik azot kaynağının lipaz üretimine etkisi araştırılmıştır. İnorganik azot kaynaklarından amonyum sülfat (18,99 U/ml) ve amonyum klorürün (17,8 U/ml) besiyerine ilavesi *A. veronii* EK-2 izolatından lipaz üretimini arttırırken amonyum karbonat (0,05 U/ml) ve amonyum oksalatın (0,59 U/ml) besiyerine ilavesi lipaz üretimini olumsuz etkilemiştir. Amonyum sülfat ve amonyum klorürle daha yüksek enzim aktivitesi elde edilmesi, inorganik azot takviyesinin daha hızlı asimilasyonu ile ilişkilendirilmektedir [141].

Literatürde birkaç inorganik azot kaynağı haricindeki inorganik azot bileşiklerinin lipaz sentezini indükleyemedikleri belirtilmiştir [39, 48]. Bisht ve arkadaşlarının 2012 yılında *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada amonyum sülfat hariç tüm inorganik azot kaynaklarının lipaz üretimini azalttığı rapor edilmiştir [48]. Bu çalışmayla benzer şekilde, Das ve arkadaşları 2017 yılında *Aspergillus tamarii* JGIF06'dan lipaz üretimini indükleyen azot kaynaklarının amonyum klorür ve amonyum sülfat olduğunu belirtmişlerdir [141].

Lipaz üretim besiyerinin başlangıç pH'sı 7 (20,18 U/ml) olduğunda *A. veronii* EK-2'den lipaz üretiminin maksimum seviyede olduğu gözlenmiştir. Ayrıca pH 8 (11,73 U/ml) ve 9 (5,85 U/ml) değerlerindeki başlangıç besiyerinde de enzim üretimi görülmüştür. Lipaz üretim besiyerinin başlangıç pH'sı pH 4, 5, 6 ve 10 olduğunda ise kayda değer bir lipaz aktivitesi ölçülemediği görülmüştür.

Mikroorganizmaların çoğu, 5-8,5 arasındaki pH aralığında hayatta kalır ve genelde nötr pH'da maksimum büyüme oranları gösterirler. *Aeromonas* sp. de büyüme ve lipaz salgılanması nötr ila alkalın pH'ta en yüksektir [66]. pH, bir enzimin biyolojik aktivitesi

için gereken üç boyutlu yapısını koruyarak enzim stabilitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Enzimler, fermentasyon sırasında belli pH aralığında metabolik olarak aktif kalır [142]. Bu çalışmada mikroorganizmanın gelişmesi için ideal olan pH değerinde, lipaz üretiminin de maksimum seviyede olduğu görülmektedir. Bu çalışmayla benzer şekilde, Veerapagu ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada *P. gessardi*'den maksimum lipaz üretiminin pH 7.0'de olduğu rapor edilmiştir [139].

Fermentasyon parametrelerinin optimizasyonu sonuçlarına göre lipaz üretim besiyerinde yağ kaynağı olarak hindistan cevizi yağı (% 1) azot kaynağı olarak jelatin (% 0,2 w/v), inorganik azot kaynağı olarak (NH₄)₂SO₄ (% 0,5) kullanılmış ve besiyeri pH'sı 7 olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca örneklerin bu besiyerindeki inkübasyon sıcaklığı 30 °C, inkübasyon süresi ise 18 saat olarak belirlenmiştir.

Optimum fermentasyon koşullarında *A. veronii* EK-2 izolatından lipaz üretimi sağlanmış ve *A. veronii* EK-2 lipazı santrifüj, diyaliz ve ultrafiltrasyon yöntemleriyle kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamaklarındaki toplam ve spesifik aktivite belirlenmiştir. Kısmi saflaştırmanın son aşaması olan ultrafiltrasyonda elde edilen enzim solüsyonunun toplam aktivitesinin (39,47 U/ml) ve spesifik aktivitesinin (912 U/mg) daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ultrafiltrasyon aşamasında enzim daha yoğun elde edildiği için, toplam ve spesifik aktivitenin de daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise lipazın karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. EK-2'den kısmi saflaştırılmış lipazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık, pH, tampon ve substrat konsantrasyonu araştırılarak enzimin karakterizasyonu yapılmıştır.

A. veronii EK-2 lipazının optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 40 °C (45,05 U/ml) olarak belirlenmiştir. *A. veronii* EK-2 lipazının en düşük aktivite gösterdiği sıcaklık ise 10 °C (6,37 U/ml) olarak belirlenmiştir. Ayrıca lipazın 10-70 °C arasında aktivite gösterdiği, 20-60 °C arasında ise aktivitesini %80 oranında koruduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmadaki *A. veronii* EK-2 lipaz aktivitesi için optimum sıcaklık aralığı, diğer araştırmacılar tarafından elde edilen farklı bakteriler tarafından üretilen lipazların

aktivitesi için optimum sıcaklık bulguları ile de uyumludur. Kasana ve arkadaşları *Acinetobacter* sp. lipazı ile yaptıkları çalışmada lipaz aktivitesi için optimum sıcaklığının 40 °C olduğunu rapor etmişlerdir [143]. Saengsanga ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA lipazının optimum 40 °C’de aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [144]. Neelambari ve arkadaşları 2011 yılındaki çalışmalarında *A. hydrophila* lipazının optimum çalışma sıcaklığını 37 °C (12,03 U/ml) olarak belirlemişlerdir [65]. Charoenpanich ve arkadaşları 2011 yılındaki çalışmalarında *Aeromonas* sp. EBB-1 izolatından salgılanan lipazın, optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 37 °C olduğunu bildirmişlerdir [66].

A. veronii EK-2 lipazının optimum aktiviteyi gösterdiği tampon pH değeri pH 2-12 değerleri için araştırılmış ve enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği değerler pH:8 (45,17 U/ml) pH:10 (44,17 U/ml) olmuştur. Enzimin en düşük aktiviteyi gösterdiği değer pH:4 (3,02 U/ml) olarak tespit edilmiştir. pH2 ve pH:12 değerlerinde ise aktivite saptanamamıştır. Buna ek olarak lipazın alkali pH değerlerinde aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Yüksek derecede asidik pH’ta lipaz aktivitesinin olmayışının, enzimin aktif bölgesinde koordine edici rolü olan Ca^{2+} iyonlarının kaybına bağlı olabileceği düşünülmüştür [66].

A. veronii EK-2 lipazının alkali pH’da optimum aktivite göstermesi taranan literatürdeki diğer çalışmalarla da uyumludur. Neelambari ve arkadaşları 2011 yılındaki çalışmalarında *Aeromonas hydrophila* lipazının alkali pH değerlerinde (pH:8-10) daha yüksek stabilite gösterdiğini rapor etmişlerdir [65]. Charoenpanich ve arkadaşları 2011 yılındaki çalışmalarında *Aeromonas* sp. EBB-1 izolatından salgılanan lipazın, pH 8’de pNPP’ye karşı maksimum hidrolitik aktivite sergilediğini bildirmişlerdir [66]. Kasana ve arkadaşları *Acinetobacter* sp. lipazı ile yaptıkları çalışmada lipazın optimum pH’sının 8 olduğunu bildirmişlerdir [143]. Gupta ve arkadaşları tarafından yapılan tüm bakteriyel lipazların kapsamlı derlemesinde birçok durumda lipazların 7’den yüksek pH değerlerinde maksimum aktivitesinin gözlemlendiğini belirtilmiştir [145]. Javed ve arkadaşlarının yakın zamanda yaptıkları kapsamlı derlemede ise son zamanlarda çalışılmış 27-bakteriyel lipazın fizyokimyasal özellikleri incelenmiş ve *Pseudomonas gessardii*, *Spirulina platensis* ve *Bacillus pumilus* RK31’den elde edilen lipazların, asidik pH’da en iyi şekilde çalışırken, diğer 24 bakteriyel lipazın alkali pH’da çalıştığı

rapor edilmiştir [7].

Tampon konsantrasyonunun *A. veronii* EK-2 lipaz aktivitesine etkisi incelendiğinde, lipazın geniş bir tampon konsantrasyonu aralığında aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. *A. veronii* EK-2 lipazının en yüksek aktiviteyi gösterdiği tampon konsantrasyonu 50 mM pH 8,0 Tris-HCl (56,35 U/ml), en düşük aktiviteyi gösterdiği tampon konsantrasyonu ise 200 mM pH 8,0 Tris-HCl (37,13 U/ml) olarak tespit edilmiştir. Taranan literetürde tampon konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır, bu çalışmada tampon konsantrasyonu ve lipaz aktivitesi ilişkisi ilk kez incelenmiştir. *A. veronii* EK-2 lipazının geniş tampon konsantrasyonunda aktivitesini korumasının endüstriyel çalışmalarda tercih edilen bir özellik olduğu düşünülmektedir.

Substrat konsantrasyonunun *A. veronii* EK-2 lipazı aktivitesine etkisi incelendiğinde 3,375 mg/ml (7,88 U/ml) olarak hazırlanan pNPP substrat çözeltisinin enzimin en düşük aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonu olurken 27 mg/ml (48,6 U/ml) olarak hazırlanan pNPP substrat çözeltisinin enzimin en yüksek aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonu olduğu görülmüştür. Bu değerden daha yüksek konsantrasyonda hazırlanan substrat konsantrasyonu ile gerçekleşen reaksiyonlarda ise enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda substrat içeren çözeltilerde substratın yeterince çözünemesinden dolayı enzim aktivitesinin düştüğü düşünülmektedir. Sethi ve arkadaşları 2015 yılında *Aspergillus terreus* lipazı ile yaptıkları çalışmada, lipazın optimum aktivite gösterdiği substrat konsantrasyonunu araştırmış ve optimum substrat konsantrasyonunu % 1,5 olarak rapor etmişlerdir [67].

Enzim karakterizasyon çalışmaları sonucunda, *A. veronii* EK-2 lipazının optimum çalışma sıcaklığı 40 °C, pH'sı 8, tampon konsantrasyonu 50 mM Tris-HCl ve substrat konsantrasyonu 3,375 mg/ml pNPP olarak belirlenmiştir.

Mikrobiyal lipit içeriğinin ölçülmesinde spv testinden yararlanılmıştır. Bakterilerdeki toplam lipit içeriğinin ölçümünde hızlı sonuç vermesi, hassas sonuç vermesi ve uygulama kolaylığından dolayı spv testi kullanılmaktadır [146]. *A. veronii* EK-2 izolatındaki lipit miktarı spv testi ile araştırılmış ve izolatın 1 ml'sinde 26,08 µg lipit olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada yağ ile kontamine alanlardan izole edilen mikroorganizmaların lipolitik aktivitesi kalitatif ve kantitatif metotlarla araştırılmış ve aktivitesi yüksek olan türlerin 16s rRNA gen bölgesi sekanslanarak bu türler *Aeromonas veronii* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan izolatlardan EK-2 seçilerek, bu izolattan en yüksek enzim üretiminin gerçekleştiği koşullar araştırılmış ve lipaz üretiminin artırılması için inkübasyon süresi ve sıcaklığı, besiyeri pH'sı, inorganik ve organik azot kaynağı, karbon kaynağı gibi farklı fermantasyon parametreleri optimize edilmiştir. Uygun fermantasyon koşullarında üretilen lipazın diyaliz ve ultrafiltrasyonla kısmi saflaştırılması yapılmış ve kısmi saflaştırılmış enzimin karakterizasyonu yapılarak enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık, tampon pH'sı ve konsantrasyonu ile substrat konsantrasyonu belirlenmiştir.

Bu çalışmayla ilk kez *A. veronii* lipazının optimizasyon ve karakterizasyon çalışması detaylı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Taranan literatürde *A. veronii* lipazıyla ilgili bu kadar farklı parametrenin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma besiyeri bileşenleri ve inkübasyon koşullarının değiştirilmesiyle *A. veronii* EK-2 izolatından lipaz üretiminin arttığını, *A. veronii* EK-2 lipazı için optimum çalışma koşulları sağlandığında ise enzimin aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, *A. veronii* EK-2 izolatının lipaz üretimi için potansiyel olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir. Göreceli olarak yüksek sıcaklık ve pH optiması, belirgin termal stabilitesi ve aynı zamanda geniş bir pH aralığında aktivitenin korunması nedeniyle, *Aeromonas veronii* EK-2 izolatından saflaştırılmış hücre dışı lipazın, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

Fizyokimyasal olarak *Aeromonas veronii* EK-2 lipazına benzer özelliklere sahip lipazların biyodizel uygulamalarında kullanıldığı çalışmalar son zamanlarda sıklıkla rapor edilmiştir. Kumari ve Gupta 2012 yılında *Trichosporon asahii* MSR 54 lipazının hindistancevizi yağını % 87,6 oranda biyodizele çevirdiğini rapor etmişlerdir [147]. Li ve Yan 2010 yılında *Pseudomonas cepacia* lipazının *Sapium sebiferum* yağını % 96,22 oranında biyodizele çevirdiğini belirtmişlerdir [92]. Lan ve Hoa 2015 yılında *Candida rugosa* ve *Porcine pancreas* lipazlarının hindistancevizi yağını % 62,55 ve % 59,72 oranında biyodizele çevirdiğini tespit etmişlerdir [148]. Biyodizel üretimi esas olarak

kimyasal katalizör kullanılarak yapılmaktadır fakat kimyasal katalizin düşük verimi ve tepkimede yan ürün olarak oluşan gliserolün geri kazanılamaması gibi dezavantajlarından dolayı, enzimatik transesterifikasyon biyodizel üretiminde tercih edilen bir yoldur [133]. Tüm bunlar göz önüne alındığında *Aeromonas veronii* EK-2 lipazının biyodizel üretiminde kullanılabileceği öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Castro-Ochoa, L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Oliart Ros R., “Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11.”, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 648-654, 2005.
2. Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., “Industrial applications of microbial lipases.”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (2), 235-251, 2006.
3. Ray, A., “Application of lipase in industry”, *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, 2, 33-37, 2012.
4. Sharma, S., S., Kanwar, S. S., “Organic solvent tolerant lipases and applications.”, *The Scientific World Journal*, 2014, Article ID 625258, 15, 2014.
5. Singh, A. K., Mukhopadhyay, M., “Overview of fungal lipase: a review.”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 486-520, 2012.
6. Abada, E. A. E. M., “Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1.”, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (8), 1100-1106, 2008.
7. Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., Nadeem, H., “Bacterial lipases: A review on purification and characterization”, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23-34, 2018.
8. Navvabi, A., Razzaghi, M., Fernandes, P., Karami, L., Homaei, A., “Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications”, *Process Biochemistry*, 70, 61-70, 2018.
9. Vakhlu, J., Kour, A., “Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning.”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 69–85, 2006.
10. Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S. H., “Optimizing lipases and related enzymes for efficient application.”, *Trends in Biotechnology*, 20 (10), 433–

437, 2002.

11. Cannamela, S., Sassi, H., “Lipase : Functions, Synthesis & Role in Disease.”, *Nova Science Publishers*, New York, 27, 2012.

12. Konarzycka-Bessler, M., Jaeger, K. E., “Select the best: novel biocatalysts for industrial applications.”, *Trends in Biotechnology*, 24 (6), 248–250, 2006.

13. Jaeger, K. E., Eggert, T., “Lipases for biotechnology.”, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 390-397, 2002.

14. Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A., Wiwat, C. “Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*.”, *Journal of Invertebrate Pathology*, 105 (3), 228–235, 2010.

15. Petersen, S. B., F. Drablos, “A sequence analysis of lipases, esterases and related proteins.”, *Lipases their structure, biochemistry and application*, Woolley, P., Petersen S.B., *Cambridge University Press*, Cambridge, s. 23-48, 1994.

16. Eijkmann C., “Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen.”, *Zentralbl. Bakt. Parasitenkd. Infektionskr.*, 29, 841-848, 1901.

17. Messaoudi, A., Belguith, H., Gram, I., Ben Hamida, J., “Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis.”, *African Journal of Biotechnology*, 9, 8243-8247, 2010.

18. Yaacob, N., Mohamad Ali M.S., Salleh A.B., Rahman R.N.Z.R.A., Leow A.T.C., “Toluene promotes lid 2 interfacial activation of cold active solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain AMS8”, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 68, 224–235, 2016.

19. Zhou, W., Lou, L., Qu, H., Yu, W., Wang, B., Ouyang, L., Liu, S., “Covalently Immobilized Lipase on a Thermoresponsive Polymer with an Upper Critical Solution Temperature as an Efficient and Recyclable Asymmetric Catalyst in Aqueous Media”, *ChemCatChem.*, 10(5), 1166–1172, 2017.

20. Guncheva, M., Zhiryakova, D., “Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases.”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68 (1), 1–21, 2011.
21. Mukherjee, A., “Hydrophobic-hydrophilic interaction in lipase catalytic triad and possibility of a cofactor mediated catalysis.”, *International Journal of Agricultural and Food Science*, 4 (3), 84-89, 2014.
22. Nthangeni, M. B., Patterton, H., Van Tonder, A., Vergeer, W. P., Litthauer, D., “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, 2001.
23. Jaeger, K. E., Reetz, M. T., “Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.”, *Trends in Biotechnology*, 16 (9), 396-403, 1998.
24. Mala, J. G. S., Takeuchi, S., “Understanding structural features of microbial lipases--an overview.”, *Analytical Chemistry Insights*, 3, 9-19, 2008.
25. Lai, O. M., Lee, Y. Y., Phuah, E. T., Akoh, C. C., “Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications”, *Encyclopedia of Food Chemistry*, Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P., *Academic Press*, s. 158-167, 2019.
26. Ribeiro, B. D., Castro, A. M. D., Coelho, M. A. Z., Freire, D. M. G., “Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production.”, *Enzyme research*, 2011, 2011.
27. Salle, A. D, Calarco, A., Petillo, O., Margarucci, S., Apolito, M. D., “ A Review on Extremozymes Biocatalysis: A Green Industrial Approach for Biomaterials Production.”, *Journal of Biomolecular Research and Therapeutics*, 4 (1), 121, 2015.
28. Olempska-Bier Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., DiNovi M. J., “Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review.”, *Regulatory toxicology and pharmacology*, 144-158, 2006.
29. Madan, B., Mishra, P., “Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas*

aeruginosa to a functional lipase in *Escherichia coli*.”, *Applied Microbiology Biotechnology*, 85 (3), 597-604, 2010.

30. Kebabcı, Ö., “Farklı maya kültürlerinden lipaz üretimi ve verim artırımı”, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.13, Ankara, 2010.

31. Gog, A., Roman, M., Tosa, M., Paizs, C., Irime, F.D., “Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives.”, *Renewable Energy*, 39, 10–16, 2012.

32. Lee, S.H., Park, D.H., “Isolation and physiological characterization of *Bacillus clausii* SKAL-16 isolated from wastewater.”, *Journal of microbiology and biotechnology*, 18 (12), 1908-1914, 2008.

33. Ertugrul, S., Donmez, G., Takac, S., “Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity.”, *Journal of Hazardous Materials*, 149 (3), 720-724, 2007.

34. Boekema, B. K., Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., Rosenau, F. Jaeger, K. E., Tommassen, J., “Hexadecane and tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms.”, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (12), 3838-3844, 2007.

35. Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S., van Dijl J. M., “Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome.”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3), 515-547, 2000.

36. Angkawidjaja, C., Kanaya, S., “Family I.3 lipase: Bacterial lipases secreted by the type I secretion system.”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63 (23), 2804-2817, 2006.

37. Buist, G., Ridder, A. N. J. A., Kok, J., Kuipers, O. P., “Different subcellular locations of secretome components of Gram-positive bacteria.”, *Microbiology*, 152, 2867-2874, 2006.

38. Silva, W. O. B., Mitidieri, S., Schrank, A. Vainstein, M. H., “Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.”, *Process Biochemistry*, 40 (1), 321- 326, 2005.
39. Fatima, H., Khan, N., Rehman, A. U., “Production and Partial Characterization of Lipase from *Pseudomonas putida*”, *Fermentation Technology*, 4, 1–7, 2015.
40. Brígida, A. I. S., Amaral, P. F. F., Coelho, M. A. Z., Gonçalves, L. R. B., “Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrialbiocatalyst”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 148–158, 2014.
41. Fickers, P., Destain, J., Thonart, P., “Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*”, *Biotechnology Letters*, 27 (22), 1751–1754, 2005.
42. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., “Production, purification, characterization, and applications of lipases”, *Biotechnology Advances*, 19 (8), 627–662, 2001.
43. Ali, C. H., Zhang, J. J., Mbadanga, S. M., Liu, J. F., Yang, S. Z., Gu, J. D., Mu, B. Z., “Screening, isolation and optimization of an extracellular lipase producing *Exiguobacterium* sp. BBXS-7 segregated from waste cooking oil contaminated sites.”, *Wulfenia*, 22 (5), 183-201, 2015.
44. Rathi, P., Goswami, V. K., Sahai, V., Gupta, R., “Response surface methodology for improving production of hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia*.”, *Journal of Applied Microbiology*, 93, 930–936, 2002.
45. Pogaku, P., Suresh, A., Srinivaslu, P., Reddy S. A., “Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12.”, *African Journal of Biotechnology*, 9, 882-886, 2010.
46. Tembhurkar, V. R., Kulkarni, M. B., Peshwe, S. A., “Optimization of Lipase Production by *Pseudomonas* spp. in submerged batch process in shake flask culture”, *Sciencce Research Report*, 2 (1), 46–50, 2012.

47. Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M., Di Luccio, M., Oliveira, J. V., “A review on microbial lipases production”, *Food Bioprocess Technology*, 3, 182–196, 2010.
48. Bisht, D., Yadav, S. K., Darmwal, N. S., “Enhanced production of extracellular alkaline lipase by an improved strain of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10,055.”, *American Journal of Applied sciences*, 9, 158-167, 2012.
49. Ghanem, E. H., Al-Sayeed, H. A., Saleh, K. M., “An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*.”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 459 –464, 2000.
50. Khyami-Horani H., “Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase.”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 399–401, 1996.
51. Lanser, A. C., Manthey, L. K., Hou, C. T., “Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein.”, *Current Microbiology*, 44 (5), 336 – 340, 2002.
52. Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A., “Use of continuous culture to screen for lipase-producing microorganisms and interesterification of butterfat by lipase isolates.”, *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 446–452, 1996.
53. Oh, B., Kim, H., Lee, J., Kang, S., Oh, T., “*Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning.”, *FEMS Microbiology Letters*, 179 (2), 385–392, 1999.
54. Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Jolly, R. S., Gupta, L. K., Gupta, J. K., “Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis.”, *Indian Journal of Microbiology*, 42, 49–54, 2002b.
55. Kamaladevi, B., Prabhavathi, P., Sankareswaran, M., Anbalagan, S., Radhakrishnan, N., Prabhu, D., “Screening and Medium Optimization of Lipase Producing Bacteria from Saltpan.”, *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 72-77, 2014.
56. Janssen, P. H., Monk, C. R., Morgan, H. W., “A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp.,

and continuous assay of its p-nitro- phenyl-palmitate esterase activity.”, *FEMS Microbiology Letters*, 120, 195–200, 1994.

57. Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Liu, Z., Li, J., “Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes.”, *Annals of Microbiology*, 57, 495–501, 2007.

58. Antranikian, G., “Industrial relevance of thermophiles and their enzymes.”, *Thermophiles: biology and technology at high temperatures*, Robb, F., Antranikian, G., Grogan, D., Driessen, A., *CRC Press*, Boca Raton, s. 113–60, 2008.

59. Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T., “Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon.”, *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (39), 25–31, 2002.

60. Ikeda, M., Clark, D. S., “Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*.”, *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 624–629, 1998.

61. Royter, M., Schmidt, M., Elend, C., Höbenreich, H., Schäfer, T., Bornscheuer, U., “Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. tengcongensis.”, *Extremophiles*, 13 (5), 769–783, 2009.

62. Petersen, M. T. N., Fojan, P., Petersen, S. B., “How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution.”, *Journal of Biotechnology*, 85, 115–147, 2001.

63. Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T., Petersen, S. B., “What distinguishes esterases from lipases: A novel structural approach.”, *Biochimie*, 82 (11), 1033-1041, 2000.

64. Horton, R. H., Moran, A. M., Ochs, R. S., Rawn, JD, Scrimgeour, K. G., “Principles of Biochemistry, 2nd ed.”, *Prentice Hall, Inc.*, s. 154-155, USA, 1996.

65. Neelambari, V., Vasanthabharathi, V., Balasubramanian, R., Jayalakshmi, S.,

“Lipase from Marine *Aeromonas hydrophila*.”, *Research Journal of Microbiology*, 6, 658-668, 2011.

66. Charoenpanich, J., Suktanarag, S., Toobbucha, N., “Production of a thermostable lipase by *Aeromonas* sp EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand.”, *Journal of the Science Society of Thailand*, 37, 105-114, 2011.

67. Sethi, B. K., Nanda, P. K., Sahoo, S., “Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10.”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 143–149, 2016.

68. Lee, H. K., Ahn, M. J., Kwak, S. H., Song, W. H., Jeong, B. C., “Purification and characterization of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas* sp. LPB 4.”, *The journal of Microbiology*, 41 (1), 22–27, 2003.

69. Santarossa, G., Lafranconi, P. G., Alquati, C., DeGioia, L., Algerghina, L., Fantucci, P., “Mutations in the “lid” region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragi* lipase.” *FEBS Letters*, 579, 2005.

70. Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Cabrera, Z., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., “Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium.”, *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 2007.

71. Vulfson, E. N., “Industrial applications of lipases.”, Lipases—their structure, biochemistry and applications., Woolley, P., Peterson, S. B., *Cambridge Univ. Press*, Cambridge, s. 271–288, 1994.

72. Dublin Business Wire and Research and Markets, “Lipase market by source, application and by geography—global forecast to brochure research and markets 2020,” TheWorld’s Largest Market, <http://www.researchandmarkets.com/reports/3388717>, Research Store, 2015.

73. Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha, A., “Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview.”, *Research Journal of Microbiology*, 6, 1-24, 2011.

74. Guerrand, D., “Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries.”, *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 24 (4), 403, 2017.
75. Borgstrom, B., Brockman, H. L., “Lipases”, *Elsevier*, s. 83-150, Amsterdam, 1984.
76. Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S., “Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction.”, *Process Biochemistry*, 36, 933–939, 2001.
77. Coleman, M. H., Macrae, A. R., UK Patent No. 1 577 933, 1980.
78. Carvalho, A. C., Fonseca, T. S., Mattos, M. C., Oliveira, M. C., Lemos, T. L., Molinari, F., Romano, D., Serra, I., “Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates.”, *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (12), 29682–29716, 2015.
79. Xin, J. Y, Li, S. B, Xu, Y., Chui, J. R., Xia, C. G., “Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor.”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76, 579–585, 2001.
80. Chen, J. C., Tsai, S. W., “Enantioselective synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on Accurel MP1000.”, *Biotechnology Progress*, 16 (6), 986–992, 2000.
81. Berglund, P., Hutt, K., “Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases.”, *Stereoselective biocatalysis*, Patel, R. N., *Marcel Dekker*, New York, s. 633-657, 2000.
82. Franssen, M. C. R., Alessandrini, L., Terraneo, G., “Biocatalytic production of flavors and fragrances.”, *Pure and Applied Chemistry*, 77, 273-279, 2005.
83. Priya, K., Chadha, A., “Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase.”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 885-890, 2003.
84. Chaplin, J.A., Gardiner, N., Mitra, R. K., Parkinson, C. J., Portwig, M., “Process for preparing [-] menthol and similar compounds.”, United States Patent 7026144, <http://www.freepatentsonline.com>, 2006.

85. Athawale, V., Manjrekar, N., Athawale, M., “Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of [±]-menthol.”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, 169-173, 2001.
86. Kiyota, H., Higashi, E., Koike, T., Oritani, T., “Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate.”, *Tetrahedron Asymmetry*, 12, 1035-1038, 2001.
87. Vasudevan, P. T., Briggs, M., “Biodiesel production – current state of the art and challenges.”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 421–430, 2008.
88. Fukuda, H., Kondo, A., Noda, F. H., “Biodiesel fuel production by transesterification of oils”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (5), 405–416, 2001.
89. Chisti, Y., “Biodiesel from microalgae beats bioethanol.”, *Trends in Biotechnology*, 26, 126–131, 2008.
90. Narwal, S. K., Gupta, R., “Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase”, *Biotechnology Letters*, 35 (4), 479-490, 2013.
91. Fjerbaek, L., Christensen, K. V., Norddahl, B., “A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification.”, *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (5), 1298-1315, 2009.
92. Li, Q., Yan, Y., “Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from Sapium sebiferum oil in micro-aqueous phase.”, *Applied Energy*, 87 (10), 3148-3154, 2010.
93. Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T., “The realm of microbial lipases in biotechnology.”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 119-131, 1999.
94. Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S., “Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview.”, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 63-

71, 2003.

95. Guo, J., Chen, C. P., Wang, S. G., Huang, X. J., “A convenient test for lipase activity in aqueous-based solutions.”, *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 8-12, 2015.

96. Camacho-Ruiz, M. L., Mateos-Díaz, J. C., Carrière, F., Rodriguez, J. A., “A broad pH range indicator-based spectrophotometric assay for true lipases using tributyrin and tricaprylin”, *The Journal of Lipid Research*, 56 (5), 1057-1067, 2015.

97. Cardenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez M. S., Sanchez-Montero, J. M., Valmaseda, M., Elson, S. W., Sinisterra, J. V., “Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases.”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 14 (4-6), 111–123, 2001.

98. Sierra, G., “A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates.”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 23, 15–22, 1957.

99. Singh, R., Gupta, N., Goswami, V. K., Gupta, R., “A simple activity staining protocol for lipases and esterases.”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 679-682, 2006.

100. Wang, Y., Srivastava, K. C., Shen, G. J., Wang, H. Y., “Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841).”, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 433–438, 1995.

101. Pencreac’h, G., Baratti, J. C., “Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media.”, *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 417-422, 1996.

102. Winkler, U. K., Stuckman, M., “Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*”, *Journal of Bacteriology*, 138, 663–679, 1979.

103. Silva, A. L. P., Nascimento, R. G., Arakaki, L. N. H., Arakaki, T., Espínola, J. G. P., Fonseca, M. G., “Organofunctionalized silica gel as a support for lipase”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 376, 139-144, 2013.
104. Gupta, N., Rathi, P., Gupta, R., “Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases”, *Analytical Biochemistry*, 311 (1), 98-99, 2003.
105. Barbosa, J. M. P., Souza, R. L., Melo, C. M. D., Fricks, A. T., Soares, C. M. F., Lima, Á. S., “Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *Bacillus* sp. ITP-001.”, *Química Nova*, 35 (6), 1173-1178, 2012.
106. Quyen, D.T., Schmidt-Dannert, V., Schmid, R.D., “High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase.”, *Protein Expression and Purification*, 28, 102-110, 2003.
107. Khosla, K., Rathour, R., Maurya, R., Maheshwari, N., Gnansounou, E., Larroche, C., Thakur, I. S., “Biodiesel production from lipid of carbon dioxide sequestering bacterium and lipase of psychrotolerant *Pseudomonas* sp. ISTPL3 immobilized on biochar.”, *Bioresource Technology*, 245, 743–750, 2017.
108. Tan, C. H., Show, P. L., Ooi, C. W., Ng, E. P., Lan, J. C.W., Ling, T.C., “Novel lipase purification methods - a review of the latest developments”, *Biotechnology Journal*, 10, 31–44, 2015.
109. Igbinosa, I. H., Igumbor, E. U., Aghdasi, F., Tom, M., Okoh, A. I., “Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health.”, *The Scientific World Journal*, 2012.
110. Sandilya, S., Dutta, P., Bhuyan, P. M., Debnath, R., Changmai, A., Kartik, N., Gogoi, D., “*Aeromonas caviae* CSB04, a causal organism of bacterial flacherie in muga silkworm (*Antheraea assamensis* Helfer)”, *Current science*, 112, 32-34, 2017.
111. Ghenghesh, K. S., Ahmed, S. F., El-Khalek, R. A., Al-Gendy, A., Klena, J., “*Aeromonas* infections in developing countries”, *Journal of Infection in Developing Countries*, 2 (2), 81–98, 2008.

112. Isonhood J. H., Drake, M., “*Aeromonas* species in foods,” *Journal of Food Protection*, 65 (3), 575–582, 2002.
113. Neyts, K., Huys, G., Uyttendaele, M., Swings J., Debevere J., “Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods.”, *Letters in Applied Microbiology*, 31, 359-363, 2000.
114. Villari, P., Crispino, M., Montuori, P., Boccia, S., “Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters,” *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1), 697–701, 2003.
115. Chauret, C., Volk, C., Creason, R., Jarosh, J., Robinson, J., Warnes, C., “Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study”, *Canadian Journal of Microbiology*, 47 (8), 782–786, 2001.
116. El-Taweel, G. E., Shaban, A. M., “Microbiological quality of drinking water at eight water treatment plants,” *International Journal of Environmental Health Research*, 11 (4), 285–290, 2001.
117. O’Ryan, M., Alvarez, Y. C. L., “*Aeromonas* Species”, Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases 4th ed, *Saunders*, USA, s. 830-831, 2012.
118. Chaung, Y.C., Chiou, S.F., Su, J.H., Wu, M.I., Chang, M.C., “Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila*. MCC-2.”, *Microbiology*, 143, 803-812, 1997.
119. Anguita, J., Rodriguez-Aparicio, L. B., Naharro, G., “Purification, gene cloning, amino acid sequencing analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate.”, *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59, 2411–2417.
120. Lotrakul, P., Dharmsthiti, S., “Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal.”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13, 163–166.

121. Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.", *Analytical Biochemistry*, 7 (72), 248-254, 1976.
122. Lane, D. J., "16S/23S rRNA sequencing.", Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., Goodfellow, M., *John Wiley and Sons*, New York, s. 115-175, 1991.
123. Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., Yang, J. W., "Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method.", *Bioresource Technology*, 155, 330–333, 2014.
124. Pliego, J., Mateos, J. C., Rodriguez, J., Valero, F., Baeza, M., Femat, R., Camacho, R., Sandoval, G., Herrera-López, E. J., "Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using *p*-nitrophenyl butyrate", *Sensors Switz.*, 15, 2798-2811, 2015.
125. Ülker, S., Özel, A., Çolak, A., Karaoğlu, Ş. A., "Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil", *Turkish Journal of Biology*, 35, 543-550, 2011.
126. Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di L. M., Oliveira, J. V., "A review on microbial lipases production", *Food Bioprocess Technology*, 3, 182-196, 2010.
127. Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., Moosavi-nejad, Z., "Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110", *Iranian Journal of Microbiology*, 3 (2), 92-98, 2011.
128. Aly, M., Tork, S., Al-Garni, S., Nawar, L., "Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil.", *African journal of microbiology research*, 6 (6), 1125-1137, 2012.
129. Rajan, A. P., "Isolation and characterization of oil degrading bacteria from oil contaminated soils of Vellore district, Tamil Nadu, India.", *Journal of Environmental Science & Engineering*, 52(2), 113-116, 2010.

130. Pallavi, P., Ravikumar, T., Reddy, S. R., “Isolation and characterization of lipase producing bacteria for biodegradation of oil contamination”, *International Journal of Current Research and Academic Review*, 3, 56-66, 2015.
131. Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H., Yan, Y., “A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production.”, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 126, 76-89, 2016.
132. Unni, K. N., Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., Benjamin, S., “*Pseudomonas aeruginosa* strain BUP2, a novel bacterium inhabiting the rumen of Malabari goat, produces an efficient lipase”, *Biologia Bratislava*, 71, 378-387, 2016.
133. Yoo, H. Y., Simkhada, J. R., Cho, S. S., Park, D. H., Kim, S. W., Seong, C. N., Yoo, J. C., “A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production”, *Bioresource Technology*, 102, 6104-6111, 2011.
134. Zheng, X., Chu, X., Zhang, W., Wu, N., Fan, Y., “A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: Gene cloning and characterisation”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 971-980, 2011.
135. Demir, B. S., Tükel, S. S., “Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*”, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 64, 123-128, 2010.
136. Sharma, D., Kumbhar, B. K., Verma, A. K., Tewari, L., “Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus* sp.”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4), 205-211, 2014.
137. Veerapagu, M., Narayanan, S., Ponmurugan, K., Jeya, K. R., “Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil.”, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6, 62-67, 2013.
138. Kulkarni N., Gadre. R. V., “Production and properties of an alkaline ,thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W.”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 344-348, 2002.

139. Kashmiri, A. M., Adnan, A., Butt, W. B., “Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viridae*.”, *African Journal of Biotechnology*, 5 (10), 878- 882, 2006.
140. Massadeh, M. I., Sabra F. M., “Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*”, *African Journal of Biotechnology*, 10(61), 13139-13146, 2011.
141. Das, A., Bhattacharya, S., Shivakumar, S., Shakya, S., Sogane, S. S., “Coconut oil induced production of a surfactant compatible lipase from *Aspergillus tamaris* under submerged fermentation.”, *Journal of Basic Microbiology*, 57, 114-120, 2017.
142. Talley, K., Alexov, E., “On the pH-optimum of activity and stability of proteins.”, *Proteins*, 78 (12), 2699-2706, 2010.
143. Kasana R. C., Kaur B., Yadav S. K., “Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. CR9 and characterization of its alkaline lipase”, *Journal of Basic Microbiology*, 48 (3), 207-212, 2008.
144. Saengsangaa, T., Siripornadulsila, W., Siripornadulsila, S., “Molecular and enzymatic characterization of alkaline lipase from *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA isolated from lipid-rich food waste”, *Enzyme and Microbial Technology*, 82, 23–33, 2016.
145. Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., “Bacterial lipases: an overview of production, purification and biotechnological properties.”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 763-781, 2004.
146. Izard, J., Limberger, R. J., “Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells”, *Journal of Microbiological Methods*, 55 (2), 411-418, 2003.
147. Kumari, A., Gupta, R., “Purification and biochemical characterization of a novel magnesium dependent lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54 and its application in biodiesel production”, *Asian Journal of Biotechnology*, 4 (2), 70-82, 2012.

148. Lan, T. T. B., Hoa, P. N., “Lipase Catalysis for Transesterification Produces Biodiesel Using Coconut Oil as Main Raw Material Source”, *Biological and Chemical Research*, 258-267, 2015.



ÖZGEÇMİŞ

Ezgi KESKİN TALDARI 1990 yılında Antakya’da doğdu. İlköğrenimini Adana’da, orta öğretimini ise 2007 yılında Osmaniye Fen Lisesinde tamamladı. 2007’de kazandığı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (İngilizce) Bölümünden 2013 yılında mezun oldu. 2014 yılında Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Aynı yıl Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. Evli olup halen Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesinde görevine devam etmektedir.

Adres: Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

50300 - Nevşehir

Telefon: 0 384 228 10 00 - 13077

Belgegeçer: 0 384 215 39 48

e-posta : ezgikeskin@nevsehir.edu.tr

