

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***GEOBACILLUS* TÜRLERİNDE TERMOSTABİL LİPAZ ÜRETİMİ**

Melih KOÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Geobacillus Türlerinde Termostabil Lipaz Üretimi

Melih KOÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Yürütülen bu çalışmada, Türkiye'den izole edilen 32 adet izolat ile 13 adet standart suşun termostabil lipaz üretimleri incelenmiştir. 45 bakteri içerisinde termostabil lipaz enzimi üretenler, fenol kırmızısı içeren tribütirinli ve zeytinyağlı katı besiyerileri kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan tarama deneyleri sonucunda, 11 adet izolat ve 7 adet standart suş olmak üzere toplam 18 bakterinin termostabil lipaz ürettiği kalitatif olarak saptanmıştır. Seçilen bu 18 adet bakterinin lipaz üretim miktarları kantitatif olarak belirlenirken, bakteriler zeytinyağının ve tribütirinin substrat olarak kullanıldığı iki farklı enzim üretim besiyerinde 24, 48 ve 72 saat, pH 7.0'de ve 60°C'de geliştirilmişlerdir. Aynı süreler içerisinde kültürlerin absorbans değerleri, enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan kültürlerin yaş ağırlıkları ve besiyeri pH değerlerinde meydana gelen değişimler de ölçülmüştür. Aktivite tayininde substrat olarak paranitrofenol bütirat kullanılmış olup, enzim aktivitesi 50 mM'lık, pH 7.0'lik fosfat tamponunda, 60°C'de gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak zeytinyağının kullanıldığı besiyerlerinde izolatlar 0.008-0.052 U/ml arasında, tribütirinin substrat olarak kullanıldığı besiyerlerinde ise 0.002-0.019 U/ml arasında lipaz aktivitesi göstermişlerdir. İzolatların ve standartların lipaz üretim miktarlarını kıyaslamak amacıyla, ölçülen enzim miktarı, her bir kültürün yaş ağırlığına bölünerek, hücre başına düşen enzim miktarı U/mg cinsinden hesaplanıp, bir dizin oluşturulmuştur. Yapılan bu sıralamaya göre en yüksek termostabil lipaz aktivitesi zeytinyağlı besiyerinde, *Geobacillus termodenitrificans subsp. calidus* F84a(0.009 U/mg) ve F84b (0.008 U/mg) izolatları ile *Geobacillus termodenitrificans* DSM 465^T standart suşu tarafından üretildiği belirlenmiştir. Ayrıca *Geobacillus stearothermophilus* A113 izolatının tribütirinli besiyerinde en yüksek lipaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak taranan termofilik izolatların bazılarının, standart lipaz üreticisi termofilik suşlardan daha yüksek miktarda lipaz ürettikleri saptanmış ve biyoteknolojik olarak lipaz üreticisi olabilecek aday izolatlar belirlenmiştir.

Ocak 2013. 74 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Geobacillus*, termostabil lipaz, zeytinyağı, tribütrin

ABSTRACT

Master's Thesis

Thermostable lipase production by *Geobacillus* Species

Melih KOC

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Arzu COLERI CIHAN

In this study, thermostable lipase production of 32 isolates and 13 standard strains were investigated all of which were isolated from Turkey. Among the 45 bacteria, those producing lipase enzyme are determined by using solid media containing tributyrin with phenol red and olive oil. The qualitative enzyme screening experiments revealed that totally 18 bacteria including the 11 isolates and 7 standard strains, produced lipase. When determining the level of lipase production of these 18 bacteria quantitatively, they were incubated at pH 7.0 and 60°C in the media containing olive oil and tributyrin as substrate during 24, 48 and 72 hours. Over these time-spans the changes in the absorbance values of the cultures as well as the wet weights of the cultures and the pH values of the media were also monitored. In the lipase activity assay, para-nitrophenol butyrate (pNPB) is used as substrate and the enzymatic reaction was carried out in 50 mm phosphate buffer at pH 7.0 and 60°C. In the media containing olive oil as substrate, the lipase activities of the isolates were between 0.008 U/ml and 0.052 U/ml, whereas a lipase production level between 0.002 U/ml and 0.019 U/ml were obtained in the media supplemented with tributyrin as substrate. In order to compare the lipase production capacities of the isolates and the standards, an index for enzyme level per cell weight (U/mg) was used by dividing the measured enzyme level to the wet weight of the cultures. In the ranking, the maximum thermostable lipase activity level was achieved by the isolates *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* F84a (0.009 U/mg) and F84b (0.008 U/mg) and by the standard strain of *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465^T with in the media containing olive oil. It was also observed that *Geobacillus stearothermophilus* A113 had the maximum lipase activity in the media containing tributyrin. In conclusion, it was pointed out that some of the thermophilic isolates under investigation produce lipase at a higher rate in comparison to the standard lipase producing strains. In this study some lipase producing isolates potentially of importance for biotechnology were also determined.

January 2013, 74 pages

Key Words: *Geobacillus*, thermostable lipase, olive oil, tributyrin

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, başından sonuna kadar bana bütün birikimini açık tutan, zorlandığım her noktada yapıcı müdahaleleriyle doğru yolu gösteren, pes etmeye kalkıştığım her anda ayakta kalmamı sağlayan başta danışmanım Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a ve Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Maddi ve manevi bütün ihtiyaçlarımı hiç esirgmeden karşılayan ve bu çalışmanın tamamlanması için gerekli her türlü desteği sunan aileme çok çok teşekkür ediyorum.

Lisans ve lisansüstü eğitim hayatım boyunca beni yanlarından ayırmayan, her başlıktaki tavsiyeleriyle ufkumu genişleten, maddi ve manevi desteklerini uzak kaldığımız zamanlarda dahi hissettiğim ve acıları ve mutlulukları birbirimizden esirgemediğimiz Ablam Melike ALPAN'a ve Ağabeyim Aytek Soner ALPAN'a beni hiç yalnız bırakmadıkları için teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında bilgi alışverişinde bulunduğum, geç saatlere kadar çalıştığım zamanlarda emek ve zamanlarını bana ayıran, umutsuzlandığım zamanlarda bana destek olan başta Başar KARACA ve Nilgün TEKİN olmak üzere Alperen Tuncer, Barış YAVAŞ ve Yeşim KAPTANBAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım boyunca sıkıldığım, yorulduğum anlarda elimden tutan, iyi ve kötü günlerimde varlıklarıyla her zaman desteklerini hissettiğim Ozan YILDIRIM, Sadi BAŞOĞLU, Burçin KAYALI, Mesut BAYRAM ve Mehmet Ali OLPAK'a çok teşekkür ediyorum.

Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Proje Ofisinin desteklediği 11B4240003 kodlu proje kapsamında gerçekleştirmiş olduğum bu çalışmanın, maddi kaynağını bana sunan Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Proje Ofisine teşekkürlerimi sunuyorum.

Melih KOÇ

Ankara, Ocak 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	3
2.2 Mikrobiyal Enzimler.....	5
2.3 Lipazlar.....	7
2.3.1 Lipazların Yapısı.....	7
2.3.2 Lipaz Enziminin Arayüzey Aktivasyonu	9
2.3.3 Lipaz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	10
2.3.4. Lipaz Enziminin Termostabilitesini Etkileyen Faktörler.....	12
2.3.5 Bakteriyel Lipazların Sınıflandırılması	14
2.4 Lipaz Üreticisi Mikroorganizmalar.....	15
2.4.1 Fungal lipazlar	15
2.4.2 Bakteriyel lipazlar	16
2.5 Lipaz Enziminde Sıcaklık ve pH'ın Aktivite Üzerine Etkisi.....	17
2.6 Metal iyonlarının Lipaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	19
2.7 Lipaz Enziminin Substrat Spesifikliği.....	22
2.8 Lipaz Enziminin Üretim Koşulları.....	23
2.9 Mikrobiyal Lipazlarda Klonlama.....	24
2.10 Lipaz Enziminin Endüstriyel Uygulama Alanları.....	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1 Termofilik Bakteri İzolatları.....	30
3.2 Standart Termofilik Suşlar.....	32

3.3 İzolatların 16S rRNA gen dizilerine göre filogenetik analizleri.....	32
3.4 Termofilik izolat ve standartların lipaz üretimlerinin kalitatif olarak belirlenmesi.....	33
3.5 Kalitatif olarak lipaz aktivitesi gösteren termofilik standart ve izolatlarda hücre dışı lipaz üretimi.....	34
3.6 Kantitatif lipaz aktivite tayini.....	35
3.7 Enzim ünitesinin hesaplanması.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	37
4.1 Termofilik izolatların 16S rRNA gen dizilerinden elde edilen filogenetik analiz sonuçları.....	37
4.2 Termostabil Lipaz Tarama Sonuçları.....	41
4.3 Termostabil Lipaz Aktivite Değerleri.....	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	66
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGELER DİZİNİ

IUBMB	İnternational Union of Biochemistry and Molecular Biology
E.C.	Enzyme Commission
α	Alfa
β	Beta
μM	Mikro molar
%	Yüzde
vd.	ve diğerleri
>	Büyüktür
kDa	Kilo Dalton
Al	Alüminyum
Ba	Bakır
Ca	Kalsiyum
CaCl₂	Kalsiyum klorür
Co	Kobalt
Cu	Bakır
Fe	Demir
Hg	Civa
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
Mo	Molibden
Na	Sodyum
Ni	Nikel
PO₄	Fosfat
U	Ünite
Zn	Çinko
ZnSO₄	Çinko sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Lipaz enziminin iki boyutlu yapısı.....	8
Şekil 2.2 Lipaz ve Esteraz enzimlerinin aktiviteleri.....	10
Şekil 2.3 Triaçilgliserol hidrolizi.....	11
Şekil 2.4 Lipaz reaksiyonlarının şematik olarak gösterilişi.....	12
Şekil 3.1 Deney akış şeması.....	29
Şekil 3.2 Zeytinyağı ve Tribütürinin kimyasal yapısı.....	33
Şekil 4.1 Termofilik izolatlar ile <i>Geobacillus</i> , <i>Aeribacillus</i> , <i>Anoxybacillus</i> ve <i>Bacillus</i> cinsine ait endospor oluşturan temsilci üyelerin <i>16S rRNA gen dizileri</i> temel alınarak oluşturulmuş, evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç.....	39
Şekil 4.2 Termostabil lipaz enzimi üretici bakterilerin zeytinyağlı besiyerinde verdikleri zonlar.....	44
Şekil 4.3 <i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i> (DSM 22628) F84a suşunun zeytin yağı ve tribütürinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi	46
Şekil 4.4 <i>G. thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i> F84b (DSM 22629 ^T) suşunun zeytinyağlı ve tribütürinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi	47
Şekil 4.5 <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T suşunun zeytin yağı ve tribütürinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	48
Şekil 4.6 A353 kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	49
Şekil 4.7 <i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 ^T suşunun zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	50
Şekil 4.8 E173b kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	50

Şekil 4.9 <i>G. stearothermophilus</i> DSM 7953 suşunun zeytin yağı ve tribütirinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	51
Şekil 4.10 <i>G. toebii</i> DSM 14590 ^T suşunun zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	52
Şekil 4.11 <i>G. vulcani</i> DSM 13174 ^T suşunun zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	53
Şekil 4.12 <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223 suşunun zeytin yağı ve tribütirinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	54
Şekil 4.13 A113 kodlu izolatanın zeytin yağı ve tribütirinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	55
Şekil 4.14 <i>G. stearothermophilus</i> DSM 12980 ^T suşunun zeytin yağı ve tribütirinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	56
Şekil 4.15 D413 kodlu izolatanın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	57
Şekil 4.16 D494 kodlu izolatanın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	58
Şekil 4.17 C196 kodlu izolatanın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	58
Şekil 4.18 D195 kodlu izolatanın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	59
Şekil 4.19 D642 kodlu izolatanın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	60
Şekil 4.20 A403 kodlu izolatanın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi.....	60
Şekil 4.21 Termofilik izolatların ve standartların zeytin yağlı besiyerindeki 24, 48, 72 saatlik lipaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/yaş ağırlık) değerlerine göre oluşturulan dizinleri.....	64

Şekil 4.22 Termofilik izolatların ve standartların tribütirinli besiyerindeki 24, 48, 72 saatlik lipaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/ml/yaş ağırlık) değerlerine göre oluşturulan dizinleri.....	65
--	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Enzim araştırmaları için kaynak olabilecek bazı web siteleri.....	4
Çizelge 2.2 Protein stabilitesinde etkili olabilecek bazı faktörler.....	13
Çizelge 2.3 Bazı mikroorganizmaların geliştiği sıcaklık ve pH' lar.....	19
Çizelge 2.4 Metal iyonlarının lipaz aktivitesine etkisi.....	21
Çizelge 2.5 Substrat etkinliği.....	23
Çizelge 2.6 Enzim Üretiminde Kullanılan İnkübasyon Süreleri.....	24
Çizelge 2.7 Yağ ve yağ asitlerinin lipaz üreticisi çeşitli mikroorganizmalardaki etkisi.....	27
Çizelge 2.8 Ticari olarak üretilen lipazlar, firmaları ve üretici mikroorganizmalar.....	28
Çizelge 3.1 Çalışılan izolatların izole edildikleri yer, 16S rRNA geni dizi uzunlukları, ve Genbank aksesyon numaraları.....	30
Çizelge 3.2 Standart termofilik basil suşları ve temin edildiği proje.....	32
Çizelge 4.1 Termofilik izolatların ve referans türlerin 16S rRNA genleri temel alınarak oluşturulmuş filogenetik grupları.....	40
Çizelge 4.2 32 izolat ve 13 standart suşun termostabil lipaz tarama sonuçları.....	42
Çizelge 4.3 İzolat ve standart suşların U/ml/ cinsinden aktivite değerleri.....	61
Çizelge 4.4 Termostabil lipaz aktivitesi U/mg cinsinden değerleri.....	62

1. GİRİŞ

Enzimler, canlıların metabolik aktivitelerinde katalizör görevi görürler. Canlı metabolizmasındaki reaksiyonların büyük bir kısmı, enzimlerin varlığında gerçekleşir. Ondokuzuncu yüzyılda Louis Pasteur, mayaların şekeri alkole dönüştürmesini organizmadaki canlı bir sistemin gerçekleştirdiği sonucuna vardı. Bu etmene ‘ferment’ adını verdi. 1876 yılında Alman fizyolog Wilhelm Kühne ilk kez yunanca olan ‘enzim’ (maya içi) kelimesini kullandı. Bu gelişmelerin ardından enzimlerin hücre dışında da aktivite gösterip göstermedikleri tartışmaları başladı. 1897 yılında Eduard Buchner canlı hücre bulunmayan maya özütünün şekeri fermente etme yeteneğinde olduğunu gösterdi. Bu buluşu ile 1907’de Nobel Kimya Ödülü’nü kazandı. Enzimlerin hücre dışı aktivitelerinin bulunmasının ardından araştırmalar enzim yapısına yoğunlaştı. Enzimlerin protein yapıda oldukları 20. yüzyılın ortalarında keşfedildi.

Özellikle amilaz, proteaz, pektinaz gibi endüstriyel ve biyoteknolojik öneme sahip enzimlerden bir diğeri de, ökaryotik ve prokaryotik organizmaların lipid metabolizmasının önemli bir parçası olan lipaz enzimidir. Günümüzde lipaz enzimi biyoteknolojik uygulamaların da hızla gelişmesi ile beraber hayatımızın birçok alanında kullanılmaktadır. Temizlik endüstrisi, gıda sanayi, sağlık sektörü bunların başlıcalarıdır. Temizlik endüstrisinde yağların parçalanması amacı ile lipaz enzimi sıklıkla kullanılmaktadır. Gıda sanayinde, et ürünlerinin, süt ve süt ürünlerinin yağlarından arındırılması işleminde lipaz enzimi kullanılmaktadır. Sağlık sektöründe sterilizasyon işlemleri için lipaz tercih edilen bir enzimdir. Tekstil endüstrisinde kumaşların absorbansını artırarak boyanma düzeylerini yükseltir. Özellikle esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını katalize etmelerinden dolayı biyopolimer sentezinde ve biyodizel üretiminin önemli enzimlerinden birisidir (Hasan vd. 2006a).

Bunların yanısıra, termofilik mikroorganizmalarca üretilen termostabil enzimler yüksek sıcaklıklarda stabil kalmaları ve aktivite gösterebilmeleri, yüksek sıcaklıkta substratların çözünürlüklerinin artması, ürün oluşumunun artması, yüksek reaksiyon oranı, düşük

viskozite ve düşük kontaminasyon riski gibi faktörlerden kaynaklı olarak endüstriyel açıdan mezofilik homologlarına tercih edilmektedirler (Hasan vd. 2006a).

Endüstriyel enzim pazarında bu denli önemli olan termostabil lipaz enzimi ile ilgili belirtilen tüm bu bilgiler ışığı altında, yürütülen bu çalışmada, laboratuvar kültür koleksiyonumuzda mevcut bulunan mikroorganizmalar arasından, ticari ve biyoteknolojik açıdan lipaz enzim kaynağı olabilecek izolatların enzim aktiviteleri taranmıştır. Bu amaçla, Türkiye'den izole edilen *Geobacillus* cinsi termofilik bakteriler materyal olarak kullanılmış, izolatlarda enzimin hücre dışına salgılanıp salgılanmadığı araştırılmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılması hedeflenen bu izolatların, çeşitli kültür koşullarında geliştirilmesiyle, potansiyel olarak endüstriyel boyutta termostabil lipaz üretimi yapılabileceği düşünülen yüksek miktarda enzim üreticisi suşlar, standart suşlarla karşılaştırılarak belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler katalizledikleri reaksiyonların türüne ve mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar. Substratın ya da reaksiyon adının sonuna –az eki getirilir. Bir enzim genellikle iki isimle anılır. Birisi sistematik adı, diğeri ise geleneksel adı ifade eder (Tsai, 2007).

Enzimler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğine (IUBMB) bağlı Enzim Komisyonu (E.C.) tarafından 4 numarayla tanımlanırlar ve E.C. X.Y.Z.V şeklinde gösterilir. Bu gösterimde, X; 6 büyük sınıftan birini, Y; birinci alt sınıf, Z; ikinci alt sınıf ve V; ise enzim numarasını işaret eden semboller olarak kullanılırlar.

Enzim Komisyonu, enzim sınıflandırılmasını 6 büyük grup altında toplamaktadır (Tsai, 2007).

E.C. 1- Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize ederler.

E.C. 2- Transferazlar: Alıcı ve verici moleküller arasında grup (amino, açil, tek karbon, fosfat, glikozil) transferi yapan enzimlerdir.

E.C. 3- Hidrolazlar: Bir molekülü iki ya da daha fazla sayıda moleküle ayırmak için sulu ortamda gerçekleşen hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler.

E.C. 4- Liyazlar: C-C, C-O, C-S, C-N bağlarının ayrılmasını, hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla katalizlerler.

E.C. 5- İzomerazlar: Bir molekül içerisindeki atomların yeniden düzenlenme reaksiyonlarını katalizlerler.

E.C. 6- Ligazlar: İki molekülün birbirine bağlanma reaksiyonlarını katalizlerler.

Örneğin tez kapsamında çalışılan lipaz enziminin sistematik tanımlaması E.C. 3.1.1.3 (triacilgliserol lipaz) olup, kullanılan rakamlardan sırasıyla '3' altı büyük gruptan üçüncüsü olan hidrolazları, '1' ester bağına etki edenleri, '1' karboksil asit hidrolazları, '3' ise triacilgliserol lipazı ifade etmektedir. Enzim çalışmalarında yararlı olabilecek web siteleri mevcut olup Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1 Enzim araştırmaları için kaynak olabilecek bazı web siteleri (Tsai, 2007)

Web sitesi	URL
IUBMB: Enzim Sınıflandırılması	http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/
IntEnz: Sınıflandırma ve Adlandırma	http://www.ebi.ac.uk/intenz/index.html
ENZYME DB: Genel Bilgiler	http://www.expasy.ch/enzyme/
Enzim Yapıları	http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzyme/index.html
PROCAT: Enzim aktif bölgesi	http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PROCAT/PROCAT.html
Brenda: Enzim Özellikleri	http://www.brenda.uni-koeln.de/
TECRdb: Reaksiyon termodinamikleri	http://xpdn.nist.gov/enzyme_thermodynamics/
KEGG: Enzim aracılı yollar	http://www.kegg.com/kegg/pathway/map/
PathDB: Birincil metabolik yollar	http://www.ncgr.org/software/pathdb/

2.2 Mikrobiyal Enzimler

Enzimler, günlük hayatımızda sıkça kullandığımız ürünlerin çok büyük bir bölümünde bulunmaktadır. Özellikle hazır olarak tüketilen neredeyse tüm besinlerde enzimler kullanılır. Enzimler uygulama alanlarına bağlı olarak farklı çeşitlikte ve miktarlarda kullanıldıklarından endüstriyel enzim üretimi, bu farklar göz önüne alınarak yapılmaktadır. Enzim üretiminin büyük bir kısmını mikrobiyal kaynaklı enzimler oluşturmaktadır.

Mikrobiyal enzimler, hayvansal ve bitkisel enzimlere göre pek çok avantaj sağlarlar. Bunlar:

- a- Hayvanlar ve bitkiler, mikroorganizmalara göre daha yavaş gelişirler.
- b- Bitkisel ve hayvansal enzimlerinin üretimleri oldukça pahalıdır.
- c- Doğadaki mikrobiyal canlı çeşitliğinin fazlalığı ile enzimlerde oluşan çeşitlilik onları bitki ve hayvan enzimlerinden avantajlı kılmaktadır.
- d- Günümüzde pek çok mikroorganizmanın kontrolü ve çoğaltılmasına dair genetik ve fizyolojik bilgi mevcut olup, hemen hemen istenilen bütün metabolik ürünler bu yollarla üretilmektedir (Okafor 2007).

Endüstriyel olarak en fazla kullanılan enzim grubu hidrolazlardır. Özellikle amilaz, proteaz, pektinaz ve lipazlar en yaygın kullanılanlardır.

α -Amilaz: α -Amilazlar, bakteriyel kaynakların sıcaklığa karşı daha dayanıklı olmalarından dolayı, fungal kaynaklara göre daha çok tercih edilirler. Termostabil α -amilazın uygulama alanı oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiştir. Bu enzimler, tekstil ve kağıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmek, glukoz ve fruktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermantasyonunda kullanılmaktadırlar. Özellikle *Bacillus licheniformis* tarafından sentezlenen termostabil α -amilaz, nişasta hidrolizine uygundur. Tatlandırıcıların üretiminde kullanılan önemli bir enzimdir. Günümüzde nişastadan üretilen birçok tatlandırıcı yüksek oranda fruktoz şurubu içerir. Glukoz, sükroz kadar tatlı değildir. Ancak fruktoz en az sükroz kadar tatlıdır. Nişasta hidrolizi sonucu oluşan glukoz, glukoz izomeraz ile fruktoza dönüştürülür ve tatlandırıcıların yapımında kullanılır. Aynı zamanda fruktoz düşük kalorili tatlandırıcı olarak da bilinir (Okafor 2007).

Proteaz: Proteazlar toplam enzim üretiminin yaklaşık %60'nı oluşturmaktadırlar. Proteaz üretiminde en önemli mikroorganizmalar, termofilik ve alkalifilik *Bacillus* türleridir. Bu türlerin yüksek sıcaklık ve pH'ta aktivite göstermeleri, bu cinse ait bakterilerin proteaz üretiminde kullanılma nedenidir (Johnvesly ve Naik, 2001).

Deterjan endüstrisinde kullanılan en yaygın enzimlerden biri proteazdır. Proteolitik enzimler, hastanelerde kullanılan kan ve iltihap lekeli sargıların temizlenmesini kolaylaştırmaktadır. Bu amaç için kullanılan proteolitik enzimler yüksek optimum pH'a (9-

11) sahip olmalıdırlar. Dahası enzimler peptit bağlarını rastgele ayırabilecek özellikte ve proteinlerin çözünürlüğünü kolaylaştırıcı özellikte olmalıdır. Bu özellikteki enzimler genellikle alkalifilik özellikte ve aerobik spor oluşturan suşlardan (*B. licheniformis*, *B. amyloliquifaciens*) elde edilmektedirler (Okafor 2007).

Mikrobiyal rennet: Rennin genç memelilerin gastrik suyunda bulunan, sütün sindirilmesine yardım eden bir asit proteazdır. Bu enzim süt üretiminde ve sütün yapısında bulunan protein-kappa kazeinden parakazeini ayırmada işlev görür. Renninin ticari formu olarak bilinen mikrobiyal rennetler buzağuların dördüncü midelerinden elde edilirler. Bu işlem oldukça pahalı olduğu için rennin enziminin yerine mikrobiyal suşlar (*Muchor miehi*, *M. pusillus*, *Endothia parasitica*, *Bacillus polymyxa*) tarafından üretilen asit proteazlar kullanılır (Okafor 2007).

Laktaz: Laktaz bir dissakkarit olan laktozu hidroliz yoluyla bileşenleri olan galaktoz ve glukozu ayırır. Galaktoz ve glukoz laktoza göre organizmalar için daha kolay metabolize edilebilir. Laktaz ticari olarak *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces lactis*, *Aspergillus niger* türlerinden üretilmektedir (Okafor 2007).

Pektinaz: Pektinazlar, pektin içerikli (kompleks asidik polisakkaritler) maddelere saldırırlar. Pektin içerikli maddeler yüksek molekül ağırlıklı, poli-D-galakturonik asitten oluşmaktadır. Şekerlerin karboksilik asit grupları metanol ile esterlendikten sonra oluşan yapı poli-üronid olarak bilinir. Bu yapı bitki hücrelerinin birbirlerine yapışmalarını sağlar. Pektinazlar, meyve suyu ve meyve endüstrisinde meyvelerin parçalara ayrılmasını ve sıkılan suyun parlaklık kazanmasını sağlar. Pektinolitik enzimler meyve sularında, meyve gelişiminde ve şarap endüstrisinde kullanılır (Okafor 2007).

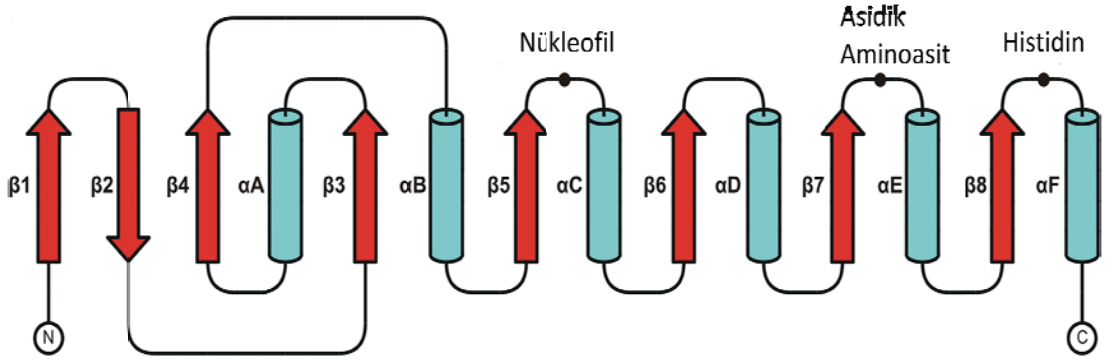
2.3 Lipazlar

2.3.1 Lipazların yapısı

Şu ana kadar farklı kaynaklardan saflaştırılan lipazların üç boyutlu yapılarının birbirine büyük oranda benzerlik gösterdiği görülmüştür. 1990 ile 1995 yılları arasında 11 değişik lipaz türünün yüksek çözünürlükteki yapısı aydınlatılmıştır (Öztürk 2002). Bu enzimlerin moleküler büyüklükleri, substrat spesifiklikleri ve aktivatörleri dışında, çoğunluğunun benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, tüm lipazlarda karakteristik olarak katalitik grupları içeren merkezi bir β -bandı göze çarpmaktadır. α/β hidrolaz yapıdaki proteinlerin iç yapısı incelendiğinde paralel β kıvrımlı bantların heliks şeklindeki α yapıları ile ayrıldığı ve süper heliksel dönüşlerle bir şerit şeklini aldığı görülmüştür (Öztürk 2002) (Şekil 2.1).

Lipazlar, genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Bunlardan N- kısmı, katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır (Akoh ve Min, 1998).

Merkezi β -bandı ile α -bandı arasında lipaz enziminin aktif bölgesi bulunmaktadır. Aktif bölgede yapılan çalışmalar bir üçlünün varlığını göstermiştir. C ucuna yakın kısımda bulunan histidin amino asidi, üç boyutlu yapıda nükleofilik amino aside hidrojen bağları ile bağlı bulunmaktadır. Ayrıca bir asidik amino asit (aspartik asit ya da glutamik asit) yine hidrojen bağları ile nükleofilik amino aside bağlanır. Bu üçlü grubun, enzimin katalitik aktivitesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Jaeger vd. 1993). Üçlü, üç boyutlu yapıda bir α bandı ile oluşturulan kapak yapısı ile korunmaktadır. Katalitik aktivitenin başlaması için bu kapak yapısının ayrılması şarttır. Lipaz enziminin aktivite koşulu olan arayüzeyin oluşmasıyla beraber kapak yapısı ortadan kalkar ve lipaz enzimi aktiflik kazanır. *Rhizomucor miehei* ve insan pankreatik lipazında yapılan çalışmalar ile bu kapak yapısı gösterilmiştir (Brzozowski vd. 1991).



Şekil 2.1 Lipaz enziminin iki boyutlu yapısı (Öztürk 2002)

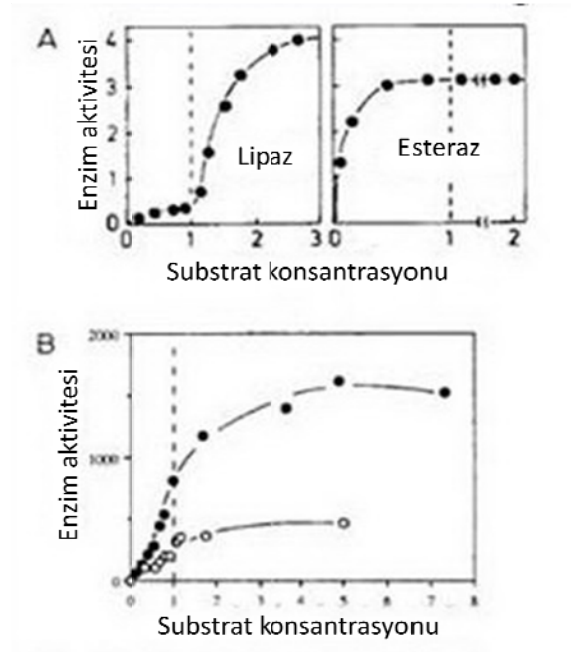
Bu gruptaki enzimler primer dizilimlerinde, her ne kadar farklı seviyelerde benzerlik gösterebilirler de, evrim sürecinde birkaç istisna dışında korunan aktif bölgenin primer amino asit dizisi; Gli-X-Ser-X-Gli amino asitlerini içeren bir pentapeptid yapısına sahiptir. Serin amino asidinin yapıda değişime uğraması veya yer değiştirmesi ile katalitik aktivitenin yitilmesi konusu üzerine yapılan çalışmalar, bu amino asidin kataliz için çok önemli ve gerekli olduğunu göstermiştir. Termofilik *Geobacillus* türlerinde aktif bölgedeki pentapeptidin ilk amino asidi olan glisinin yerinde alaninin olduğu belirlenmiştir. Alanin amino asidi hidrofobik karakterde bir amino asit olmasından kaynaklı olarak var olduğu yapı içerisinde dayanıklılık işlevi görmektedir. Bakteri hücre duvarında da çokça bulunan bir enzimdir. Bu işlevinden kaynaklı olarak *Geobacillus* türlerinde glisin yerine alanin'in bulunması aktif bölgenin termal stabilitesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Noble vd. 1993).

Lipazlar için ortaya konan katalitik mekanizma aktif merkezde bulunan serin amino asidi üzerinde yoğunlaşmıştır. Serinin nükleofilik oksijeni trigliserid ile tetrahedral hemiasetal bir ortam oluşturur. Hemiasetalin ester bağı hidroliz olur ve diaçilgliserid serbest kalır. Aktif merkezdeki serin açıl esterinin, bir su molekülü ile tepkimeye girdiği, daha sonra açıl enzimin bölündüğü ve yağ asidinin ayrıldığı tahmin edilmektedir. Katalitik işlemin bu aşamasında ürünün aktif merkezden ayrılması özellikle önem taşımaktadır (Petersen vd. 2001).

2.3.2 Lipaz enziminin arayüzey aktivasyonu

Ara yüzey aktivasyonu olgusu ilk kez 1936 yılında Holwerda vd. ve daha sonra da 1945 yılında Schonheyder ve Vokqvartz tarafından gözlenmiştir (Verger 1997).

Sulu bir ortamda monomerlerin maksimum konsantrasyonuna doyumluk adı verilir. Bu doyumluk noktası triaçilgliseroller için emülsiyon formunun başlangıcıdır. Lipolizis, suya yağ arayüzünün oluşumu ile gerçekleşir. Lipolitik enzimler grubundan esteraz enzimi (E.C. 3.1.1.1) de, lipaz (E.C. 3.1.1.3) gibi ester bağlarına etki etmesine rağmen, esteraz ve lipaz aktiviteleri arasında belirgin farklar vardır. Esteraz suda çözünebilen substratlara doyumluk aşamasına gelmeden etki ederken, lipaz maksimum aktivite için substrat doyumluğuna ihtiyaç duymaktadır (Jaeger vd. 1994) (Şekil 2.2).

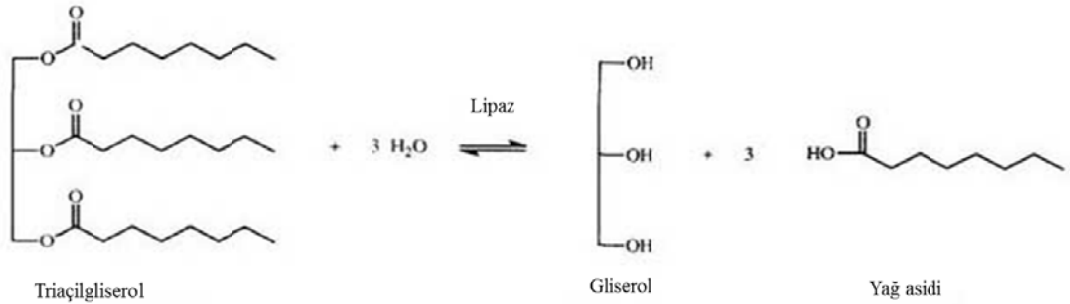


Şekil 2.2 Lipaz ve Esteraz enzimlerinin aktiviteleri. A, esteraz ve lipaz enzimlerinin farklı substrat konsantrasyonlarındaki aktiviteleri verilmiştir. B, *Pseudomonas auroginosa*'daki lipaz enziminin triacetin (o doyum halde 306 mM) ve tripropionin (• doyum halde 15 mM)'deki aktiviteleri verilmiştir (Jaeger vd. 1994).

2.3.3 Lipaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

Diğer hidrofilik enzimlerde görülmemesine rağmen farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar, polar olmayan organik çözücüler içerisinde dayanıklılık gösterir. Aynı zamanda farklı boyutta ve özellikteki oldukça fazla sayıda substratı kabul edebilirler. Bunların esnek protein yapıları onlara hidroliz, interesterifikasyon, transesterifikasyon (asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz), aminoliz, oksimoliz ve tiotransesterifikasyon gibi pek çok reaksiyonu katalizleme olanağı verir. İleri (hidroliz) ve tersinir (sentez) reaksiyonlar, reaksiyon karışımının su aktivitesi ile kontrol edilir.

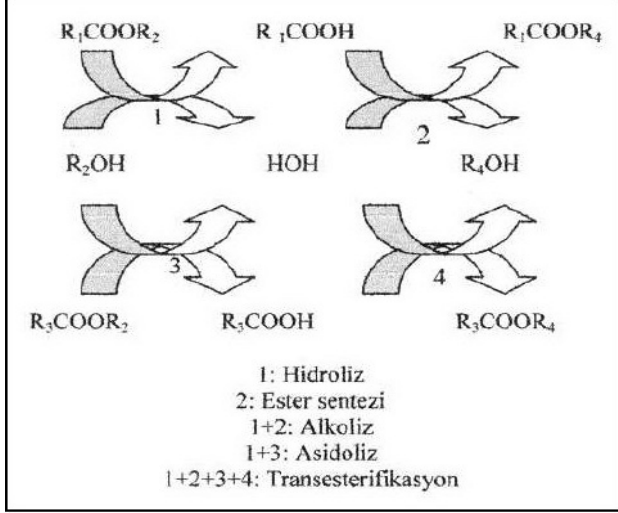
Lipaz enziminin su kullanarak triaçilgliserolün ester bağlarını bölmesi olayına hidroliz denir (Şekil 2.3). Amerikan yağ sanayinde Colgate-Emery işlemi, yağların parçalanması amacı ile kullanılmaktadır. Bu süreç, aşırı basınç ve sıcaklıkta gerçekleştiği için yağ yapısında bozulmaya yol açar. Ayrıca maliyeti de oldukça yüksektir. Bu sebeple, yağ sanayinde lipaz enziminin kullanımı daha uygundur. Bu teknoloji günümüzde yağ asidi, digliserid, monogliserid üretimi, süt ürünleri ve deterjan imalatında uygulanmaktadır.



Şekil 2.3 Triaçilgliserol hidrolizi (Jaeger vd. 1994)

Esterifikasyon hidroliz olayının tersidir ve düşük su aktiviteli sistemlerde gerçekleşir. Transesterifikasyon ise açıl radikallerinin bir ester ve bir asit (asidoliz), bir ester ve diğer

bir ester (interesterifikasyon) veya bir ester ve bir alkol arasında değişimi olarak tanımlanabilir (Öztürk 2002) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Lipaz reaksiyonlarının şematik olarak gösterilişi (Öztürk 2002)

2.3.4 Lipaz Enziminin termostabilitesini etkileyen faktörler

Termofilik mikroorganizmaların ürettikleri enzimler, yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite ve stabilite göstermektedirler. Yüksek sıcaklıklarda enzimlerin stabil kalması, termofilik canlıların ekstrem koşullarda, metabolik faaliyetlerinin devamını sağlayan temel unsurlardan biridir.

Lipaz enziminin termal stabilitesini sağlayan ve arttıran faktörler aşağıda verilmiştir.

- Hidrojen bağı sayısının artması,
- Heliks yapıdaki amino asitlerin artması,
- β yapılarının uzaması ve sayıca artışı,
- Prolin amino asidi sayısının artması ve daha az sayıda glisin amino asidi,
- Yüzey alanının ve hacmin azalması,
- Kararsız amino asitlerin (asparjin, glutamin, metiyonin ve sistein) sayısının azalması,
- Disülfid bağlarının artış göstermesi,
- Metallerin (özellikle Zn) varlığı,

termo stabiliteyi sağlayan ve arttıran etmenlerdir (Tyndall vd. 2002).

Yapılan bir çalışmada, lipaz enzimi kristal yapıları bilinen dört bakterinin kimyasal ve biyokimyasal karşılaştırılması yapılmış ve karşılaştırma sonuçları izelge 2.2’de sunulmuştur (Tyndall vd. 2002). Bu çalışmada, mesofilik karakterde olan *Pseudomonas aeruginosa* (PAL), *Chromobacterium viscosum* (CVL) ve *Pseudomonas cepacia* (PCL) u bakteriyile termofilik karakterdeki *G. steorotermophilus* P1 (GSP) suşu lipaz enzimlerinin yapısal içerikleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.2 Protein stabilitesinde etkili olabilecek bazı faktörler (Tnydall vd. 2002)

Faktör	GSP	CVL	PCL	PAL
Tuz köprüleri/100 kök	3.09	2.19	1.25	3.15
%Strand residues	13.4	16.0	13.4	12.3
%Sarmal kökleri	47.4	29.0	40.9	46.7
Dipol bağları	4	3	4	3
%Prolin kökleri	4.6	3.1	4.1	4.6
%Glisin kökleri	9.8	8.8	11.3	10.9
%Aromatik kökler	11.6	6.6	7.5	8.1
%Kararsız amino asit kökleri	10.6	11.0	11.3	11.2
Disülfit bağları	0	1	1	1
Moleküler hacim/Kök	131	122	121	123

GSP; *G. steorotermophilus* P1 lipazı, CVL; *Chromobacterium viscosum* lipazı, PCL; *Pseudomonas cepacia* lipazı, PAL; *Pseudomonas aeruginosa* lipazı.

GSP (ve PAL) lipazı tuz köprüleri, prolin kökleri ve heliks kökleri bakımından yüksek bir yüzdeye sahiptir. GSP lipazı diğer u mezofilik bakteriye kıyasla önemli oranda aromatik köklere sahiptir. Aynı alışmada GSP lipazı diğer lipazların sahip olduğu Ca^{2+} bağlayan domainin yanında Zn^{2+} bağlayan domain içermektedir. Bu Zn^{2+} bağlayan domainin enzimin termal stabilitesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Tnydall vd. 2002).

2.3.5 Bakteriyel Lipazların Sınıflandırılması

Bakteriyel lipazlar, serin hidrolaz ailesi içinde yer alır. 8 grup altında toplanmışlardır. Bu 8 grup içerisinden en büyük grup ise, kendi içinde toplam 6 alt gruba daha ayrılır. Sınıflandırma işlemi, korunmuş dizi motiflerine ve enzimlerin biyolojik özelliklerine göre

yapılmıştır. Bulunan birkaç lipolitik enzim, bu 8 genel grubun içerisinde dahil edilememiştir (De Pascale vd. 2008). Bu nedenle 9. ve 10. gruplar üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Grup 1: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* cinslerinin oluşturduğu birinci grup asıl lipazlar olarak bilinirler.

Grup 2: Bu grup lipazlar aktif bölgelerinde Gly-Asp-Ser-Leu serisini barındırırlar. *Streptomyces*, *Salmonella* cinslerinin ürettiği lipazlar bu gruba dahildir.

Grup 3: *Streptomyces* türlerinin ürettiği lipazların olduğu bu grup lipazlar, grup iki lipazlarından farklı olarak ekstraselülerdirler.

Grup 4: Bu grup lipazlar memelilerdeki hormona duyarlı lipazlara benzemektedirler.

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

Grup 6: En küçük molekül yapısına sahip bu grup enzimler aktif durumdayken dimerik halde bulunurlar.

Grup 7: Bu lipazlar oldukça büyüktür ve amino asit dizileri, ökaryotik asetil kolin esteraz ile homologtur.

Grup 8: Bu grup lipazlar β -laktamazlar ile benzerlik gösterir.

2.4 Lipaz Üreticisi Mikroorganizmalar

2.4.1 Fungal Lipazlar

Mikrobiyal orijinli lipazlar temel olarak bakteri ve mantarlardan elde edilir. Biyoteknolojik uygulamalarda ve organik kimyada bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen lipazlar kullanılır.

Fungal lipazlar, termal stabiliteleri, pH kararlılıkları ve organik çözücülerdeki substrat spesifiteleri ve aktiviteleri gibi özellikleri sebebiyle değerli lipaz kaynaklarıdır.

Rhizopus cinsi funguslar, 1-3 bölgesine spesifliklerinden dolayı trigliseritlerin monogliseritlere dönüşümünde ve interesterifikasyon reaksiyonlarında önemli rol oynarlar. Bu özelliklerinden dolayı çikolata üretiminde kullanılmaktadırlar (Ghosh vd. 1996). *Rhizopus nodosus*'dan üretilen lipaz özellikle süet deri kıyafetlerin yapımı sırasında deride bulunan yağın uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır.

1988'in başlarında Novo Nordisk firması tarafından yağ lekelerinin temizlenmesi amacıyla fungus *Humicola*'nın bir türünden saflaştırılan lipazın düşük kalitede olmasından ve üretim maliyetin yüksek olmasından kaynaklı olarak firma, *Humicola* lipaz geninin *Aspergillus niger*'de ifade edilmesiyle, ürün kalitesini artırırken, üretim maliyetini de düşürmüştür (Hasan vd. 2006b).

Mucor cinsi fungus *Mucor pusillus*, bilinen önemli bir termostabil ekstraselüler lipaz üreticisidir. *Mucor miehei* (IM 20) ve *Candida antarctica* (SP 382) fungusları esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını katalizleyen lipaz kaynaklarının temsilcilerindendir (Hasan vd. 2006b).

Ticari olarak uzun ömürlü fungal lipaz kaynakları şunlardır: *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. carneus*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus*, *R. oryzae* (Godtfredson vd. 1990).

2.4.2 Bakteriyel Lipazlar

Bakteriyel lipazlar ilk olarak 1901 yılında *Serratia marescens* ve *Pseudomonas auroginosa* türlerinde gözlemlenmiştir (Hasan vd. 2006a). *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* ve *Pseudomonas* cinsleri önemli bakteriyel lipaz kaynaklarıdır.

Tekstil endüstrisinde *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ürettikleri lipazlar, kumaşlarla kompleks oluşturabildiklerinden dolayı yağ lekelerinin temizlenmesinde kullanılmaktadırlar. 1995 yılında Genencor International, AU-KBC Research Center, Life Sciences, Anna University kuruluşları tarafından ilk defa endüstriyel amaçlı lipaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Lumafast adı verilen ticari lipaz *Pseudomonas mendocina* ve Lipomax adı verilen lipaz *Pseudomonas alcaligenes* bakterilerinden üretilmiştir (<http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html>).

Lipaz üreticisi bir bakteri olarak bilinen *Geobacillus thermoleovorans* ID-1 suşu, 65°C'de zeytin yağının karbon kaynağı olarak kullanıldığı termofilik basiller arasında bilinen en hızlı büyüme oranına sahiptir. Gelişme sıcaklığına karşın en yüksek lipaz üretimi 50°C'de, pH 6.0'da gerçekleşmiştir. Büyüme oranındaki bu değer *G. stearothermophilus* ve *G. thermocatenulatus* türlerine göre yüksek bir değerdir (Lee vd. 1999). Aynı zamanda *G. thermoleovorans* ID-1 lipaz geni *Escherichia coli*'de ifade edildiğinde optimum aktivitesi 50°C'de, pH 7.0-8.0 arasında gözlenmiştir (Cho vd. 2000).

Cryptococcus sp. S-2 lipazı biyodizel üretiminde endüstriyel ve ekonomik olarak önemli olan bitkisel yağların hidrolizinde kullanılan bir enzimdir (Kamini vd. 2000).

Lipaz üreticisi önemli bir diğer termofilik bakteri türü de *G.thermocatenulatus*'tur. *G.thermocatenulatus* lipazı üzerinde yapılan bir çalışmada, lipaz üretim besiyerinde kullanılan %1.3'lük nutrient broth konsantrasyonunun %0.65'e düşürülmesiyle enzim üretimi 0.08 U/ml'den 0.2 U/ml'ye yükselmiştir. Aynı çalışmada enzim üretim besiyerinde gum arabik varlığı lipaz aktivitesini arttırıcı bir etken olarak gözlemlenmiştir (Schmidt-Dannert vd. 1994). Termofilik *G. thermocatenulatus*'tan 16 ve 43 kDa'luk iki değişik lipaz saflaştırılmıştır. 16 kDa'luk lipaz bilinen en düşük molekül ağırlıklı lipazlardan bir tanesidir (Schmidt-Dannert vd. 1996).

2.5 Lipaz Enziminde Sıcaklık ve pH'ın Aktivite Üzerine Etkisi

Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel kullanımları için karakterizasyon işlemi oldukça önemlidir. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmalar, lipaz enziminin karakteristiklerini büyük ölçüde ortaya çıkarmıştır.

Mikroorganizmalar çok çeşitli sıcaklık ve pH aralıklarında gelişim gösterebilirler (Çizelge 2.3). Yapılan bir çok çalışma, lipaz enziminin bazik ortamda daha stabil olduğunu ve endüstriyel kullanım dahilindeki lipaz üreticisi mikroorganizmaların alkalifilik olduğunu göstermiştir (Ahmed vd. 2009) (Çizelge 2.3). Lipaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalarda asidik mikroorganizmalara da rastlanmıştır. Bir fungus olan *Aspergillus niger*'in asidik bir lipaz üreticisi olduğu belirtilmiştir (Ramani vd. 2010).

Endüstriyel lipaz üretiminde termostabil lipazlar önemli bir yer tutmaktadır. Termostabil lipazların seçim amacı, yüksek sıcaklıklarda eriyen yağlara etki edebilmesidir. Termostabil lipaz kaynağı olarak çoğunlukla *Geobacillus* ve *Pseudomonas* cinsi bakteriler çalışılmıştır (Kumar vd. 2005) Soğuğa adapte olmuş mikroorganizmalar da lipaz üreticisi olarak kullanılmaktadır. Bu lipazlar 0-30°C'de aktiftirler. Bunlar arasında, mezofilik özellikteki *Geotrichum sp.* soğuğa adapte olmuş önemli bir lipaz kaynağıdır (Cai vd. 2009).

Bacillus sp. FH5'ten saflaştırılan lipazların maksimum aktivitesinin pH 10.0 olduğu gözlemlenmiştir. pH 10.0'dan 11.0'e yükseltildiğinde ise lipolitik aktivite stabilitenin düştüğü oranda azalmıştır (Hasan vd. 2006b).

Bacillus subtilis 168'den saflaştırılan lipaz enzimi maksimum stabilitesini pH 12.0'de, maksimum aktivitesini pH 10.0'da göstermektedir (Lesuisse vd., 1993). *Bacillus* cinsi bakterilerin termostabil lipaz üretimleri zeytin yağının substrat olarak kullanıldığı koşullarda 30°C'deki optimal pH'sı 5.5-7.2 arasında ve pH 5.6'daki optimal sıcaklığı 60°C'dir (Sugihara vd. 1991).

G. thermoleovorans ID-1 suşu ile yapılan bir çalışmada, elde edilen thermostabil lipaz, 60°C’de 1 saat ve 70°C’de 30 dakika inkübe edildiğinde, sıcaklığın etkisine bağlı olarak normal aktivitesinin %50’sini tekrar kazanmıştır (Lee vd. 1999).

Çizelge 2.3 Bazı mikroorganizmaların geliştiği sıcaklık ve pH’ lar

Suş adı	Optimal pH ve sıcaklık	Kaynak bilgisi
<i>Bacillus sp.</i> FH5	pH 8.0, 37 °C	Hasan vd.(2006b)
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> IHI-91	pH 6.0, 75 °C	(Markossian vd. 2000; Becker vd. 1997)
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3 termofilik IHI-91	pH 8.5, 55 °C	Kumar vd. (2005)
<i>Bacillus clausii</i> SKAL-16	pH 8.0-10.0	Lee ve Park (2008)
<i>Bacillus cereus</i>	30-33 °C pH 8.0’de 24 saat	Dutta ve Ray (2009)
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	55 °C ve pH 8.5	Kumar vd. (2005)
<i>Salinivibrio sp.</i> SA-2	pH 8.0, 35 °C	Amoozegar vd. (2008)
<i>Lactobacilli</i>	30 °C,	Papaon ve Talon (1988)
<i>Lactobacillus plantarum</i> , DSMZ 12028	pH 5.5	Lopes vd. (1999)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	pH 7.0, 30 °C	Chen vd. (1998)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	pH 7.0, 30 °C ‘de 48 saat	Zhen-qian ve Chun-yun (2009)
<i>Pseudomonas sp.</i> 7323;	pH 9.0, 30 °C	Zhang ve Zeng (2008)
<i>Penicillium candidum</i>	pH 9.0, 35 °C	Ruiz vd. (2001)
<i>Candida rugosa</i>	pH 6.5, 30 °C	Song vd. (2001)
<i>Cryptococcus sp.</i> S2	pH 5.6, 25 °C	Kamini vd. (2000)

2.6 Metal İyonlarının Lipaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Metal iyonlarının hem katalitik aktiviteyi artırıcı hem de termal stabiliteyi yükseltici etkileri mevcuttur. Ancak her bir metal iyonu farklı türdeki mikroorganizmalara farklı şekilde etki etmektedir. Bazı enzimler aktiflik için metal iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Yaygın olarak çalışılmış metal iyonları Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} ve Fe^{2+} ’dir. Hemen hemen bütün lipazlar için Ca^{2+} iyonu aktivatör etkisi göstermektedir

(Ahmed vd. 2009). Ancak istisnai olarak Çizelge 2.4'te gösterildiği üzere *Acinetobacter sp.* CR9'de Ca^{2+} iyonu varlığında lipaz aktivitesi azalmaktadır.

Geotrichum candidum lipaz I ve II için tek değerlikli iyonlar lipolitik aktiviteye çok az etki ederken, iki değerlikli iyonların 50 mM'lık konsantrasyonları lipaz aktivitesini azaltmaktadır (Veeraragavan vd. 1990). *Enterococcus faecalis* suşlarında safra tuzları enzim aktivitesini kısıtlarken, fosfat ve yaygın surfaktantlar lipaz aktivitesini etkilemez ya da çok az düşürürler (Kar vd. 1996). *B. coagulans* BTS-3'de lipaz aktivitesi; Al^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} iyonları tarafından kısıtlanır, K^{+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , ve Mg^{2+} iyonları tarafından ise artırılırken, Na^{+} iyonu olumlu ya da olumsuz etki yapmaz (Kumar vd. 2005). *Rhizopus japonicus* NR400 lipazın aktivitesi 1 mM metal iyonlarından veya safra tuzundan etkilenmez. Reaksiyon karışımına albumin eklenmesi sonucu lipaz aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Suzuki vd. 1986). Su ile metanol ve dimetil sülfoksit gibi çeşitli organiklerin %0-30 konsantrasyonlardaki karışımları lipaz enzimini aktive eder (Choo vd. 1998).

Çizelge 2.4 Metal iyonlarının lipaz aktivitesine etkisi

Suş adı	Aktivatör	İnhibitör	Kaynak
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> ID-1	Ca ²⁺ veya Zn ²⁺		Lee vd. (1999)
<i>Bacillus natto</i>	Na ⁺ , PO ₄ ³⁻ ve Ca ²⁺		Ohkuro vd. (1978)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> No. 33		Zn ²⁺ ve Hg ²⁺	Kumura vd. (1993)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB 5001	CaCl ₂	ZnSO ₄	Chartrain vd. (1993)
<i>Pseudomonas putida</i> 3SK	CaCl ₂	ZnSO ₄	Lee ve Rhee (1993)
<i>Staphylococcus aureus</i> 226	Mg ²⁺ ve Ca ²⁺	Mn ²⁺	Muraoka vd. (1982)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	Kobalt ve Cinko	Talon vd. (1995)
<i>Pseudomonas</i> suşu Alaskan toprağı		Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ ve Hg ²⁺	Choo vd. (1998)
<i>Pseudomonas</i>		Ferrik iyonları	Sugiura vd. (1977)
<i>Rhizopus oryzae</i>		Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ ve Fe ²⁺	Hiol vd. (2000)
<i>Aspergillus terreus</i>	Mg ²⁺ ve Ca ²⁺	Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ ve Fe ³⁺	Yadav vd. (1998)
<i>Serratia marcescens</i> 345	Mg ²⁺	Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺	Bachkatova ve Severina (1980)
<i>Bacillus sp.</i> FH5	Ba ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ ve Hg ²⁺	Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Na ²⁺ ve Zn ²⁺	Hasan vd. (2006b)
<i>Acinetobacter sp.</i> CR9	Cu ²⁺ , Mo ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺	Ca ²⁺	Kasana vd. (2008)
<i>Acinetobacter baumannii</i> BD5	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ ve Mg ²⁺	Zn ²⁺ ve Cu ²⁺	Park vd. (2009)
<i>Pseudomonas sp.</i> 7323	Ca ²⁺		Zhang ve Zeng (2008)
psychrotroph <i>Pseudomonas sp.</i> B11-1		Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ ve Hg ²⁺	Choo vd. (1998)

Kalsiyum iyonlarının varlığında *Escherichia coli*'de ifade edilen *G. stearothermophilus* L1 lipazının termostabilitesi yaklaşık olarak 8-10°C artar. Enzim kalsiyum iyonlarının varlığında 60°C'de ortaya çıkmaya başlarken bu iyonların yokluğunda 58°C'de ortaya

çıkar. Bu da bize göstermiştir ki, kalsiyum iyonları termostabil enzime bağlanarak enzimin tersiyer yapısını daha yüksek sıcaklıklarda stabilize eder.

2.7 Lipaz Enziminin Substrat Spesifikliği

Lipaz enziminin en önemli substratı uzun zincirli triaçilgliserollerdir. Bunların dışında birçok lipid yapısına etki edebilmektedirler. *Staphylococcus* cinsi bakterilerin lipazları her ne kadar substrat spesifikliği göstermeseler de, ilgi duydukları substratlar mevcuttur (Çizelge 2.5). *Staphylococcus hyicus* özellikle fosfolipidlere karşı oldukça aktiftir (Simons vd. 1998).

G. thermocatenulatus lipaz aktivitesi *p*-nitrofenil palmitat ve zeytinyağının substrat olarak bulunduğu ortamda maksimum aktivitesini pH 7.5-8.0 arasında 60°C'de gösterir (Schmidt-Dannert vd. 1994). *Bacillus sp.* cinsi bakterilerin substrat spesifikliği basit trigliseridlere karşı geniştir.

G. thermocatenulatus lipaz genlerinin, *E.coli* DH5α suşuna klonlandığında, maksimum lipolitik aktivitesinin tribütirin ve zeytinyağının substrat olarak kullanıldığı besiyerinde, pH 8.0-9.0 arasında ve 60-70°C'de olduğu gösterilmiştir (Schmidt-Dannert vd. 1996).

P. aeruginosa KKA-5 suşundan kısmi olarak saflaştırılan lipazın castor yağını %81 oranında hidrolize ettiği bulunmuştur (Sharon vd. 1998). *P. aeruginosa* MB 5001'in uzun zincirli trigliseridlere oranla kısa zincirli trigliseridlere karşı daha aktif olduğu ve C18 doymamış yağ asitlerini C18 doymuş yağ asitlerinden daha etkili hidrolize ettiği belirtilmiştir (Chartrain vd. 1993).

Çizelge 2.5 Substrat etkinliği

Suş adı	Substrat çeşidi	Kaynak
<i>Staphylococcus hyicus</i>	Fosfolipidler	Simons vd. (1998)
<i>Salinivibrio sp. SA-2</i>	Triasilgliseroller	Amoozegar vd. (2008)
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Tributyrimin varlığı ve yokluğu	Elwan vd. (1983)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>p</i> -nitrofenil esterleri ve C-8 açıl grupları ile triasilgliserid esterleri	Lesuisse vd. (1993)
<i>Bacillus thermoleovorans</i> ID-1	Zeytinyağı (%1.5 h/a)	Lee vd. (1999)
<i>Bacillus sp.</i> LBN4	Zeytinyağı ve maya ekstresi	Bora ve Kalita (2007)
<i>Bacillus sp.</i>	Tributirin-Tween 80, Zeytinyağı	Heravi vd. (2008)
<i>Staphylococcus sp.</i>	Suda çözülebilir ve çözilemeyen Triasilgliseridler	Falk vd. (1991)
<i>Acinetobacter baumannii</i> BD5	<i>p</i> -NP kaprat (C10)	Park vd. (2009)

2.8 Lipaz Enziminin Üretim Koşulları

Mikrobiyal lipazların üretiminde, enzim üretim süreleri değişiklik gösterir. Enzim üretimi için 24 saatin altında inkübasyon süresine neredeyse rastlanmaz. Prokaryotik mikroorganizmalardan ökaryotik mikroorganizmalara doğru, inkübasyon sürelerinde belirgin artışlar meydana gelmektedir (Çizelge 2.6). Termofilik *Bacillus* (*Geobacillus*) cinslerinden üretilen lipaz enziminin maksimum lipolitik aktivitesi için inkübasyon süresi genellikle 36 saat olarak bulunmuştur (Hendelsman and Shoham, 1994).

Çizelge 2.6 Enzim Üretiminde Kullanılan Inkübasyon Süreleri

<i>Geobacillus (Bacillus) sp.</i> (termofilik)	36 saat	Handelsman ve Shoham (1994)
<i>Bacillus cereus</i> ve <i>Bacillus coagulans</i>	24 saat	El-Shafei ve Rezkallah (1997)
<i>Geobacillus sp.</i> ARM suşu (DSM 21496=NCIMB 41583)	24 saat	Ebrahimpour vd. (2008)
<i>Bacillus sp.</i> FH5	48 saat	Hasan vd. (2006b)
<i>Pseudomonas</i> suşları	> 72 saat	Sarkar vd. (1998)
<i>Candida rugosa</i>	60 saat	Song vd. (2001)
<i>Cryptococcus sp.</i> S-2	120 saat	Kamini vd. (2000)
<i>Rhizopus oryzae</i>	4 gün	Hiol vd. (2000)
<i>Penicillium wortmanii</i>	7 gün	Costa ve Peralta (1999)

2.9 Mikrobiyal Lipazlarda Klonlama

Klonlamada temel amaç, gerekli olan enzimin üretim koşullarının kolaylaştırılması, maliyetin düşürülmesi ve ticari olarak elde edilecek ürün miktarının en yüksek seviyeye çıkarılmasıdır. Bu amaçla klonlaması yapılan lipaz enzimleri mevcuttur.

G. stearothermophilus L1 lipaz geninin *E.coli* de ifade edilmesi sonucu üretilen lipazın, pH 9.0-10.0 civarında ve 60-65°C'de aktive olduğu bulunmuştur (Kim vd. 1998). *G. stearothermophilus* L1 lipaz geni *E.coli* ye klonlandığında lipaz üretiminin sentetik substratlar olan *p*-nitrofenil kaprilat ve trigliseridlere göre tripropionine karşı daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Kim vd. 1998). Bu lipaz, sığır yağını ve palmye yağını 50°C'de zeytin yağından daha çabuk hidrolize etmektedir.

Termofilik *G. thermocatenulatus* lipazı, *E.coli* DH5a'da ifade edildiğinde pH 9.0-11.0 arasında yüksek oranda stabilite göstermektedir (Schmidt-Danert vd. 1996). *Bacillus sp.* FH5'ten saflaştırılan lipazların maksimum aktivitesinin pH 10.0'da olduğu gözlemlenmiştir. pH 10.0'dan 11.0'e yükseltildiğinde ise lipolitik aktivite, stabilitenin düştüğü oranda azalmıştır (Hasan vd. 2006b).

2.10 Lipaz Enziminin Endüstriyel Uygulama Alanları

Termostabil enzimler, özellikle düşük maliyetleri ve yüksek oranda stabil olmalarından dolayı biyoteknolojik uygulamalar içinde büyük öneme sahiptirler (Handelsman ve Shoham 1994).

Özellikle yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen biyolojik süreçlerin avantajları;

Yüksek difüzyon oranı sağlanır,

Lipitlerin ve diğer hidrofobik substratların sudaki çözünürlüğü yükselir,

Substrat viskozitesi düşürülür,

Reaktant çözünürlüğü yükselir,

Yüksek sıcaklık reaksiyon oranını daha hızlı hale getirir,
Mikrobiyal kontaminasyon riski azaltılır (Sugihara vd. 1991, Kim vd. 1998).

Ticari olarak üretilen ilk lipaz enzimi, Novo Nordisk firması tarafından 1994'te üretilen 'Lipolase'dır. Lipolase bir fungus olan *T. lanuginosus* lipaz geni *A. oryzae*'da ifade edilerek üretilmiştir. 1995'te Genecor International firması, *Pseudomonas mendocina*'dan Lumafast'ı ve *Pseudomonas alcaligenes*'ten Lipomax'ı, iki ayrı lipaz olarak üretmiştir (<http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html>).

Termostabil enzimler biyopolimer ve biyodizel sentezinde, farmasötik, tarım kimyasalları, kozmetik ürünlerin üretiminde kullanılırlar (Haki ve Rakshit 2003). Endüstriyel süreçlerde kullanılan birçok lipaz enzimi 45°C'nin üzerinde iş görmektedir.

Lipazlar faydalı, geri dönüştürülebilir bileşiklerin üretiminde biyokatalist olarak işlev görürler. 1-Bütül oleat, bütanol ve oleik asidin doğrudan esterifikasyonu ile biyodizel viskozitesini kış aylarında düşürmek için üretilir.

Deterjanlar içerisinde bulunan lipazlar, endüstriyel çamaşırhanelerde ve evlerdeki bulaşıkların temizlenmesi için deterjanların içerisine ilave edilir. Deterjanların temizleme gücü bu yollarla zirveye ulaşmış görünmektedir. Bütün deterjanlar benzer içeriğe sahiptir ve benzer temizleme mekanizmalarına dayanırlar. Deterjanlar içerisine temizleme gücünü arttırmak amacı ile amilaz, proteaz, lipaz gibi enzimler ilave edilir (Ito vd. 1998).

Enzimler, deterjan ürünlerinin çevreye olan etkilerini azaltır. Daha düşük sıcaklıklarda yıkamaya olanak sağlayarak, enerjiden tasarruf edilmesini sağlarlar. Zararlı olan artıkların ayrılması sağlanır, kanalizasyon işlemi içerisinde olumsuz etkileri yoktur ve akutik yaşama karşı risk oluşturmazlar.

Lipazın yüzeydeki hareketsizliği, yağın yüzeyden kaldırılmasını kolaylaştırır ve kumaş yüzeyinin ıslanabilirliğini değiştirir. Kumaş üzerindeki lipaz, yağ lekesinin ortadan

kaldırılması için kumaş-lipaz kompleksine dönüşür. Lipaz yağ lekesi oluşumundan önce ya da sonra kumaşa tutunabilir (sorbed lipase) ve kuru ya da ıslak kumaşta hidroliz için aktif durumda bulunur. Yağ ve yağ asitlerinin etkileri, lipaz üreticisi mikroorganizmalar arasında farklılık göstermektedir (Çizelge 2.7).

Endüstriyel lipaz üretimi, birçok alanda uzun zamandır yapılmaktadır (Çizelge 2.8). Lipaz salınımının mikrobiyal gelişimin geç safhalarında gerçekleşmesi, endüstriyel üretim açısından sıkıntı yaratmaktadır (Tan and Gill 1985). Bu sebepten ötürü, endüstriyel amaçla üretilen sadece birkaç termostabil lipaz bulunmaktadır (Wu vd. 1996).

Çizelge 2.7 Yağ ve yağ asitlerinin lipaz üreticisi çeşitli mikroorganizmalardaki etkisi

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

Ester üretimi, tat ve aroma maddeleri olarak besin endüstrisine uygun bir rol oynamaktadır. Lipazlar uzun zamandan beri yağsız et üretiminde kullanılmaktadır. Yağlar balık etinin işleme sürecinde lipaz eklenmesi ile uzaklaştırılır ve bu işlem biolipolizis olarak adlandırılır. Lipazlar sosis ve sucuk üretiminin fermentasyon basamağında önemli rol

oynamaktadır. Farklı mikrobiyal kökenli lipazlar, pirinç tadının rafinasyonu ile elma şarabının aromasının ve fermentasyon hızının yükseltilmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 2.8 Ticari olarak üretilen lipazlar, firmaları ve üretici mikroorganizmalar

Ticari lipaz	Suş adı	Üretici Firma	Uygulama Alanı	Kaynak
Lumafast	<i>Pseudomonas menodocina</i>	Genencor International, USA	Deterjan	Jaeger vd. 1994; Jaeger ve Reetz 1998
Lipomax	<i>P. alcaligenes</i>	Gist-Brocades, The Netherlands; Genencor International, USA	Deterjan	Jaeger vd. 1994; Jaeger ve Reetz 1998
Belirtilmemiş	<i>P. glumae</i>	Unilever, The Netherlands	Deterjan	Jaeger vd. 1994
Belirtilmemiş	<i>Bacillus pumilus</i>	Solvay, Belgium	Deterjan	Jaeger vd. 1994
Chiro CLEC-PC, Chirazyme L-1	<i>P. cepacia</i>	Altus Biologics, Mannheim	Organik Sentez	Jaeger ve Reetz 1998
Amano P, P-30, PS, LPL-80, LPL-200S	<i>P. cepacia</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Organik Sentez	Jaeger ve Reetz 1998

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada lipaz üretim miktarının belirlenmesi için kullanılan materyal ve yöntem Şekil 3.1’de özet olarak sunulmuştur.

Şekil 3.1 Deney akış şeması

3.1 Termofilik Bakteri İzolatları

Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarımızdan izole edilen ve Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarımıza ait kültür stoklarında bulunan 32 adet termofilik suş kullanılmıştır (Coleri, A. 2007). Numuneler; Aydın, Manisa, Denizli, İzmir, Nevşehir ve Ankara

illerinden toplanmıştır. Bu izolatların kodları, izole edildikleri bölgeler ve daha önce dizileri belirlenen 16S rRNA genlerinin aksesyon numaraları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Çalışılan izolatların izole edildikleri yerler, 16S rRNA geni dizi uzunlukları, ve Genbank aksesyon numaraları

İzolat kodu	İzole edildiği yer – sıcak su kaynağı - numune çeşidi	16S rRNA geni dizi uzunluğu (bç)	16S rRNA genine ait GenBank Aksesyon Numarası
A113	Germencik, Ömerbeyli, Aydın -Aktaş MTA sondaj kuyusu – toprak	1407	FJ42959
A142	Germencik, Ömerbeyli, Aydın - Horçayı MTA sondaj kuyusu – sediment	1400	FJ429990
A146	Germencik, Ömerbeyli, Aydın - Horçayı MTA sondaj kuyusu – sediment	1420	FJ429568
A333	Germencik, Ömerbeyli, Aydın - Deli Mehmet Durağı MTA sondaj kuyusu – toprak	740	EU326497
A335	Germencik, Ömerbeyli, Aydın - Deli Mehmet Durağı MTA sondaj kuyusu –toprak	1391	FJ429994
A353	Salavatli, Yavuzköy, Aydın - 1. MTA sondaj kuyusu – sediment	1399	FJ429997
A364	Salavatli, Yavuzköy, Aydın - 2. MTA sondaj kuyusu – toprak	1404	FJ429998
A392b	Salavatli, Yavuzköy, Aydın - 2. MTA sondaj kuyusu – toprak	1392	FJ430002
A394	Salavatli, Yavuzköy, Aydın - 2. MTA sondaj kuyusu – toprak	1393	FJ430003
A403	Salavatli, Yavuzköy, Aydın - 2. MTA sondaj kuyusu – toprak	1456	FJ429570
A404	Salavatli, Yavuzköy, Aydın - 2. MTA sondaj kuyusu – toprak	1383	FJ430005
A412b	Salavatli, Yavuzköy, Aydın - 2. MTA sondaj kuyusu –toprak	1413	FJ429571
A413	Salavatli, Yavuzköy, Aydın - 2. MTA sondaj kuyusu – toprak	1390	FJ430006
B84a	Turgutlu, Urganlı Mevkii, Turgutlu Kaplıcaları, Manisa - Sıcak su artezyen kuyusu – su	1390	FJ430009
C161ab	Buharkent, Tekkehamam-Tekkeköy mevkii, Babacık ılıcası, Denizli - Sıcak su artezyen kuyusu – toprak	1385	FJ430012
C196	Buharkent, Tekkehamam-Tekkeköy mevkii,	1393	FJ430014

	Çavuşoğlu kaplıcası, Denizli - Sıcak su artezyen kuyusu – toprak		
C226	Buharkent, Tekkehamam-Tekkeköy mevki, Çavuşoğlu kaplıcası, Denizli - Sıcak su artezyen kuyusu – toprak	1395	FJ430015
C304	Buharkent, Tekkehamam İnalı mevki, Denizli - Sıcak su artezyen kuyusu – sediment	1417	FJ429574
D195	Dikili, Kaynarca, Kocaoba Mevkii, İzmir - Sıcak su artezyen kuyusu – sediment	1401	FJ430023
D413	Dikili, Çamur ılıcası, İzmir - Sıcak su artezyen kuyusu – toprak	1395	FJ430040
D494	Dikili, Kaynarca, Kocaoba Mevkii, İzmir - Sıcak su artezyen kuyusu – sediment	1404	FJ430045
D504	Dikili, Kaynarca, Kocaoba Mevkii, İzmir - Sıcak su artezyen kuyusu – sediment	1386	FJ430047
D621	Dikili, Kaynarca, Kocaoba Mevkii, İzmir - Sıcak su artezyen kuyusu – toprak	138	FJ430050
D623	Dikili, Kaynarca, Kocaoba Mevkii, İzmir - Sıcak su artezyen kuyusu – toprak	1391	FJ430051
D642	Dikili, Kaynarca, Kocaoba Mevkii, İzmir - Sıcak su artezyen kuyusu – toprak	1393	FJ430052
E134	Altınsu Mahallesi, Kozaklı, Nevşehir - Sıcak su artezyen kuyusu – su	751	EU477771
E173a	Kozaklı Belediye kaplıcası, □Bağlıca vadisi içi, Kozaklı, Nevşehir –toprak	1400	FJ430056
E173b	Kozaklı Belediye kaplıcası, Bağlıca vadisi içi, Kozaklı, Nevşehir –toprak	1393	FJ430057
E265	Altınsu Mahallesi, Kozaklı, Nevşehir - Sıcak su artezyen kuyusu – sediment	1432	FJ429590
E334	Altınsu Mahalesi, Kozaklı, Nevşehir - Sıcak su artezyen kuyusu - kaynak içindeki ağaç dalı	1431	FJ429594
F84a*	Kızılcahamam, İmamhatip mevki, Ankara -KD-1 MTA sondaj kuyusu – sediment	□65	EU477772
F84b*	Kızılcahamam, İmamhatip mevki, Ankara -KD-1 MTA sondaj kuyusu – sediment	1400	EU477773

3.2 Standart Termofilik Suşlar

Bu çalışmada, kültür koleksiyonumuzda mevcut olan 13 adet standart suş kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Bu standart suşların termostabil lipaz aktiviteleri belirlenmiş ve izolatların enzim üretim miktarlarıyla karşılaştırmak amacıyla kullanılmışlardır.

Çizelge 3.2 Standart termofilik basil suşları

Standart termofilik basil suşları
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 22 ^T
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 43223
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 5934
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T
<i>Anoxybacillus caldoproteolyticus</i> DSM 15730 ^T
<i>Geobacillus toebii</i> DSM 14590 ^T
<i>Anoxybacillus tepidamans</i> DSM 16325 ^T
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> DSM 5366 ^T
<i>Geobacillus kaustophilus</i> DSM 7263 ^T
<i>Geobacillus vulcanii</i> DSM 13174 ^T
<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM 3670 ^T
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 ^T
<i>Anoxybacillus thermarum</i> DSM 17141 ^T

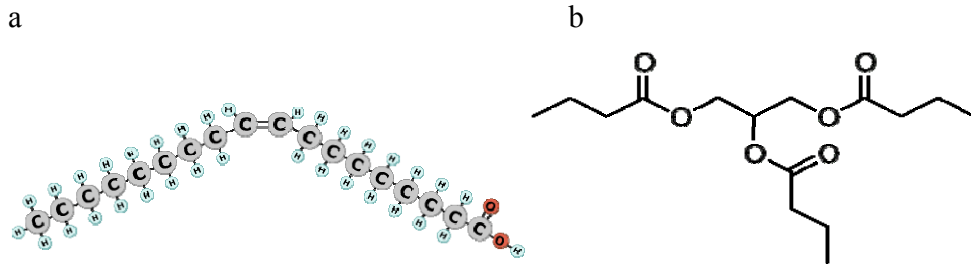
3.3 İzolatların 16S rRNA Gen Dizilerine Göre Filogenetik Analizleri

İzolatların 16S rRNA gen dizileri 27F ve 1492R primerleri kullanılarak daha önceki çalışmalarda çıkarılmış olup (Cihan vd. 2011a), bu dizilerin aksesyon numaraları GenBank'da mevcuttur. İzolatların mevcut 16S rRNA gen dizilerinin filogenetik analizlerinde, daha önce çalışılmış referans suşlarla homolojilerini araştırmak amacıyla, NCIB internet sitesindeki BLASTN arama programı kullanılmıştır. 16S rRNA gen dizileri Clustal W programı kullanılarak sıralanmıştır (Thompson vd. 1994). Ağaç mesafesi matriksi Jukes ve Cantor 'un (1969) algoritması temel alınarak hesaplanmıştır. Filogenetik ağaç, neighbour-joining metodu ile oluşturulmuş ve MEGA 4 programı kullanılarak bootstrap numunelemesi (1000 replicates) ile değerlendirilmiştir (Kumar vd. 2004).

3.4 Termofilik İzolat Ve Standartların Lipaz Üretimlerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi

İzolatların lipaz üretim kapasitelerinin kalitatif olarak belirlenmesinde, fenol kırmızısının pH indikatörü olarak yer aldığı *Tribütirin Agar* (2,5 g Meat ekstrakt, 3 g Yeast ekstrakt, 1 g CaCl₂, 10 ml tribütirin (Sigma-101019059), 30 g agar ve 0,1 g fenol kırmızısı/Lt, pH 7.0), (Abdel-Fattah vd. 2008) ve *Zeytin yağlı Agar* (3,25 g Nutrient Broth, 1 g CaCl₂, 10 g Gum Arabic (Sigma-101063254), 10 ml zeytinyağı (Sigma-101046151) ve 0,1 g fenol kırmızısı/Lt, pH 7.0), (Castro-Ochoa vd. 2005) besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar ve standartlar 5 ml'lik fenol kırmızı ve agar bulunmayan sıvı besiyerlerinde 24-48 saat 60°C'de geliştirildikten sonra kültürlerden 1'er ml santrifüj edilmiş ve ilk tarama aşamasında süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Fenol kırmızılı *Tribütirin ve Zeytin yağlı Agar* besiyerlerine boş diskler yerleştirilmiş ve enzim kaynağından bu disklere 100 µl emdirilmiştir. 2 saat boyunca 60°C'de inkübasyona bırakılan petrilere sarı zon oluşumunun gözlemlendiği kültürlerde lipaz aktivitesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Yadav vd. 1998).

Bu çalışmada kullanılan zeytinyağının ve tribütirin kimyasal yapısı şekil 3.2'de verilmiştir. Zeytinyağı yağ asidi içeriği açısından çok zengindir. Ancak en yoğun bulunan yağ asidi oleik asittir. Tribütirinde yağ asidi olarak sadece bütirik asit bulunmaktadır.



Şekil 3.2 Zeytinyağı ve Tribütirin kimyasal yapısı. a: Oleik asit, b: bütirik asit

3.5 Kalitatif Olarak Lipaz Aktivitesi Gösteren Termofilik Standart ve İzolatlarda Hücre Dışı Lipaz Üretimi

Termofilik izolatların enzim üretim zamanlarına bağlı olarak lipaz üretim miktarlarını daha doğru şekilde belirleyebilmek amacıyla, enzim üretim besiyerlerinden 24. saat, 48. saat ve 72. saatlerde örnek alınmış ve bu örneklerden lipaz aktivitesi ölçümleri yapılmıştır.

Kalitatif ölçümlerde olduğu gibi kültürler iki farklı substratın kullanıldığı iki ayrı besiyerinde geliştirilmiştir. Substrat olarak *tribütirinin* kullanıldığı besiyeri 1L'si 2,5 g Meat ekstrakt, 3 g Yeast ekstrakt, 1 g CaCl₂ ve 10 ml tribütirin (pH 7.0), (Abdel-Fattah vd. 2008), *zeytin yağının* substrat olarak kullanıldığı besiyerin 1L'si 3,25 g Nutrient Broth, 1 g CaCl₂, 10 g Gum Arabic ve 10 ml zeytinyağı (pH 7.0), (Castro-Ochoa vd. 2005) ile hazırlanmıştır. Her bir kültür, ön aktifleştirme için önce hem tribütirinli hem de zeytinyağlı katı besiyerinde 18 saat 55°C'de üretilmiştir. Daha sonra bu iki farklı besiyerinde geliştirilen kültürlerin absorbansları serum fizyolojik ile 0.2-0.4 OD arasında olacak şekilde iki farklı tüpte ayarlanmış, her bir OD ayarlanmış tüpteki bulanık kültür 5 ml'lik *tribütirinli ve zeytin yağlı* besiyerlerine 1/10 oranında (500 µl) aşılacaktır. *Tribütirinli ve zeytin yağlı* sıvı kültürler önce 55°C'de, 250 rpm'de 6 saat geliştirilmiş ve bu ön aktifleştirme kültürlerinden de yine 1/10 oranında olacak şekilde 5 ml'lik 3 adet *tribütirinli ve 5 ml'lik 3 adet zeytin yağlı* esas enzim üretim besiyerine alınmış, 55°C'de, 72 saat süresince 250 rpm'de çalkalamalı olarak geliştirilmiştir. Her iki substrat için de üç tekrarlı olarak çalışılan her bir tüpten, daha önce daraları alınan tüplere, 24, 48 ve 72. saatlerde 1'er ml aktarılmış, 13.000 rpm'de, 4°C'de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatantın pH'sı ölçülmüş ve enzim kaynağı olarak ayrılmıştır. Santrifüj sonrası darası alınmış tüplerin dibinde kalan bakterilerin yaş ağırlıkları ölçülüp, mg cinsinden hücre miktarları hesaplanmıştır.

3.6 Kantitatif Lipaz Aktivite Tayini

Enzim reaksiyonunda substrat olarak *para*-nitrofenol Bütirat (*p*NPB) kullanılmıştır. Reaksiyon çözeltisi 100 mM pH 7.0'lik fosfat tamponu, etanol ve 50 µM'lık *p*NPB'nin sırasıyla 95:4:1 oranlarında karışımı ile hazırlanmıştır. Reaksiyon çözeltisinden ependorflara 0.9 ml dağıtılmış ve üzerine 0.3 ml enzim kaynağından konulup, reaksiyon 60°C'de 15 dakika boyunca devam etmiştir. 15 dakika sonunda reaksiyon tüplerinin -20°C'de 8 dakika bekletilmeleri ile reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra mikropate okuyucuda 400 nm dalga boyundaki absorbansları üç tekrarlı olarak ölçülmüştür (Lee vd. 1999).

Sonuç olarak, iki farklı substratın üç tekrarlı çalışılmış tüpünden elde edilen üç farklı absorbans değerinin ortalaması alınmış ve lipaz aktivitesi öncelikle U/ml cinsinden hesaplanmıştır. İzolatların lipaz üretimlerini karşılaştırabilmek amacıyla, her bir tüpün lipaz aktivitesi kendine ait pelet ağırlığına bölünerek izolatların yaş hücre ağırlıklarına (U/mg) bağlı olarak oluşturdukları lipaz aktivitelerine göre bir dizin oluşturulmuştur.

3.7 Enzim Ünitesinin Hesaplanması

0.0125, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.150, 0.200, 0.250, 0.300 mM konsantrasyonlarındaki *para*-nitrofenol'ün 60°C'de, pH 7.0'deki absorbans değerleri 400 nm'de okutularak, L/mM cinsinden ekstinksiyon (absorbsiyon) katsayı 5.081 olarak hesaplanmış ve enzim aktivitesi hesabında kullanılmıştır.

Bir ünite (U/ml) lipaz, dakikada 1 µmol *p*-nitrofenolün 400 nm'de, 60°C'de ve pH 7.0'de oluşumu için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim ünitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Ünite/ml enzim} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_f}{\epsilon_{400\text{nm}} \times t \times b \times V_e}$$

OD = Optik yoğunluk

$\Delta\text{OD} = \text{OD}_{400\text{nm}}\text{Örnek} - \text{OD}_{400\text{nm}}\text{Kör}$

V_f = Toplam reaksiyon hacim (1.2 ml)

$\epsilon_{400\text{nm}}$ = *p*-nitrofenolün 400 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı (pH 7.0, 60°C)
(5.081 L/mM)

t = Reaksiyon zamanı (15 dakika)

b = Işık geçiş yolu (1 cm)

V_e = Reaksiyon karışımındaki enzim hacmi (0.3 ml) (Halvorson 1966)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Termofilik İzolatların 16S rRNA Gen Dizilerinden Elde Edilen Filogenetik Analiz Sonuçları

Daha önceki çalışmalarda, tez kapsamında kullanılan 32 adet termofilik izolatın tamamının Gram (+), hareket edebilen, katalaz (+) ve spor oluşturabilen çubuk şeklindeki hücrelerden oluştuğu belirlenmiştir. İzolatlar *Bacillacea* familyasının temel karakterlerini gösterdiklerinden, sporlu termofilik basil türleri olarak tanımlanmıştır (Coleri A. 2007). İzolatların önceki çalışmalarımızda çıkarılan 16S rRNA gen dizileri temel alınarak oluşturulmuş evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç, tez kapsamında yeniden çıkarılmış ve Şekil 4.1’de sunulmuş olup, izolatlar ağaçta toplam 4 farklı termofilik cins ile biraraya toplanıp kümelenmişlerdir.

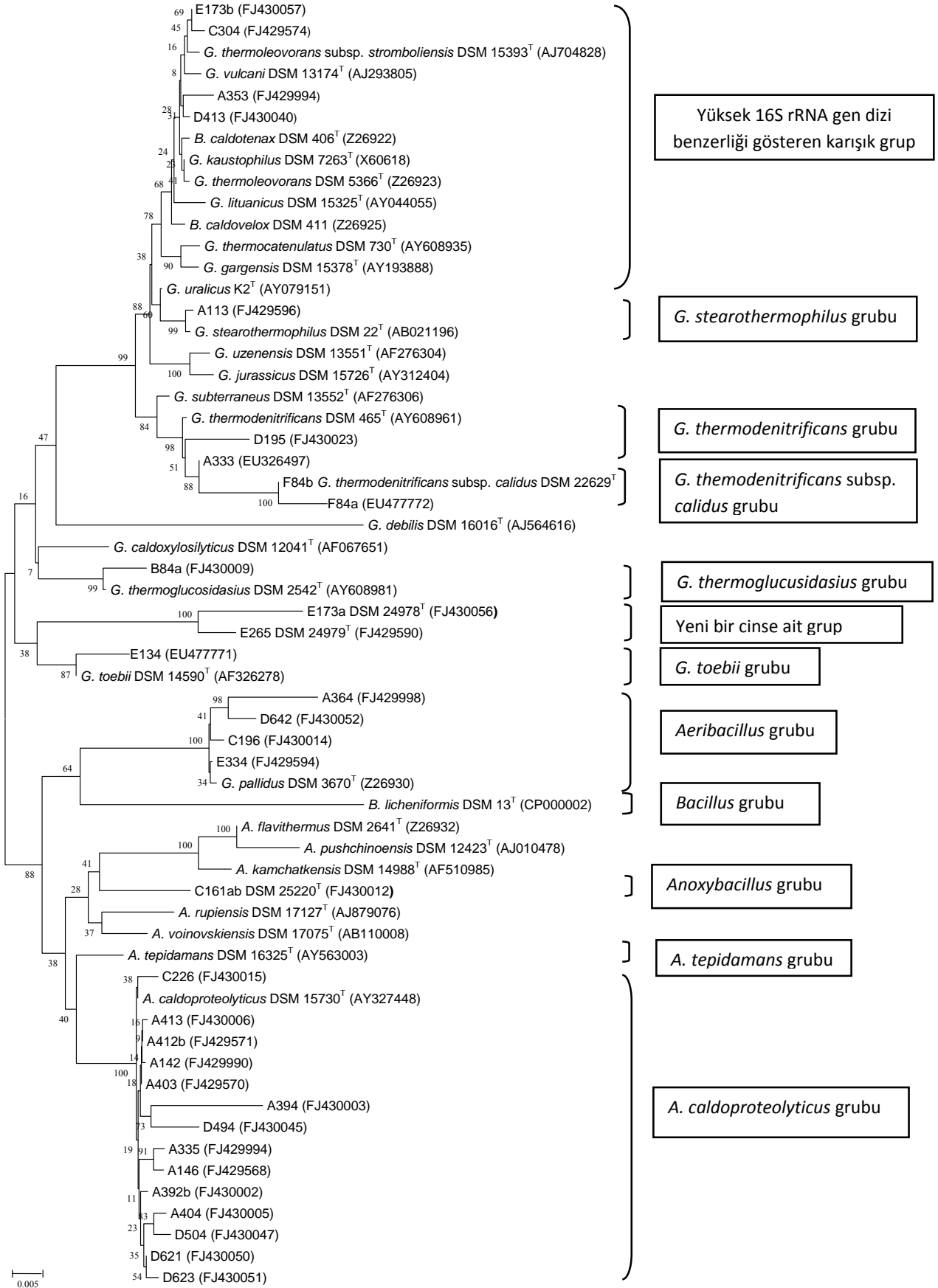
Otuz iki adet 16S rRNA geninin dizi analizleri sonucunda, termofilik izolatların *Bacillaceae* familyasına dahil *Aeribacillus* (4 adet), *Anoxybacillus* (1 adet) ile *Geobacillus* cinslerine (25 adet) dahil oldukları ve 2 adet izolatın ise bu cinslerin dışında kalan yeni termofilik endospor oluşturan basiller oldukları belirlenmiştir. Filogenetik analizler neticesinde, izolatlar toplam 10 filogenetik grup oluşturmuşlardır. Buna göre, izolatların yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren karışık gruptaki türlere (4 adet), *G. stearothermophilus* (1 adet), *G. thermodenitrificans* (2 adet), *G. themodenitrificans* subsp. *callidus* (2 adet), *G. thermoglucosidasius* (1 adet), *G. toebii* (1 adet), *A. caldoproteolyticus* (14 adet) ve *Aeribacillus pallidus* (4 adet) türlerine dahil oldukları görülmüştür. Bu izolatların en çok benzerlik gösterdikleri tip suşlarla olan 16S rRNA gen dizi benzerlikleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Ayrıca, C161ab izolatının 16S rRNA geninin filogenetik analizi sonuçlarında, *A. caldoproteolyticus* DSM 15730^T, *A. tepidamans* (*G. tepidamans*) DSM 16325^T, *A. rupiensis* DSM 17127^T, *A. voinovskiensis* DSM 17075^T ve *A. ayderensis* NCIMB 13972^T suşlarının, en çok benzerlik gösteren referans suşlar olduğu ve sırasıyla % 96.6, 96.1, 96.8, 96.8 ve % 96.2 oranlarında 16S rRNA gen dizi benzerliği sergiledikleri belirlenmiştir.

%97'den düşük bulunan 16S rRNA gen dizi benzerliği sonucuna göre C161ab izolatının, *Anoxybacillus* cinsine dahil yeni bir bakteri türü olduğu düşünülmektedir.

E173a ve E265 izolatlarının 16S rRNA gen dizi analizi sonuçları ise, Şu ana kadar tanımlanan *Bacillaceae* familyasına dahil tüm tip ŐuŐlar içerisinden en çok *G. toebii* E134 suşuna sırasıyla % 94.3 ve % 96.0, *G. toebii* DSM 14590^T tip suşuna ise % 94.2 ve % 95.0 oranlarında benzedikleri görülmüştür. E173a ve E265 izolatlarının birbirlerine benzerlik oranları % 97.5'dur. Diğer tanımlanmıŐ endospor oluŐturun basil türlerine benzerlik oranları ise % 94.5'un altındadır. Bir bakterinin 16S dizisinin diğer bir bakteriden % 5 farklılık göstermesi, onun yeni bir cins olduğunu gösterir (Stackebrandt *et al.* 2002). Buna göre, E173a ve E265 izolatlarının NCBI internet sitesindeki BLASTN arama programı kullanılarak yapılan DNA dizi analizi sonuçlarına göre, Őimdiye kadar tanımlanmıŐ mevcut referans suşların 16S rRNA genlerinden, sadece *G. toebii* tip suşu ile % 94.2 ve % 95.0 gibi düşük bir oranda benzerlik göstermeleri, bu iki bakterinin yeni bir cinse ait iki farklı bakteri türü olabileceklerine işaret etmektedir.

Yine nceki çalışmalarımızdan elde edilen verilere göre, F84a (DSM 22628^T) ve F84b (DSM 22629^T) izolatlarının, *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunun birer alttürü oldukları belirlenmiş ve *G. thermodenitrificans subsp. calidus* olarak adlandırılmıŐlardır. (Coleri vd. 2011b).



Şekil 4.1. Termofilik izolatlar ile *Geobacillus*, *Aeribacillus*, *Anoxybacillus* ve *Bacillus* cinsine ait endospor oluşturan temsilci üyelerin **16S rRNA gen dizileri** temel alınarak oluşturulmuş, evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç. Ağaç, neighbour-joining metodu ile oluşturulmuştur. Bootstrap değerleri (%) 1000 tekrara dayandırılarak elde edilmiş olup, bar her 100 nükleotid pozisyonundaki 0.005'lik bir yer değişikliğini işaret etmektedir.

Çizelge 4.1 Termofilik izolatların ve referans türlerin 16S rRNA genleri temel alınarak oluşturulmuş filogenetik grupları

Bakteriler	16S rRNA gen dizi benzerliği
1-Yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren karışık grup	
<i>G. vulcanii</i> DSM 13174 ^T	% 99.0-99.8 (İzolatların DSM 13174 ^T , DSM 5366 ^T ve DSM 7263 ^T ,ye)
<i>Geobacillus</i> sp. E173b	
<i>Geobacillus</i> sp. D413	
<i>Geobacillus</i> sp. C304	
<i>Geobacillus</i> sp. A353	
<i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366 ^T	
<i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 ^T	
2- <i>G. stearothermophilus</i> grubu	
<i>G. stearothermophilus</i> A113	% 99.8 (İzolatın DSM 22 ^T ,ye)
<i>G. stearothermophilus</i> DSM 22 ^T	
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223 ^T	
<i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934 ^T	
3- <i>G. thermodenitrificans</i> grubu	
<i>G. thermodenitrificans</i> D195	% 98.7-99.2 (İzolatların DSM 465 ^T ,ye)
<i>G. thermodenitrificans</i> A333	
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	
4- <i>G. themodenitrificans</i> subsp. <i>callidus</i> grubu	
<i>G. themodenitrificans</i> subsp. <i>callidus</i> F84a DSM 22628	% 98.3 (İzolatın DSM 22629 ^T ,ye)
<i>G. themodenitrificans</i> subsp. <i>callidus</i> F84b DSM 22629 ^T	
5- <i>G. thermoglucosidasius</i> grubu	
<i>G. thermoglucosidasius</i> B84a	% 99.2 (İzolatın DSM 2542 ^T ,ye)
<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ^T	
6- Yeni bir cinse ait grup	
E173a	% 97.5 (birbirlerine), % 94.2-95.0 (DSM 14590 ^T ,ye)
E265	
7- <i>G. toebii</i> grubu	
<i>G. toebii</i> E134	% 99.2 (İzolatın DSM 14590 ^T ,ye)
<i>G. toebii</i> DSM 14590 ^T	
8- <i>Aeribacillus</i> grubu	
<i>Aeribacillus</i> sp. A364	% 98.0-99.2 (İzolatların DSM 3670 ^T ,ye)
<i>Aeribacillus</i> sp. C196	
<i>Aeribacillus</i> sp. D642	
<i>Aeribacillus</i> sp. E334	
<i>A. pallidus</i> DSM 3670 ^T	
9- <i>Anoxybacillus</i> grubu	
C161ab	% 96.8 (İzolatın DSM 17127 ^T ve DSM 17075 ^T ,ye), % 96.6 (DSM 15730 ^T ,ye)
10-A. <i>caldoproteolyticus</i> grubu	

<i>A. caldoproteolyticus</i> A413	% 97.9-99.9 (İzolatların DSM 15730 ^T 'ye)
<i>A. caldoproteolyticus</i> A404	
<i>A. caldoproteolyticus</i> D504	
<i>A. caldoproteolyticus</i> DSM 15730 ^T	
<i>A. caldoproteolyticus</i> A403	
<i>A. caldoproteolyticus</i> A394	
<i>A. caldoproteolyticus</i> A412b	
<i>A. caldoproteolyticus</i> C226	
<i>A. caldoproteolyticus</i> D621	
<i>A. caldoproteolyticus</i> D623	
<i>A. caldoproteolyticus</i> A146	
<i>A. caldoproteolyticus</i> A142	
<i>A. caldoproteolyticus</i> D494	
<i>A. caldoproteolyticus</i> A392b	
<i>A. caldoproteolyticus</i> A335	

4.2 Termostabil Lipaz Tarama Sonuçları

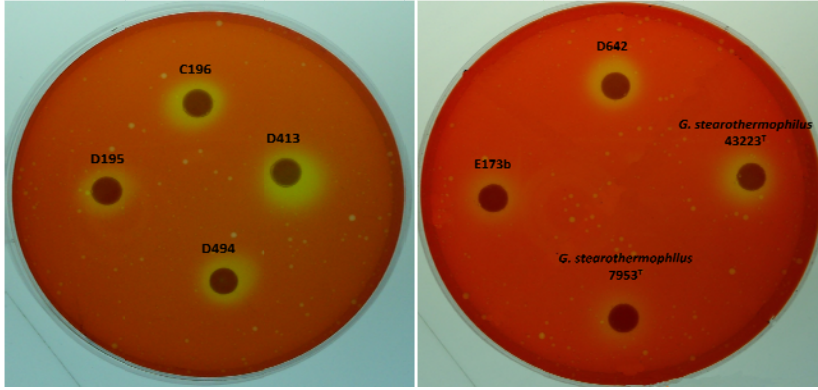
Bu tez çalışmasında 32 izolat ve 13 adet standart suş olmak üzere toplam 45 termofilik bakteride termostabil lipaz enziminin taraması yapılmıştır (Çizelge 4.2). Çizelge 4.2’de de belirtildiği üzere, tarama sonucunda 11 izolat ve 7 standart suşun zeytinyağlı ve tribütrinli iki farklı besiyerinde termostabil lipaz enzimleri ürettikleri saptanmıştır.

Çizelge 4.2. 32 izolat ve 13 standart suşun termostabil lipaz tarama sonuçları

Bakteri Kodu	Lipaz üretimi		Bakteri Kodu	Lipaz üretimi	
	Zeytinyağı	Tribütirin		Zeytinyağı	Tribütirin
A113	+	+	D623	-	-
A142	-	-	D642	+	-
A146	-	-	E134	-	-
A333	-	-	E173a	-	-
A335	-	-	E173b	+	-
A353	+	-	E265	-	-
A364	-	-	E334	-	-
A392b	-	-	F84a	+	+
A394	-	-	F84b	+	-
A403	+	-	<i>G. stearothermophilus</i> DSM12980 ^T	+	+
A404	-	-	<i>G. stearothermophilus</i> DSM 43223 ^T	+	+
A412b	-	-	<i>G. stearothermophilus</i> DSM 7953 ^T	+	+
A413	-	-	<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ^T	-	-
B84a	-	-	<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	+	-
C161ab	-	-	<i>A. caldoproteolyticus</i> DSM 15730 ^T	-	-
C196	+	-	<i>G. toebii</i> DSM 14590 ^T	+	-
C226	-	-	<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 ^T	-	-
C304	-	-	<i>Aeriballius pallidus</i> DSM 3670 ^T	-	-
D195	+	-	<i>G. thermoleovarans</i> DSM 5366 ^T	-	-
D413	+	+	<i>Anoxybacillus thermarum</i> DSM 17141 ^T	-	-
D494	+	-	<i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 ^T	+	-
D504	-	-	<i>G. vulcani</i> DSM 13174 ^T	+	-
D621	-	-			

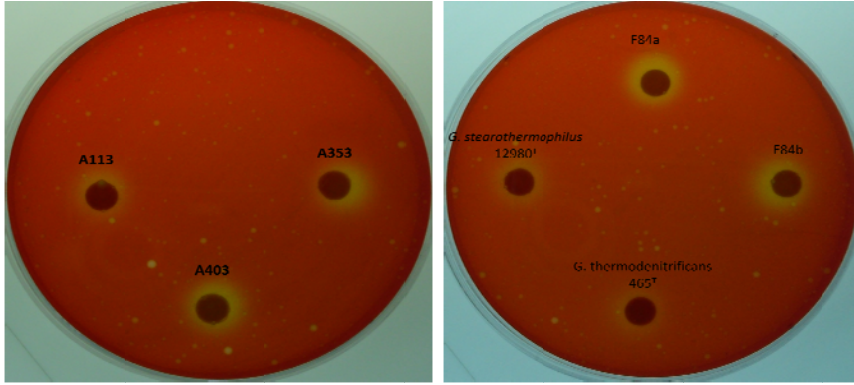
Yapılan termostabil lipaz enzimi tarama sonuçlarına göre, bakteri süpernatantlarındaki lipaz varlığı, pH düşüşünden kaynaklı olarak renk açılmasıyla tespit edilmiştir. Şekil 4.2 f.'de görüldüğü gibi lipaz enziminin mevcut olmadığı süpernatantlarda (negatif kontrol) pH düşmemiş ve renkte bir açılma gözlenmemiştir. Lipaz enziminin varlığının kalitatif olarak taranması esnasında, bakteriyel üremeye bağlı olarak gerçekleşen pH değişimi ile oluşabilecek renk değişikliğinin önüne geçebilmek için kültürler öncelikli olarak santrifüj edilmiş, daha sonra süpernatant enzim kaynağı olarak tarama besiyerilerindeki boş disklerle emdirilmiştir.

Bu sonuçlara göre, F84a ve F84b, *G. termodenitrificans* DSM 465^T, *G. kaustophilus* 7263^T, *G. stearothermophilus* DSM 7953^T, *G. toebii* DSM 14590^T, *G. vulcani* DSM 13174^T, *G. stearothermophilus* DSM 43223^T, *G. stearothermophilus* DSM 12980^T, A353, E173b, A113, D413, D494, C196, D195, D642 ile A403 suşlarının zeytinyağlı ve F84a, F84b, *G. termodenitrificans* DSM 465^T, *G. stearothermophilus* DSM 7953^T, *G. stearothermophilus* DSM 43223^T, *G. stearothermophilus* DSM 12980^T ile A113 suşlarının hem zeytinyağlı hem de tribütirinli katı besiyerinde termostabil lipaz ürettikleri kalitatif olarak belirlenmiştir.



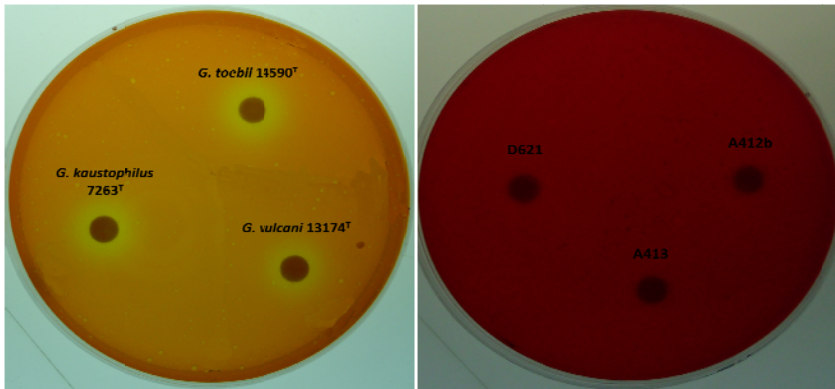
a.

b.



c.

d.



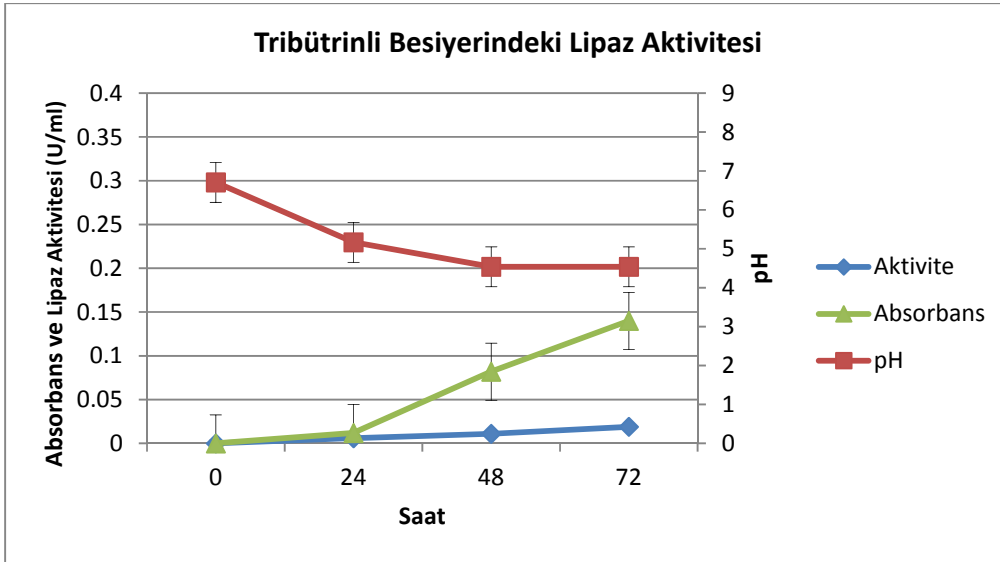
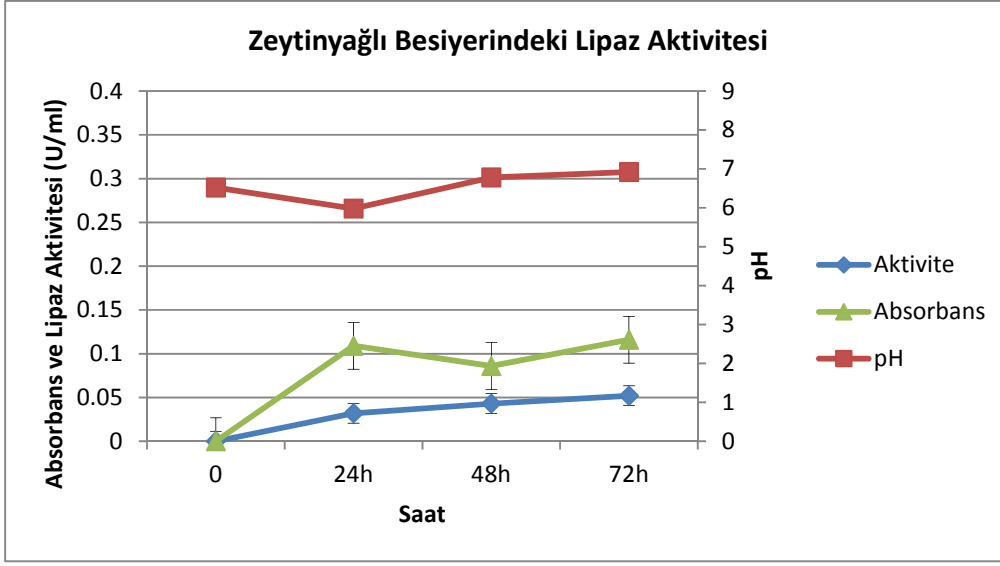
e.

f.

Şekil 4.2 Termostabil lipaz enzimi üretici bakterilerin zeytinyağlı besiyerinde verdikleri zonlar (Pozitif sonuçlar, a: C196, D413, D195, D494, b: E173b, D642, ATCC 43223, DSM 7953, c: A113, A353, A403, d: DSM 12980^T, F84b, DSM 465^T, e: DSM 14590^T, DSM 7263^T, DSM 13174^T. negatif sonuçlar, f: D621, A413, A412b)

4.3 Termostabil Lipaz Aktivite Değerleri

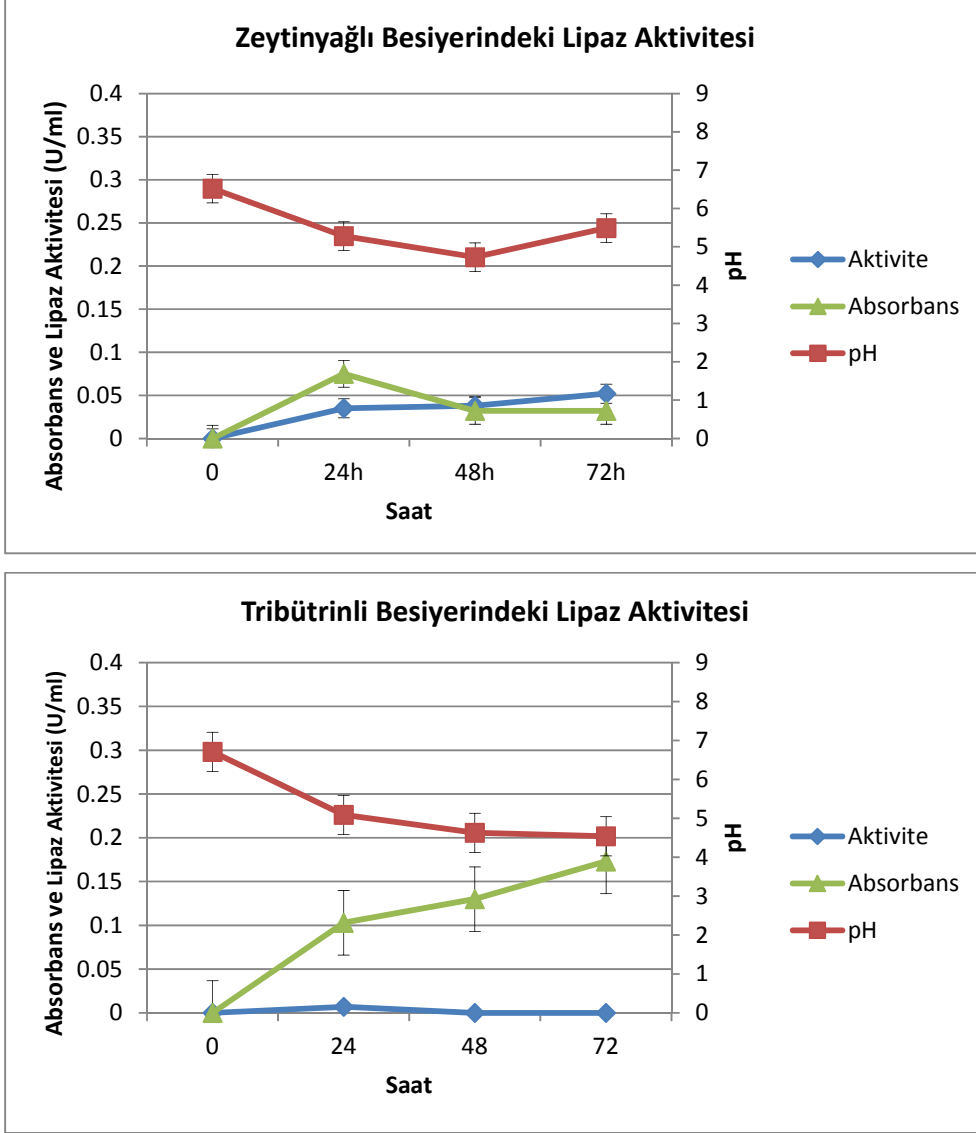
Şekil 4.3 ile 4.20 arasında sunulan grafiklerde termostabil lipaz enzimi aktivite değerleri, pH değişimi ve absorbans değerleri (bakteri üremesi) her bir bakteri türü için 24, 48 ve 72 saatlerde U/ml cinsinden ve lipaz enzim aktivitesi değerleri tüm bakterilerin karşılaştırılması amacıyla da şekil 4.21’de ve 4.22’de bakteri peletlerinin yaş ağırlıklarına bağlı olarak U/mg cinsinden grafiklendirilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.3.’de ve 4.4.’de suşların aktivite değerleri sırasıyla U/ml ve U/mg cinsinden verilmiştir.



Şekil 4.3 *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* F84a (DSM 22628) suşunun zeytin yağı ve tribütirinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

G. thermodenitrificans subsp. *calidus* (DSM 22628) F84a zeytinyağlı besiyerinde 72. saat sonunda en yüksek enzim aktivitesi değerine (0,052 U/ml) ulaşmış, absorbans değerisi ise 24. saate kadar oldukça artmış ve sonrasında değişmemiştir. 0-72 aralığında pH'da önemli bir değişim gözlenmemiştir. Tribütirinli besiyerinde üreme 24. saatten sonra başlamış ve zeytinyağlı besiyerine oranla daha iyi gelişmiştir (Şekil 4.3). pH değerisi 6.90'dan 4.50'ye

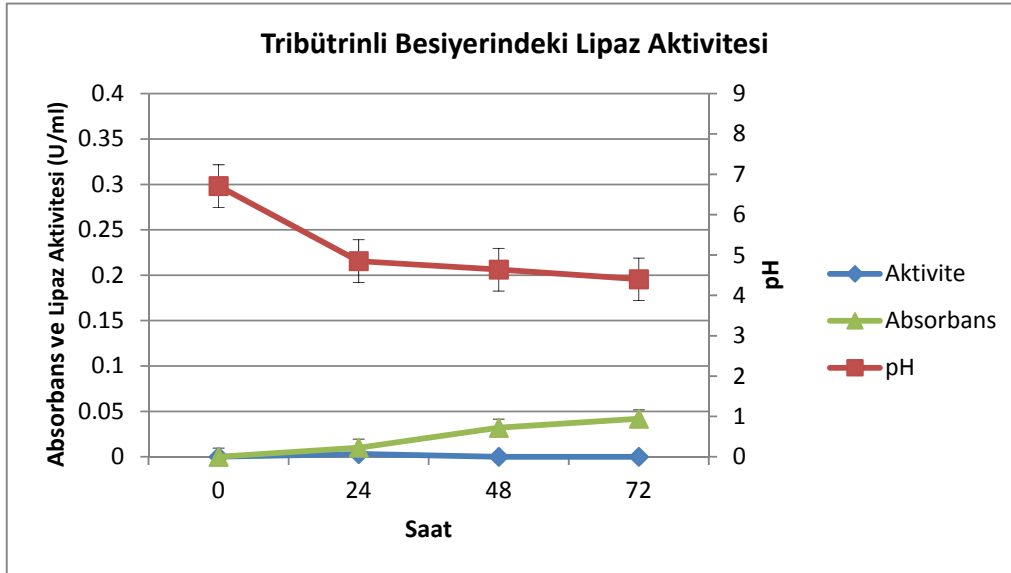
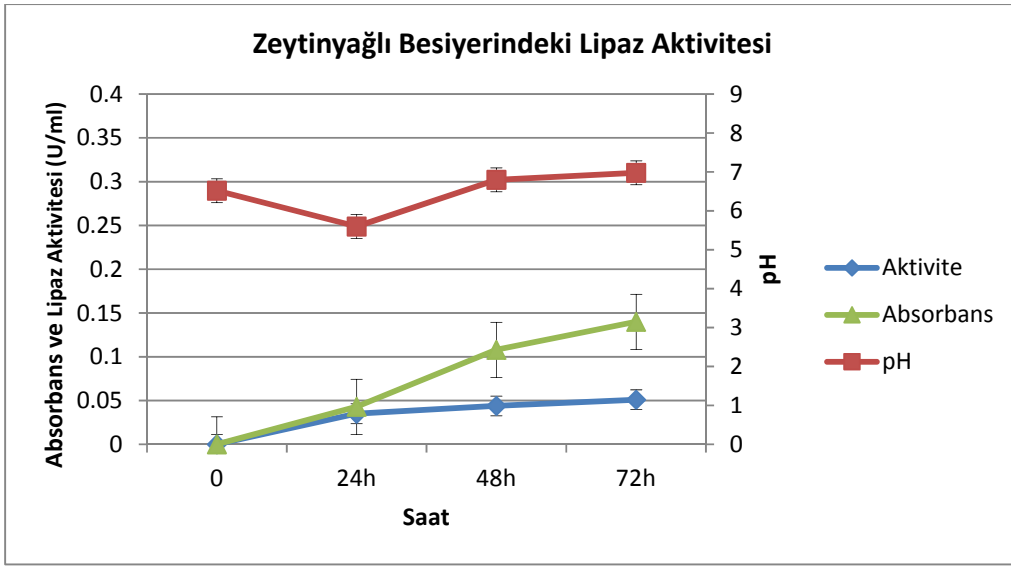
kadar düşmüştür. Tribütrinli besiyerindeki enzim aktivitesi zeytinyağlı besiyerine göre düşük kalmış ve en yüksek aktivite (0,019 U/ml) 72. saatte gözlenmiştir.



Şekil 4.4 *G. thermodenitrificans subsp. calidus* F84b (DSM 22629^T) suşunun zeytinyağlı ve tribütrinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

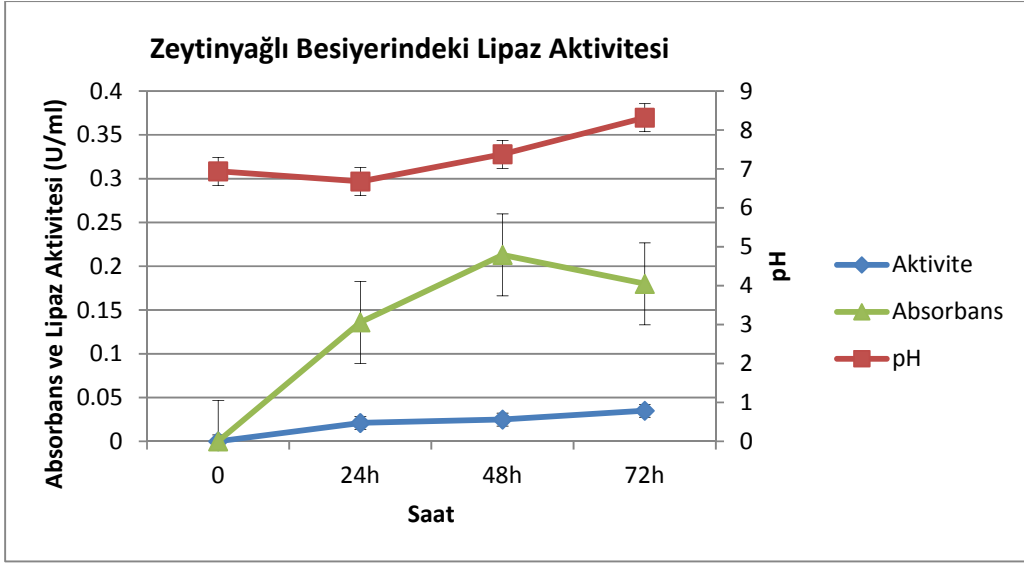
G. thermodenitrificans subsp. calidus F84b (DSM 22629^T) suşu zeytinyağlı besiyerinde 24 saat sonunda en yüksek absorbans değerine ulaşmıştır. Sonrasında azalan ve 48-72 saat aralığında sabit kalan absorbans değerine karşın en yüksek enzim aktivitesini (0,052 U/ml)

72. saatin sonunda göstermiştir. Bu değer çalışmadaki en yüksek enzim aktivitesi değerlerinden biridir. pH değerinde 48. saate kadar bir düşüş gözlenmiş, daha sonra pH değeri bir miktar artmıştır (Şekil 4.4). Bakteri gelişimi açısından bakıldığında tribütrinli besiyerinin daha çok tercih edildiği ancak tribütrinli besiyerinde lipaz aktivitesinin sadece 24. saatte ve oldukça düşük olduğu (0,007 U/ml) tespit edilmiştir.



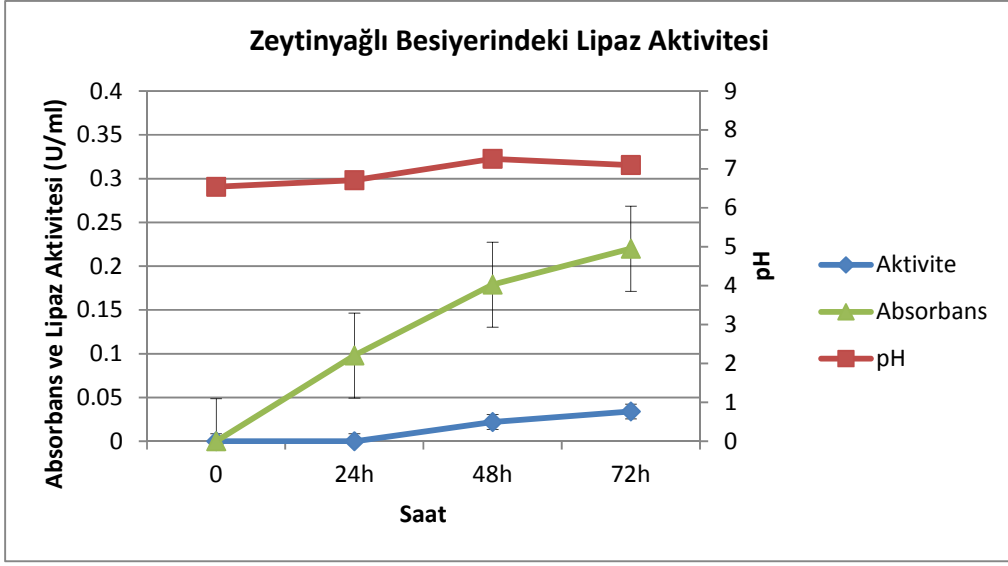
Şekil 4.5 *G. thermodenitrificans* DSM 465^T suşunun zeytin yağı ve tribütrinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

G. thermodenitrificans DSM 465^T suşunun zeytinyağlı besiyerinde 72 saat boyunca hem enzim aktivitesi (0,051 U/ml) (Şekil 4.5) hem de absorbans değeri artmış ve maksimum değerlere 72. saat sonunda ulaşmıştır. Bu enzim aktivitesi değeri çalışılan bakteriler arasındaki en yüksek değerlerden biridir. Bu suşun tribütrinli besiyerindeki üremesi zeytinyağlı besiyerine göre düşük kalmıştır. Tribütrinli besiyerindeki pH değeri oldukça düşerken (6.90'dan 4.50'ye kadar) zeytinyağlı besiyerinde önemli bir değişim olmamıştır.



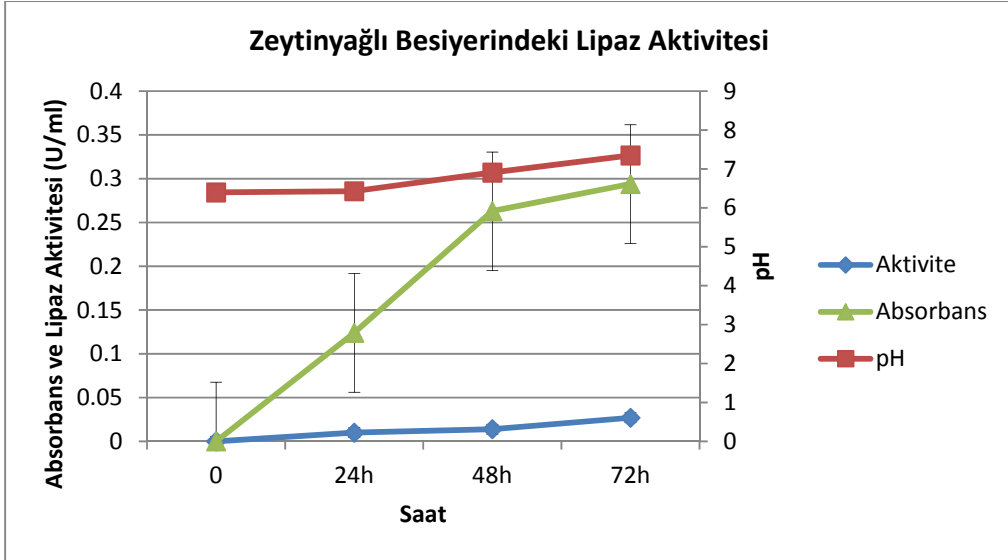
Şekil 4.6 A353 kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

A353 kodlu izolatın kültürü 48. Saatte en yoğun bulanıklığa ulaşmıştır. Enzim aktivitesinin en yüksek (0,035 U/ml) olduğu saat 72. saatir. pH değeri 24. saate kadar düşüş gösterirken daha sonrasında artma eğilimine girmiş ve pH 6.90'dan 8.30'a kadar yükselmiştir (Şekil 4.6).



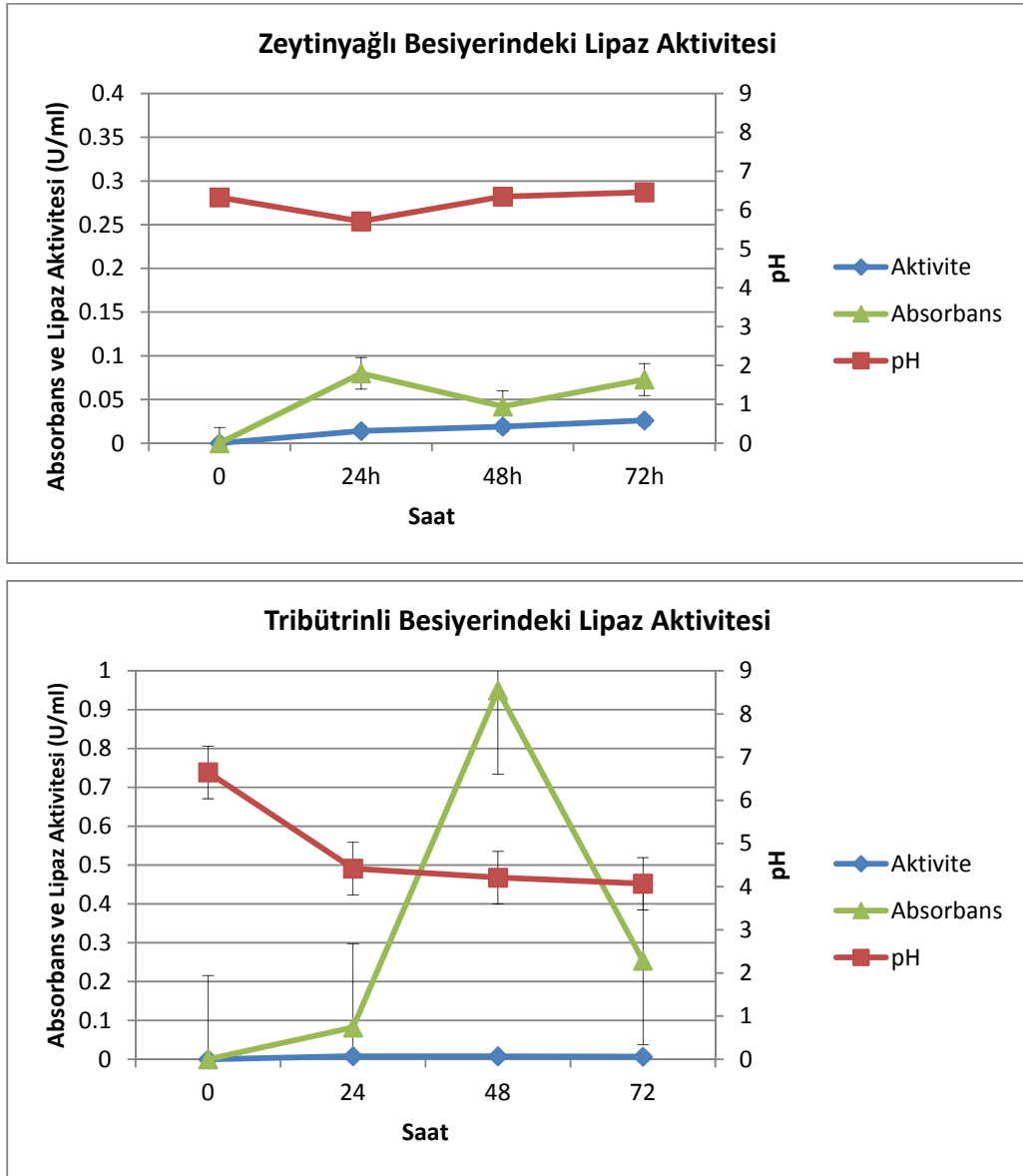
Şekil 4.7 *G. kaustophilus* DSM 7263^T suşunun zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

G. kaustophilus DSM 7263^T bakterisi, zeytinyağlı besiyerinde 24. saate kadar enzim aktivitesi göstermemiş; ancak 72. saate en yüksek lipaz aktivitesi (0,034 U/ml) gözlemlenmiştir. pH değeri zeytinyağlı besiyerinde diğer bakterilerden farklı olarak 24. saate de artmıştır. Bakteri üremesi sürekli artan bir eğri izlemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.8 E173b kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

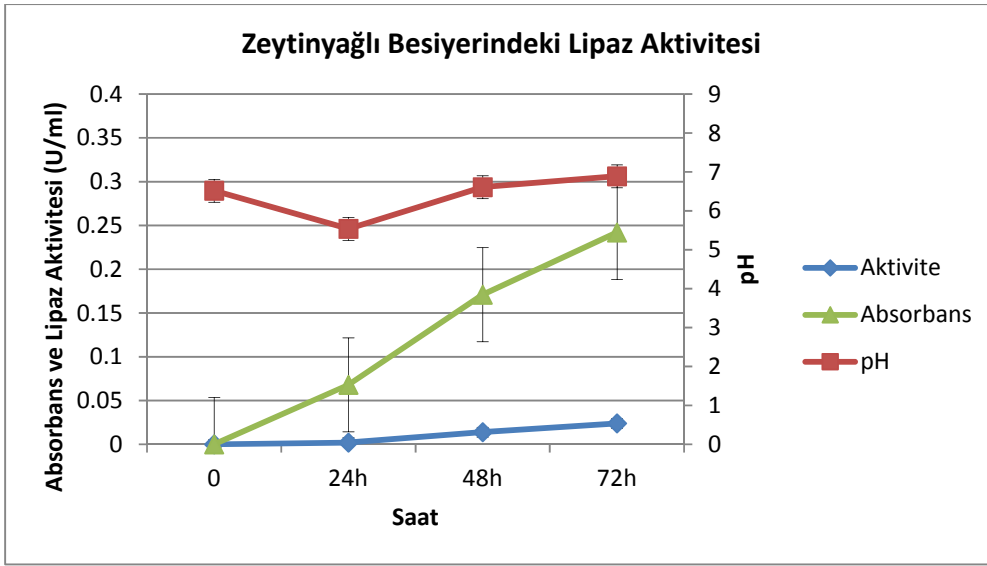
E173b kodlu izolat, zeytinyağlı besiyerinde 0-72 saat aralığında artan bir bakteri üremesi göstermiş ve en yüksek enzim aktivitesine (0,027 U/ml) 72. saatte ulaşmıştır (Şekil 4.8). pH değeri 24. saate kadar pek değışmemiş, sonrasında bir miktar artış göstermiştir.



Şekil 4.9 *G. stearothermophilus* DSM 7953 suşunun zeytin yağı ve tribütürlü besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğunu zamanla değışimi

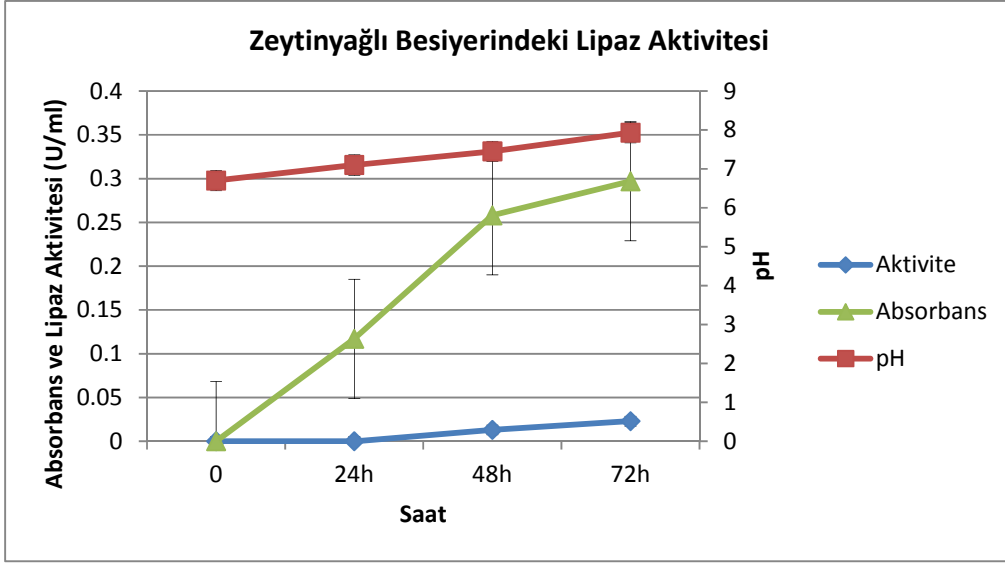
G. stearothermophilus DSM 7953 bakterisi, zeytinyağlı besiyerinde 72. saate kadar sürekli artan bir enzim aktivitesine sahiptir ve bu saatte en yüksek değere (0,026 U/ml) ulaşmıştır

(Şekil 4.9). 72 saat boyunca pH değerinde ve bakteri üremesinde önemli bir değişme gözlemlenmemiştir. Ancak tribütrinli besiyerinde 24-48 saat aralığında üreme oldukça artmış, 72. saat sonunda azalmıştır. Bu besiyerinde pH değeri zeytinyağlı besiyerine göre oldukça fazla bir düşüş göstermiştir. (pH 4.00 yaklaşmıştır). Tribütrinli besiyerindeki enzim aktivitesi (0,008 U/ml) ise çok düşük seviyede ölçülmüştür.



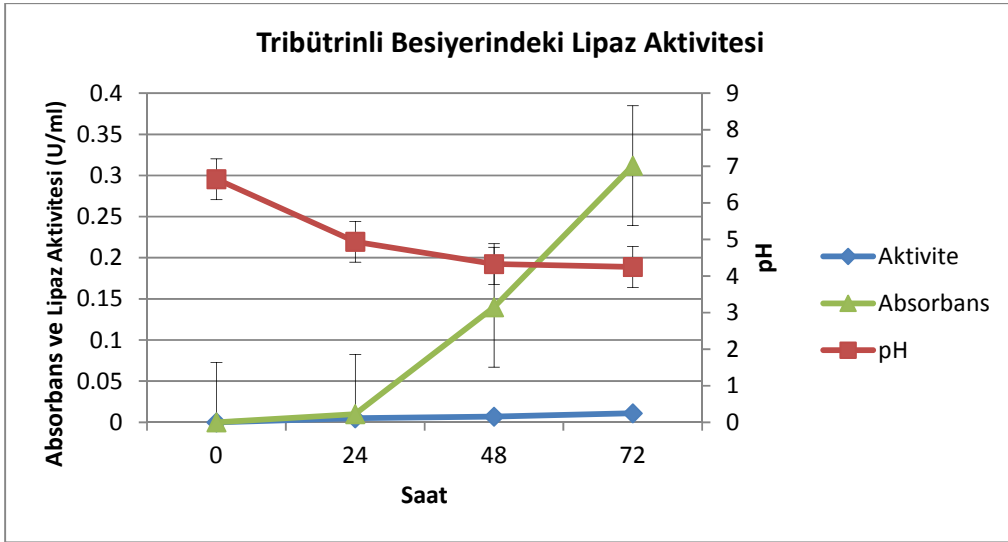
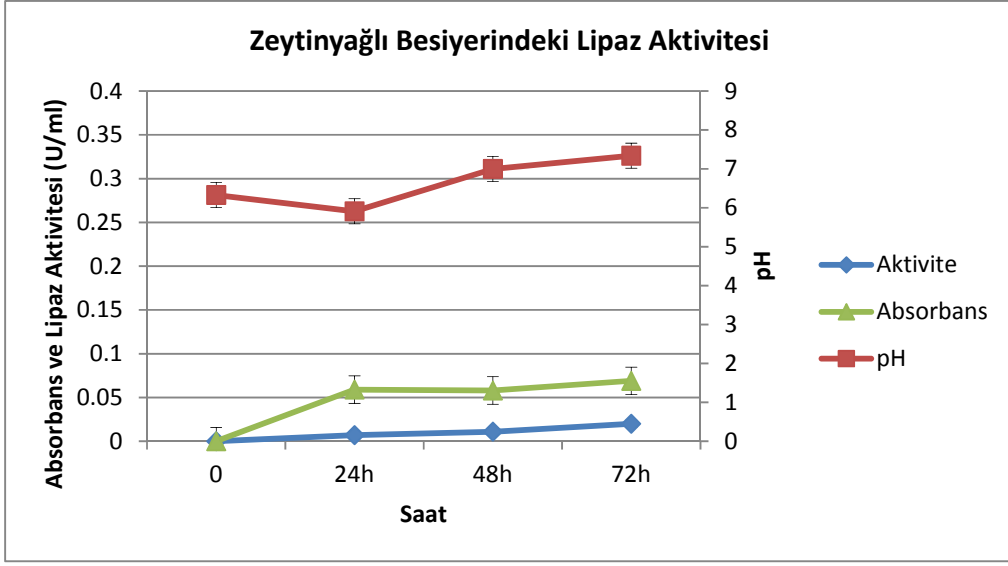
Şekil 4.10 *G. toebii* DSM 14590^T suşunun zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

G. toebii DSM 14590^T suşu, zeytinyağlı besiyerinde en yüksek aktivite değerine (0,024 U/ml) 72. saate ulaşmış ve enzim üretimi, üreme ile beraber doğru orantılı olarak gözlenmiştir. pH değeri 24 saat içerisinde düşmüş sonrasında yükselmiştir (Şekil 4.10).



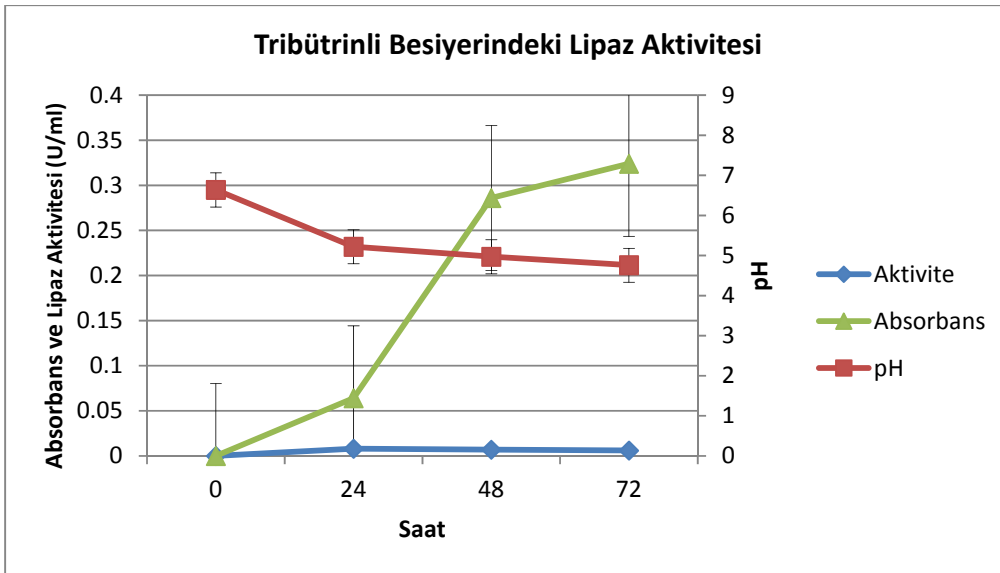
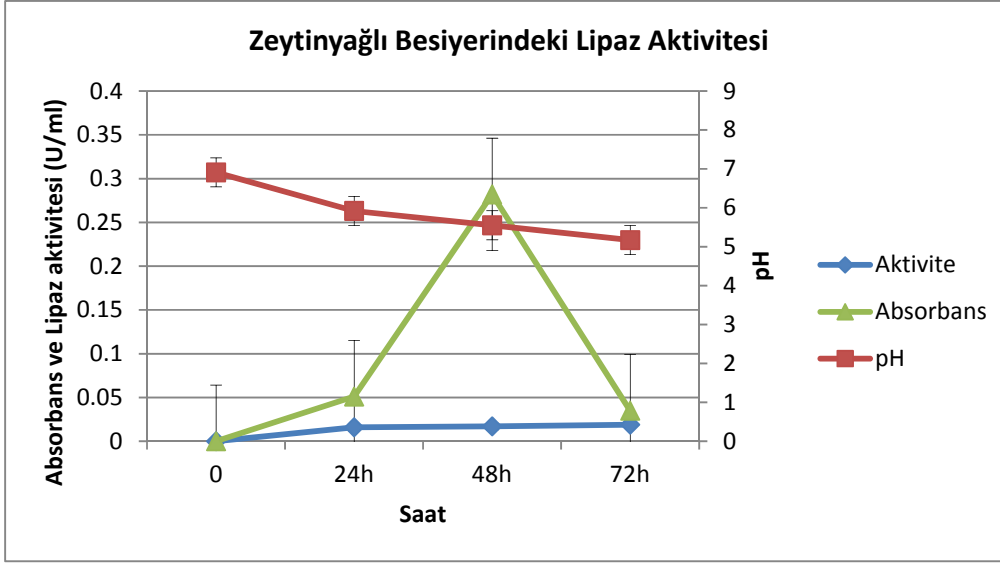
Şekil 4.11 *G. vulcani* DSM 13174^T suşunun zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

G. vulcani DSM 13174^T suşu, zeytinyağlı besiyerinde *G. kaustophilus* DSM 7263^T bakterisinde gözleendiği üzere, pH değerini hiçbir saat aralığında azaltmamış; aksine sürekli arttırmıştır (6.90'dan 7.85'e kadar). En yüksek aktivite değerine (0,023 U/ml) 72. saatte ulaşmıştır. 72. saat sonunda çok yoğun bir biçimde üremiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.12 *G. stearothermophilus* ATCC 43223 suşunun zeytin yağı ve tribütrinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

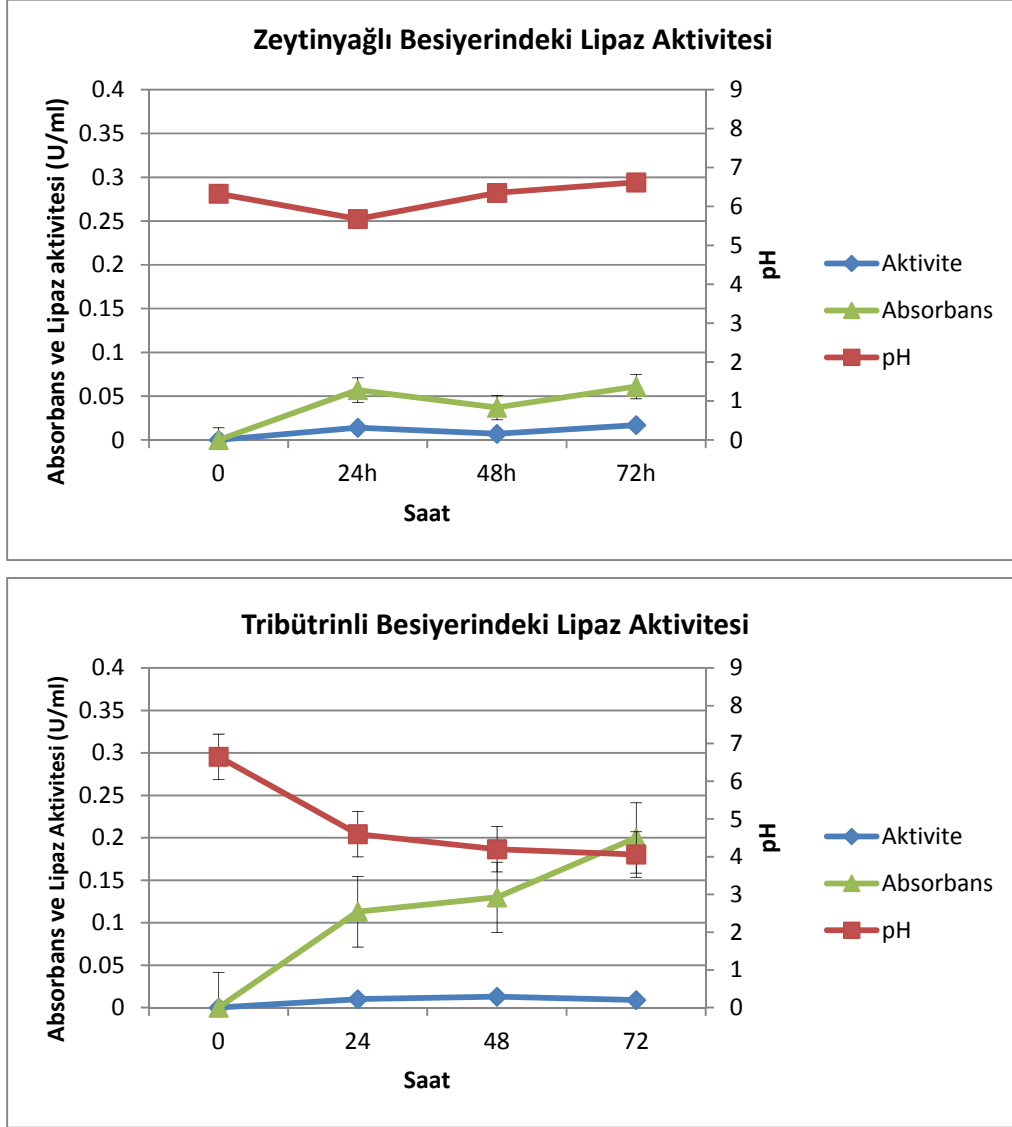
G. stearothermophilus ATCC 43223 suşu zeytinyağlı besiyerinde en yüksek aktivitesini (0,020 U/ml) 72. saatin sonunda göstermiştir. Bakteri üremesinin fazla olmadığı ve 72 saat sonunda pH değerinin 6.80'den 7.50'ye çıktığı gözlenmiştir. Buna karşı tribütrinli besiyerinde en yüksek enzim aktivitesi değeri (0,011 U/ml) 72. saat sonunda görülmüş olsa da, bu değer zeytinyağlı besiyerinin oldukça altında kalmıştır. Bununla beraber tribütrinli besiyerinde bakteri iyi gelişmiş ve pH değeri zeytinyağlı besiyerinin tersine 4.50'ye kadar düşmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.13 A113 kodlu izolatanın zeytin yağı ve tribütrinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

G. stearothermophilus A113 kodlu izolatta 24-72 saat aralığında enzim aktivitesi çok fazla değişmemiş; ancak en yüksek değere (0,019 U/ml) 72. saatin sonunda ulaşmıştır (Şekil 4.13). pH değeri 0-72 saat aralığı boyunca azalmış ve 72. saat sonunda 6.80'den 4.70'e kadar düşmüştür. 24-48 saat aralığında üreme oldukça artmış, 48-72 saat aralığında azalmaya başlamıştır. Tribütrinli besiyerinde ise üreme 0-72 saat boyunca artmış olup, pH değeri zeytinyağlı besiyerine benzer şekilde 6.90'dan 4.80'e kadar azalmıştır. Enzim

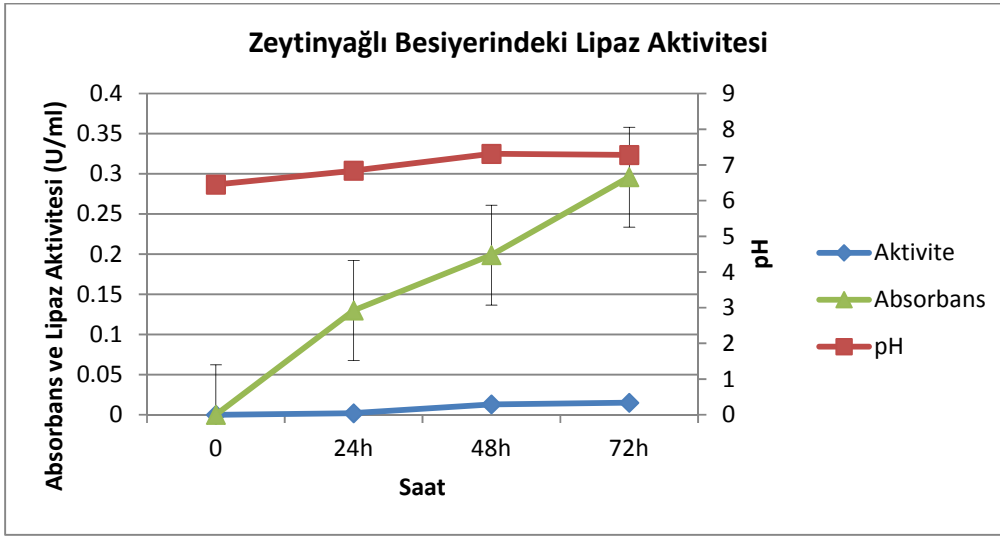
aktivitesi zeytinyağlı besiyerine oranla düşük kalmış, en yüksek aktivite (0,008 U/ml) 24. saatte gözlenmiş ve sonrasında düşüşe geçmiştir.



şekil 4.14 *G. stearothermophilus* DSM 12980^T suşunun zeytin yağı ve tribütrinli besiyerlerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

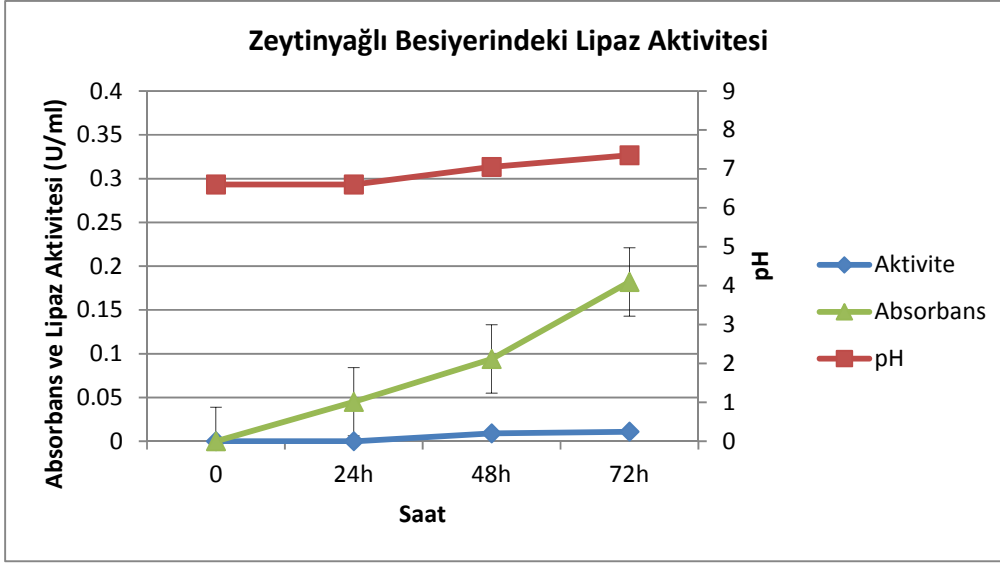
G. stearothermophilus DSM 12980^T zeytinyağlı besiyerinde kullanıldığında 24-48 saat aralığında enzim aktivitesinde önemli bir değişim olmamış ve en yüksek aktiviteye 72.

saatin sonunda (0,017 U/ml) ulaşmıştır (Şekil 4.14). Ancak bu besiyerinde yoğun bir bakteri üremesi görülmemiştir. Zeytinyağlı besiyerinde önemli bir pH değişimi olmamıştır. Bu suşun tribütrinli besiyerinde ise bakteri daha fazla üremiş; ancak enzim aktivitesi değeri zeytinyağlı besiyerinin altında kalmıştır. En yüksek enzim aktivitesi değeri (0,013 U/ml) 48. saatte ölçülmüştür. Tribütrinli besiyerinde pH değeri zeytinyağlı besiyerine oranla azalmış, pH 6.90'dan 4.00'a kadar düşmüştür.



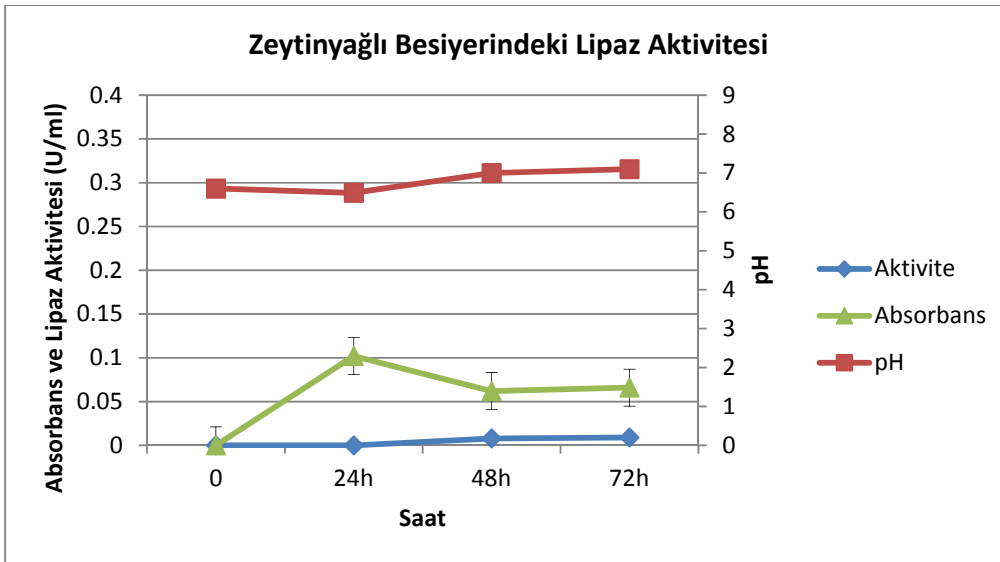
Şekil 4.15 D413 kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

D413 kodlu izolatın zeytinyağlı besiyerindeki enzim aktivitesi 24. saate kadar neredeyse sıfırdır. En yüksek enzim aktivite değerine (0,013) 72. saatte ulaşmıştır. 48. saate kadar pH artmış, 48-72 saat aralığında önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu bakteri özellikle zeytinyağlı besiyerinde oldukça iyi bir üreme göstermiştir (Şekil 4.15).



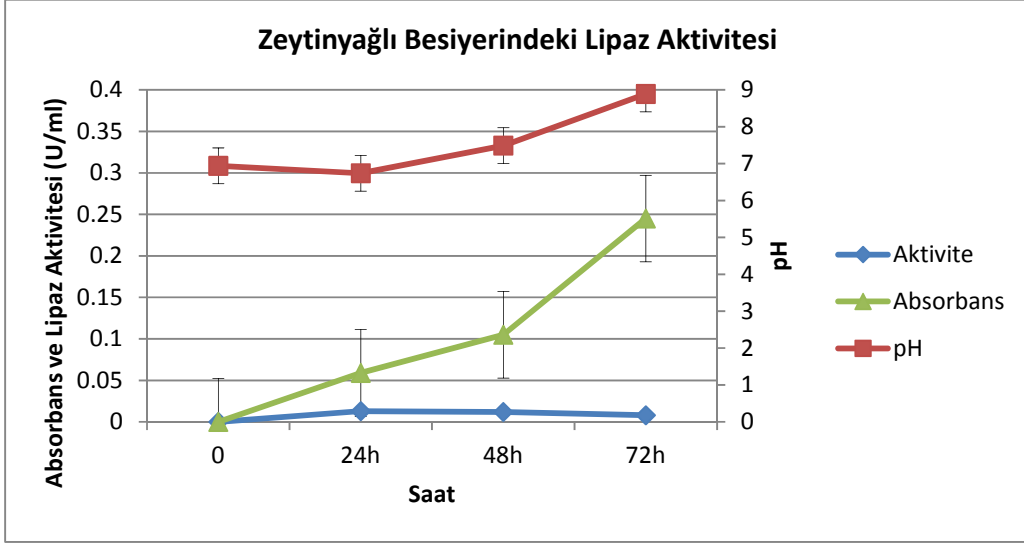
Şekil 4.16 D494 kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

D494 kodlu izolat, zeytinyağlı besiyerinde 24. saate kadar enzim aktivitesi göstermemiş, 48 ve 72. saatlerde çok az bir aktivite göstermiştir (0,011 U/ml) (Şekil 4.16). Bakteri yoğunluğu inkübasyon süresince artış göstermiştir. pH değerinde de az bir artış ölçülmüştür (6.70'den 7.40'a kadar).



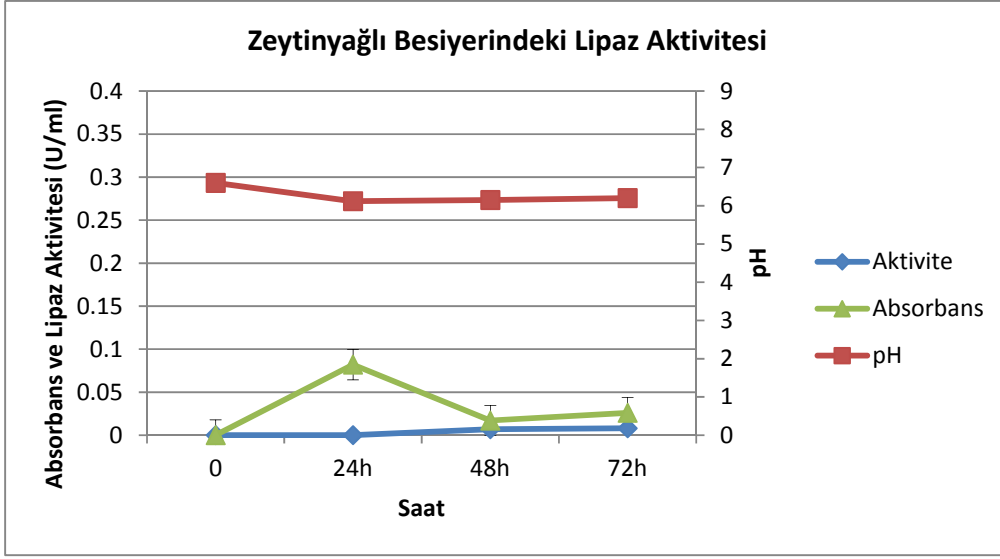
Şekil 4.17 C196 kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

C196 kodlu izolatın zeytinyağlı besiyerinde enzim aktivitesi (0,008 U/ml) düşük kalmıştır. pH değeri 72 saat sonunda bir miktar artmıştır. En yüksek üreme 24. saatte gözlenmiş sonrasında düşmüştür (şekil 4.17).



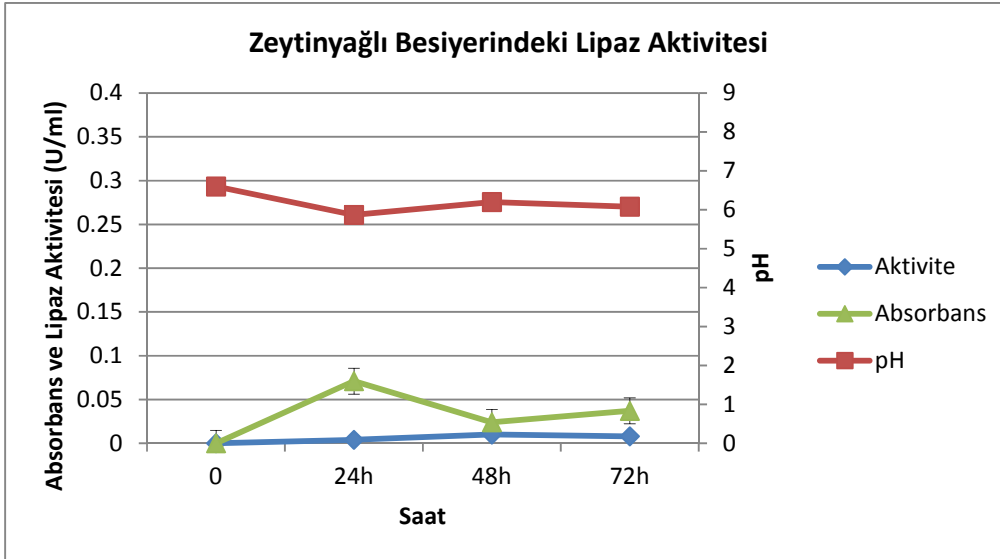
şekil 4.18 D195 kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'ın ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

A353 kodlu izolatta olduğu gibi D195 kodlu izolat, zeytinyağlı besiyerinde pH değeri 24. saat içerisinde düşmüş ancak sonrasında pH değeri 9.0'a yaklaşmıştır. En yüksek enzim aktivitesi değerine (0,013 U/ml) 24. saatte ulaşılmış, daha sonra aktivite azalmıştır. 0-72 saat süresince üremede artış gözlemlenmiştir (şekil 4.18).



Şekil 4.19 D642 kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'm ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

D642 kodlu, izolat zeytinyağlı besiyerinde düşük bir enzim aktivitesi değerine sahiptir (0,008 U/ml). pH değeri 24. saate kadar düşmüş, sonrasında değişmemiştir. Üremesi 24. saatte en yüksek değerine ulaştıktan sonra düşüşe geçmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.20 A403 kodlu izolatın zeytin yağlı besiyerindeki enzim aktivitesinin, pH'm ve optik yoğunluğun zamanla değişimi

A403 kodlu izolat zeytinyağlı besiyerinde düşük bir enzim aktivitesi (0,008 U/ml) göstermiştir (Şekil 4.20). Bu değere 48. saat sonunda ulaşmıştır. pH değerinde çok az bir düşüş gözlenmiştir. Üreme ise 24. saatin ardından azalmıştır.

Çizelge 4.3 Termostabil lipaz aktivitesi ölçümlerinin U/ml cinsinden değerleri (En yüksek lipaz aktivitesi değerleri koyu olarak verilmiştir)

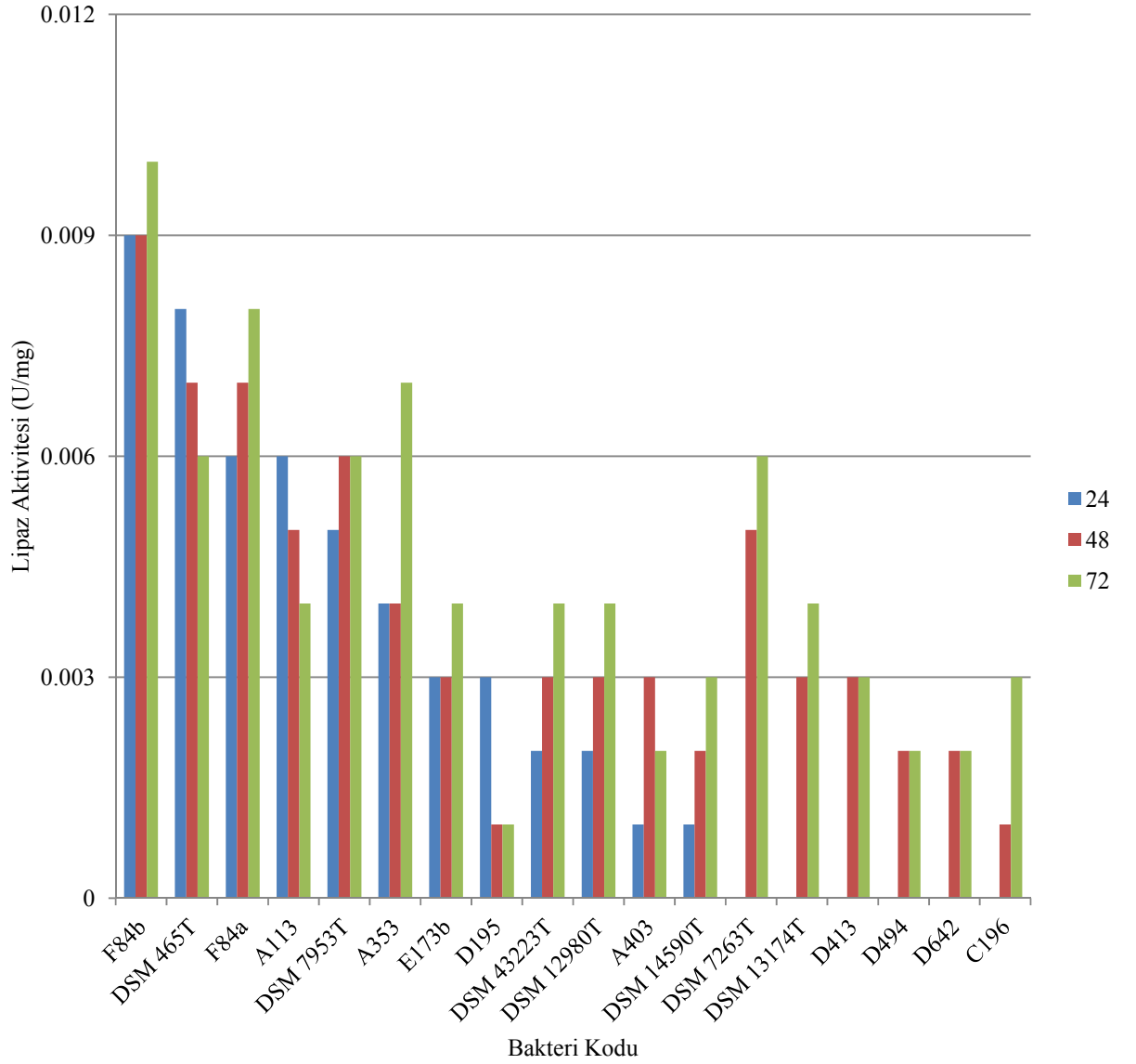
Bakteri	Lipaz aktivitesi (U/ml)					
	Enzim üretim besiyerindeki substrat					
	Zeytinyağı			Tribütirin		
	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
F84a	0,032	0,043	0,052	0,006	0,011	0,019
F84b	0,035	0,038	0,052	0,007	0	0
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T	0,035	0,044	0,051	0,003	0	0
A353	0,021	0,025	0,035	0	0	0
<i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 ^T	0	0,022	0,034	0,002	0,001	0,001
E173b	0,01	0,014	0,027	0	0	0
<i>G. stearothermophilus</i> DSM 7953	0,014	0,019	0,026	0,008	0,008	0,007
<i>G. toebii</i> DSM 14590 ^T	0,002	0,014	0,024	0	0	0
<i>G. vulcani</i> DSM 13174 ^T	0	0,013	0,023	0	0	0
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223	0,007	0,011	0,02	0,005	0,007	0,011
<i>G. stearothermophilus</i> A113	0,016	0,017	0,019	0,008	0,007	0,006
<i>G. stearothermophilus</i> DSM 12980 ^T	0,014	0,014	0,017	0,01	0,013	0,009
D413	0,002	0,013	0,015	0	0	0
D494	0	0,009	0,011	0	0	0
C196	0	0,008	0,009	0	0	0
D195	0,013	0,012	0,008	0	0	0
D642	0	0,007	0,008	0	0	0
A403	0,004	0,01	0,008	0	0	0

Çizelge 4.4 İzolat ve standart suşların enzim aktivitelerinin yaş ağırlıklarına (U/mg) bölünmesiyle elde edilen değerler (En yüksek lipaz aktivitesi değerleri koyu olarak verilmiştir)

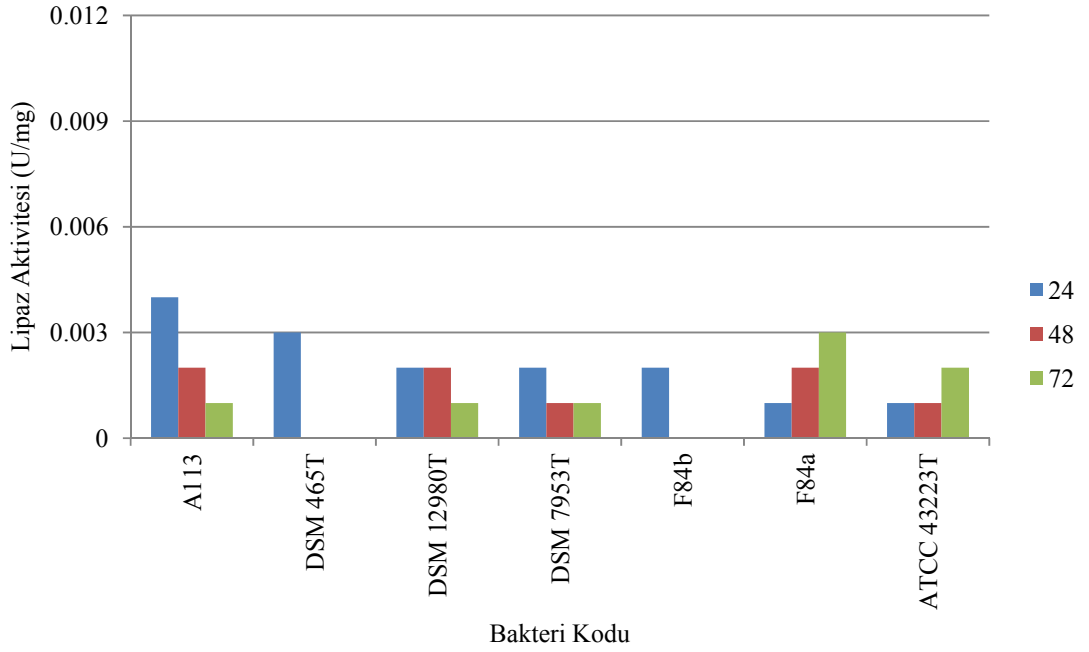
Bakteri	Lipaz aktivitesi (U/mg)					
	Enzim üretim besiyerindeki substrat					
	Zeytinyağı			Tribütirin		
	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
<i>G. stearothermophilus</i> A113	0,006	0,005	0,004	0,004	0,002	0,001
F84b	0,009	0,009	0,01	0,002	0	0
<i>G. thermodenitrificans</i> 465 ^T	0,008	0,007	0,006	0,003	0	0
F84a	0,006	0,007	0,008	0,001	0,002	0,003
<i>G. stearothermophilus</i> 7953	0,005	0,006	0,006	0,002	0,001	0,001
A353	0,004	0,004	0,007	0	0	0
D195	0,003	0,001	0,001	0	0	0
E173b	0,003	0,003	0,004	0	0	0
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 43223	0,002	0,003	0,004	0,001	0,001	0,002
<i>G. stearothermophilus</i> DSM 12980 ^T	0,002	0,003	0,004	0,002	0,002	0,001
A403	0,001	0,003	0,002	0	0	0
<i>G. toebii</i> 14590 ^T	0,001	0,002	0,003	0	0	0
C196	0	0,001	0,003	0	0	0
D494	0	0,002	0,002	0	0	0
D642	0	0,002	0,002	0	0	0
<i>G. kaustophilus</i> 7263 ^T	0	0,005	0,006	0	0	0
<i>G. vulcani</i> 13174 ^T	0	0,003	0,004	0	0	0
D413	0	0,003	0,003	0	0	0

Sonuçlara genel olarak baktığımızda, zeytinyağının substrat olarak kullanıldığı besiyerlerinde pH değerinin genel olarak artma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Tribütirinli besiyerlerinde ise pH büyük oranda azalmıştır. Bunun nedeni olarak da lipaz enziminin etkisi ile besiyeri ortamında pH'ın artması ve normal koşullarda, ortam pH'sını

düşürmesi beklenen yağ asitlerini dengeleyen ve üzerine çıkan metabolik bir sürecin gerçekleşmiş olabileceği öngörülmüştür. Bunların yanısıra çoğunlukla bakteri üremesi tribütrinli besiyerine göre zeytinyağlı besiyerinde çok daha yoğun gözlenmiş olup, zeytinyağlı besiyerinde enzim aktivitesi gösteren bakterilerin çoğunluğu 72. saat sonunda en yüksek hücre dışı lipaz sentezlemiştir.



Şekil 4.21 Termofilik izolatların ve standartların zeytinyağlı besiyerindeki 24, 48, 72 saatlik lipaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/mg) değerlerine göre oluşturulan dizinleri (Kısaltmalar: DSM 465^T; *G. thermodenitrificans*, DSM 7953^T; *G. stearothermophilus*, DSM 43223^T; *G. stearothermophilus*, DSM 12980^T; *G. stearothermophilus*, DSM 14590^T; *G. toebii*, DSM 7263^T; *G. kaustophilus*, DSM 13174^T; *G. vulcani*)



Şekil 4.22 Termofilik izolatların ve standartların tribütirinli besiyerindeki 24, 48, 72 saatlik lipaz aktivitesi/yaş ağırlık (U/mg) değerlerine göre oluşturulan dizinleri (Kısaltmalar: DSM 465^T; *G. thermodenitrificans*, DSM 7953; *G. stearothermophilus*, ATCC 43223; *G. stearothermophilus*, DSM 12980^T; *G. stearothermophilu*)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Termofilik izolatların kalitatif ve kantitatif olarak lipaz üretim miktarları ölçülmüş ve termostabil lipaz üreten 11 adet izolat ve 7 standart suş belirlenmiştir. A113, F84a, F84b, *G. stearothermophilus* ATCC 12980^T, *G. stearothermophilus* ATCC 43223, *G. stearothermophilus* ATCC 7953 ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T adlı termofilik izolat ve standartların, substrat olarak hem zeytinyağı hem de tribütirin substratlarının varlığında; diğer A353, A403, C196, D195, D413, D494, D642, E173b, *G. toebii* DSM 14590^T, *G. kaustophilus* DSM 7263^T ve *G. vulcani* DSM 13174^T adlı termofilik basillerin ise sadece zeytinyağını substrat olarak kullanarak hücre dışı termostabil lipaz ürettikleri görülmüştür. Özellikle A113, F84a ve F84b kodlu izolatların 24 saatte hem zeytinyağı hem de tribütirini kullanarak enzim üreticisi diğer standart termofilik suşlardan çok daha yüksek miktarda termostabil lipaz ürettikleri ve biyoteknolojik olarak önemli olabilecekleri saptanmıştır.

Kullanılan bu iki substrattan zeytinyağının, izolat ve standart suşlar tarafından tribütirine oranla daha fazla tercih edildiği belirlenmiştir. Zeytinyağının substrat olarak kullanıldığı enzim üretim besiyerlerinde aktivite değeri en yüksek 0,052 U/ml iken, tribütirinin substrat olarak kullanıldığı besiyerlerinde bu değer 0,018 U/ml'de kalmıştır. Bakterilerin substrata karşı verdikleri bu farklı ilginin sebebi lipaz enziminin substrat spesifikliğinden kaynaklanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *G. stearothermophilus* MC 7 bakterisi, tribütirinde maksimum aktiviteye ulaşırken, zeytinyağında ise aktivite minimumdur (Kambourova vd. 2003). Başka bir çalışmada *G. thermoleovorans* ID-1 bakterisi zeytinyağlı besiyerinde çok yüksek bir aktivite değeri verirken, tribütirinli besiyerinde aktivite değeri oldukça düşüktür (Lee vd. 1999). *G. thermoleovorans* ID-1 suşu lipazı zeytinyağının substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada 50°C'de 700 U/l'lik enzim aktivitesi sergilemiştir (Lee vd. 1999). ID-1 suşunun birçok substrat üzerinde aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Substrat olarak gliserol varlığında bakteri üremesi en yüksek seviyeye ulaşırken, enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Enzim aktivitesinin en yüksek seviyeye ulaştığı substrat ise triolein olarak tespit edilmiştir.

Zeytinyağlı besiyerinde maksimum aktivite 72 saat sonunda *G. thermodenitrificans subsp. calidus* F84a (DSM 22628), *G. thermodenitrificans subsp. calidus* F84b (DSM 22629^T) bakterilerinden ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T standart suşu tarafından üretilmiştir. Bu üç bakterinin 72. saatte sergiledikleri aktivite değeri yaklaşık olarak 0.052 U/ml'dir. Bu değeri ID-1 suşu üzerinde yapılan aktivite çalışmalarının altında kalmış olmasına rağmen; çalışmamızda kullanılan *G. thermoleovorans* suşunda lipaz enzimi aktivitesi tespit edilmemiştir. Zeytinyağlı besiyerinde en düşük aktivite değeri *G. toebii* DSM 14590^T tarafından 24 saat sonunda 0.002 U/ml olarak ölçülmüştür.

G. kaustophilus DSM 7263^T ve *G. vulcani* DSM 13174^T standartları ile D494, C196 ve D642 izolatları, zeytinyağlı besiyerinde 24 saat sonunda enzim aktivitesi göstermemişlerdir. Zeytinyağlı besiyerinde D195 kodlu izolat en yüksek aktivitesini 24. saat sonunda, A403 kodlu izolat ise en yüksek aktivitesini 48. saat sonunda göstermiştir. Bunların dışındaki bütün izolat ve standartlar en yüksek aktivite değerlerine 72 saat sonunda ulaşmışlardır.

Tribütirinli besiyerinde en yüksek aktivite *G. thermodenitrificans subsp. calidus* F84a (DSM 22628) tarafından 72 saat sonunda 0.018 U/ml olarak hesaplanmıştır. Tribütirinli besiyerinde *G. thermodenitrificans subsp. calidus* F84b (DSM 22629^T) izolatı ve *G. thermodenitrificans* DSM 465^T standardı sadece 24 saat sonunda aktivite göstermiştir.

Lipaz enzimi, hem tribütirini hem de zeytinyağını substrat olarak kullanabilmektedir. Esteraz enzimi ise tribütirini substrat olarak kullanmaktadır. Ancak aktivite deneyinde kullanılan *p*NPB sadece lipaz enzimi tarafından substrat olarak kullanılmaktadır. Tribütirinli enzim üretim besiyerinde lipaz enzimi yerine esteraz sentezini gözardı etmemek amacıyla, aktivite deneyinde sadece lipaz enziminin etki ettiği substrat kullanılmıştır. Böylelikle tribütirinli enzim üretim besiyerinde esteraz sentezi olmuş olsa bile aktivite deneyinde kullanılan *p*NPB sayesinde, lipaz enziminin aktivite değerine ulaşılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada tez konusunun kapsamına bağlı olarak, tribütirinli besiyerinde aktivite

gösteren bakterilerin sadece lipaz enzim üretimleri belirlenmiştir. Besiyerindeki tribütirin substratını parçalamak için lipaz veya esteraz enzimini tercih ettikleri üzerine odaklanılmamıştır. Daha ileride yapılacak çalışmalarda lipolitik metabolizmadaki enzim üretim tercihi daha detaylı olarak çalışılacaktır.

Bu çalışmada endüstriyel açıdan bakterilerin ürettiği lipaz enziminin değerlendirilebileceği substrat zeytinyağı olarak belirlenmiştir. Araştırmalarımız sonucunda en yüksek aktivite F84a ve F84b izolatlarında 0.052 U/ml ile zeytinyağlı besiyerinde hesaplanmıştır. Lipaz enziminin substrat spesifikliğini göz önüne alındığında, çalışılacak farklı substrat kaynaklarının aktiviteyi arttırıcı bir etki gösterebildiği bilinmektedir. Aynı zamanda farklı mineral maddeler ve farklı tampon uygulamaları da aktiviteyi arttırıcı ya da azaltıcı etkenler olabilmektedir (Hasan vd. 2009). Yapılan klonlama çalışmaları sonucunda termofilik *Geobacillus* cinsi bazı bakterilerin lipaz geninin farklı bakteri türlerindeki ifadesi sonucu hem aktivitenin hem de stabilitenin arttığı tespit edilmiştir (Quyen vd. 2003). Aynı zamanda termostabil enzimler söz konusu olduğunda klonlama çalışmaları daha fazla önem arz etmektedir. Bunun sebebi termofilik canlıların üreme hızları, substrat, pH, metal iyonlarının varlığı gibi birçok etken altında gerçekleşirken; özellikle patojen mikroorganizmalar bu etkenlere daha az duyarlılık gösterdikleri için endüstriyel anlamda biyomolekül üretimleri daha verimli bir süreçte gerçekleşmektedir. Verimlilik kaygısından kaynaklı olarak endüstriyel olarak kullanılan lipaz enzimlerinin birçoğunun klonlama çalışmaları yapılmıştır (Quyen vd. 2003, Sinchaikul vd. 2001, Cho vd. 2000, Li ve Zhang 2005).

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı sıcak su kaynaklarından izole edilen *Geobacillus* cinsi bakterilerin termostabil lipaz enzim üretim kapasitelerinin taranması ve aktivite deneyleri sonucu, lipaz enzimi üreten bakteriler tespit edilmiş ve üretim miktarları hakkında önemli bilgiler edinilmiştir. Ayrıca, enzim üretimi ölçülen tüm izolatların, 16S rRNA gen dizileri kullanılarak filogenetik analizleri yapılmış ve taksonomik pozisyonları belirlenmiştir. Buna göre en yüksek enzim üretimi yapan türler: D195 ile A333'ün dahil olduğu *G. thermodenitrificans*, F84a ve F84b'nin dahil olduğu *Geobacillus thermodenitrificans* subsp.

calidus ve A113 izolatının dahil olduğu *G. stearothermophilus*'tur. Bunun yanında, en yüksek enzim aktivitelerinden birine sahip *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* F84a ve F84b izolatlarıyla daha önce yapılan çalışmalar, bu suşların termostabil proteaz, amilaz, ve glikozidaz enzimlerini de üretebildiklerini göstermiştir (Cihan vd. 2011b). Bir bakteri suşunun birden fazla biyoteknolojik öneme sahip termostabil enzim üretmesi, oldukça ilgi çekicidir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere, bu suşların, standart suşlarla kıyaslandığında en yüksek lipolitik aktiviteyi göstermiş olmaları, bundan sonra yapılması hedeflenen enzim üretiminin optimizasyonu ve karakterizasyonu araştırmalarımızı özellikle bu suşların üzerinde yoğunlaştırmamızı işaret etmektedir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda *G. stearothermophilus* ve *G. thermoleovorans* türlerine dahil olan sırasıyla L1 (Kim vd. 1998) ve ID-1(Lee vd. 1999) suşlarının yüksek miktarda lipaz ürettikleri bildirilmiştir. Bu çalışmada ise *G. thermodenitrificans* ve onun alt türü olan *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* suşlarının, belirtilen bu iki türden daha yüksek miktarda lipaz üretebilen türler oldukları tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, elde edilen bu veriler daha sonraki çalışmalarımız için birer temel oluşturmuş olup, Türkiye'nin farklı jeotermal alanlarından izole edilen termofilik izolatlar arasından, biyoteknolojik ve endüstriyel boyutta termostabil lipaz üretimine kaynak oluşturabilecek aday suşlar belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah, Y. and Gaballa, A.A., 2008. Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.*, 163;13–20.
- Ahmed E.H., Raghavendra T. and Madamwar A.D. 2009. Thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: Characterization, partial purification and application in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160:2102-2113.
- Akoh C.C. and Min D.B., 1998. Microbial Lipase and Enzymatic Interesterification Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Marcel Deccer, Inc, New York. 641-698.
- Amoozegar M.A., Salehghamari E., Khajeh K., Kabiri M. and Naddaf S. 2008. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio sp.* strain SA-2. *J Basic Microbiol.* 48(3):160–7.
- Bachkatova N.A. and Severina LO. 1980. Isolation and characterization of intracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Biochem Soc Trans.* 28:771–3.
- Balcao V.M., Pavia A.L. and Malcata F.X. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: state of the Art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18:392-416.
- Becker P., Abu-Reesh I., Markossian S., Antranikian G. and Märkl H. 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 on olive oil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48:184–90.
- Bora L. and Kalita M.C. 2007. Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus sp* LBN 4. *The Internet Journal of Microbiology.* 4(1).
- Brzozowski A.M., Erewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G. Awson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling F., Iluge-Jensen T., Patkar S.A. and Thim L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase inhibitor complex. *Nature.* 351:491-494.
- Cai Y., Wang L., Liao X., Ding Y. and Sun J. 2009. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum sp.* SYBC WU-3. *Process Biochem.* 44:786-790.
- Castro-Ochoa L.D., Rodríguez-Gómez C., Valerio-Alfaro G., Ros R.O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 37, Issue 6:1;648-654.

- Chartrain M., Katz L., Marcin C., Thien M., Smith S. and Fisher E., 1993. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enz Microb Technol.* 15:575–580.
- Chen S.J., Cheng C.Y. and Chen T.L. 1998. Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *J Ferment Bioeng.* 86:308–312.
- Cho A-Ra, Yoo S. and Kim E. 2000. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovarans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters.* 186:235-238.
- Choo D.W., Kurihara T., Suzuki T., Soda K. and Esaki N. 1998. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas sp.* strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol.* 64(2):486–491.
- Cihan A.C., Ozcan B., Tekin N., and Cokmus C. 2011a. Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s11274-011-0742-2, 27, 2683-2696.
- Cihan A.C., Ozcan B., Tekin N., and Cokmus C. 2011b. *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov., a thermophilic and α -glucosidase producing bacterium isolated from Kizilcahamam, Turkey. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 57(2):83-92.
- Costa M.A. and Peralta R.M. 1999. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *J Basic Microbiol.* 39:11–15.
- Çöleri A. 2007. Bazı termofilik *Bacillus* türlerinin termostabil α -glukozidaz üretim kapasiteleri ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- De Pascale D., Cusona A.M., Autore F., Parrilli E., Di Prisco G., Marino G. and Tutino M.L. 2008. The cold-active Lip 1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplaktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family. *Extremophiles.* 12:311-323.
- Dutta S. and Ray L. 2009. Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C(7). *Appl Biochem Biotechnol.* (Electronic publication a head of print).
- Ebrahimpour A., Abd Rahman R.N., Ean Ch'ng D.H., Basri M. and Salleh A.B. 2008. A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on

culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus sp.* strain ARM. BMC Biotechnol. 8:96.

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

Elwan S.H., el-Hoseiny M.M., Ammar M.S. and Mostafa S.A. 1983. Lipases production by *Bacillus circulans* under mesophilic and osmophilic conditions. Factors affecting lipases production. G Bacteriol Virol Immunol. 76:187–199.

Falk M.P.F., Sanders E.A. and Deckwer W.D. 1991. Studies on the production of lipase from recombinant *Staphylococcus carnosus*. Appl Microbiol Biotechnol. 35:10–13.

Ghosh P.K., Saxsena R.K., Gupta R., Yadav R.P. and Davidson S. 1996. Microbial Lipases: production and application. Science Progress. 79(2):119-157.

Godtfredson S.E., Fogarty W.M. and Kelly E.T. 1990. Microbial Lipases. Microbial enzymes and biotechnology. Elsevier Applied Sciences, Amsterdam. 255-273.

Haki G.D. and Rakshit S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour. Technol. 89:17–34.

Halvorson, H., 1966. Methods in Enzymology. Academic Press, New York, Vol. 8;559-562.

Handelsman T. and Shoham Y. 1994. Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus sp.* J Gen Appl Microbiol.40:435–443.

Hasan F., Shah A.A. and Abul-Hameed A. 2006a. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Micro Technology. 39: 235-251

Hasan F., Shah A.A. and Abul-Hameed A. 2006b. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus sp.* FH5. Ann. Microbiol. 56(3):247–252.

Hasan F., Shah A. A. and Hameed A. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. Biotechnology Advances. 27:782–798.

Heravi K.M., Eftekhari F., Yakhchali B. and Tabandeh F. 2008. Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus sp.* from soil. Pak J Biol Sci. 11:740–745.

Hiol A., Jonzo M.D., Rugani N., Druet D., Sarda L. and Comeau L.C. 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. Enzyme Microb Technol. 26:421–430.

<http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html> Anna University, Chennai, 2012

- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzyme/index.html> Institute of Structually and Moleculer Biology, 2012
- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PROCAT/PROCAT.html> Institute of Structually and Moleculer Biology, 2012
- <http://www.brenda.uni-koeln.de/> The Comprehensive Enzyme Information System, 2012
- <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/> Queen Mary Univercity of London, 2012
- <http://www.ebi.ac.uk/intenz/index.html> European Bioinformatics Institute, 2012
- <http://www.expasy.ch/enzyme/> Swiss Institute of Bioinformatics, 2012
- <http://www.ncgr.org/software/pathdb/> The National Center for Genome Resources, 2012
- <http://www.kegg.com/kegg/pathway/map/> Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2012
- http://xpdb.nist.gov/enzyme_thermodynamics/ HIV Structural Database and Chem-BLAST, 2012
- Ito S., Kobayashi T., Ara K., Ozaki K., Kawai S. and Hatada Y. 1998. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. *Extremophiles*. 2:185–90.
- Jaeger K.E., Ransac S., Koch II.B., Ferrato F. and Dijkstra B.W. 1993. Topological characterizaticm and modeling of lhc 3D structure of lipase from *Pseudomonas aerugmosa*. *FEBS Lett.* 332:143-149.
- Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Heuvel M.van and Misset O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbial Rev.* 15:29-63.
- Jaeger K.E. and Reetz M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16:396-403.
- Johnvesly B. and Naik G.R. 2001. Studies On Production Of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic *Bacillus sp.* JB-99 in a Chemically defined medium. *Process Biochemistry.* 37:139-144.
- Jukes T.H. and Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York. 21-132.
- Kambourova M., Kirilova N., Mandeva R. and Derekova A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22:307–313.
- Kamini N.R., Fujii T., Kurosu T. and Iefuji H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus sp.* S-2. *Process Biochem.* 36:317–24.

- Kar M.K., Ray L. and Chattopadhyay P. 1996. Isolation and identification of alkaline thermostable lipase producing microorganism and some properties of crude enzyme. *Indian J. Exp. Biol.* 34:535–8.
- Kasana R.C., Kaur B. and Yadav S.K. 2008. Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. CR9 and characterization of its alkaline lipase. *J Basic Microbiol.* 48 (3):207–12.
- Kim H.K., Park S.Y., Lee J.K. and Oh T.K. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:66–71.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics.* 5:150-163.
- Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., Kanwar S.S. and Gupta R. 2005. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr. Purif.* 41:38-44.
- Kumura H., Mikawa K. and Saito Z. 1993. Purification and characterization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* No 33. *Milchwissenschaft-Milk Sci Int.* 48:431–4.
- Lee S.Y. and Rhee J.S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enz Microbial Technol.* 15:617–23.
- Lee D.W., Koh Y.S., Kim K.J., Kim B.C., Choi H.J. and Kim D.S. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS. Microbiol. Lett.* 179:393–400.
- Lee S.H. and Park D.H. 2008. An alkaliphilic bacterium isolation and physiological characterization of *Bacillus clausii* SKAL-16 isolated from wastewater. *J Microbiol Biotechnol.* 18:1908–14.
- Lesuisse E., Schanck K. and Colson C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216:155–60.
- Li H. And Zhang X. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. *TW1*. *Pro. Express. And Purif.* 42:153-159.
- Lopes M.F.S., Cunha A.E., Clemente J.J., Carrondo M.J.T. and Crespo M.T.B. 1999. Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51:249–54.

- Markossian S., Becker P., Markl H. and Antranikian G. 2000. Isolation and characterization of lipid degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an Icelandic hot spring. *Extremophiles*. 4:365–371.
- Muraoka T., Ando T. and Okuda H.J. 1982. Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *Biochem (Tokyo)*. 92:1933–9.
- Noble M.E.M., Cleasby A., Johnson L.N., Egmond M.R. and Frenken L.G.J. 1993. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* 331:123-128.
- Ohkuro I., Komatsuzaki T., Kawashima M. and Kuriyama S. 1978. Influence of NaCl on colonies and lipase of *Natto bacilli*. *Med Biol.* 97:171–4.
- Okafor N. 2007. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Department of Biological Sciences Clemson University, South Carolina. 22:398-406.
- Öztürk B. 2002. Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*. 12:20-23.
- Papaon M. and Talon R. 1988. Factors affecting growth and lipase production by meat *lactobacilli* strains and *Brochothrix thermosphaota*. *J Appl Bacteriol.* 64:107–15.
- Park I.H., Kim S.H., Lee Y.S., Lee S.C., Zhou Y. and Kim C.M. 2009. Gene cloning, purification, and characterization of a cold-adapted lipase produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *J Microbiol Biotechnol.* 19(2):128–35.
- Petersen M.T.N., Fojan P. and Petersen S.B. 2001. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of biotechnology*. 85 issue 2:119-131.
- Quyen D.T., Schmidt-Dannert C. and Schmid R.D. 2003. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. *Protein Expression and Purification*. 28:102–110.
- Ramani K., Chockalingam E. and Sekaran G. 2010. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 37:531-535.
- Ruiz B., Farres A., Langley E., Masso F. and Sanchez S. 2001. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. *Lipids*. 36:283–9.
- Sarkar S., Sreekanth B., Kant S., Banerjee R. and Bhattacharyya B.C. 1998. Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess Eng.* 12:29–32.

- Schmidt-Dannert C., Sztajer H., Stocklein W., Menge U. and Schmid R.D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214:43–53.
- Schmidt-Dannert C., Rua M.L., Atomi H. and Schmid R.D. 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1301:105–14.
- Sharon C., Furugoh S., Yamakido T., Ogawa H.I. and Kato Y. 1998. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 20:304–307.
- Simons J.W., van Kampen M.D., Riel S., Götz F., Egmond M.R., Verheij H.M. 1998. Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*-comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *Eur. J. Biochem.* 253:675–683.
- Sinchaikul S., Sookkheo B., Phuyrakul S., Wu Y.T., Pan F.M. and Chen S.T. 2001. Structural Modeling and Characterization of a thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Biochem and Biophys Res. Com.* 283:868-875.
- Song Q.X., Lin J.P., Rong Y.P., Wei D.Z. 2001. Studies on lipase production from *Candida rugosa*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 17:101–4.
- Stackebrandt E., Fredericksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52:1043-1047.
- Sugihara A., Tani T., Tominaga Y. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.* *J. Biochem.* 109:211–6.
- Sugiura M., Oikawa T., Hirano K. and Inukai T. 1977. Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim Biophys Acta.* 488:353–8.
- Suzuki M., Yamamoto H., Mizugaki M. 1986. Purification and general properties of a metalinsensitive lipase from. *J. Biochem. (Tokyo)* 100:1207–13.
- Tan K. and Gill C. 1985. Effect of culture conditions on batch growth of *Pseudomonas fluorescens* on olive oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:27–32.
- Talon R., Dublet N., Montel M.C., Cantonnet M. 1995. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Curr Microbiol.* 30:11–6.

- Thompson J.D., Collins M.D. and Gibson T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Tsai C.S. 2007. Biomacromolecules. Department of Chemistry, Carleton University, New Jersey. 11:323-325.
- Tyndall J.D.A., Sinchaikul S., Fothergill-Gilmore L.A., Taylor P. And Walkinshaw M.D. 2002. Crystal structure of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J. Mol. Biol.* 323:859-869.
- Veeraragavan K., Colpitts T., Gibbs B.F. 1990. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1044:26–33.
- Verger R. 1997. Interfacial activation of lipases facts and artifacts. *TIBTECH reviews.* 15:32-38.
- Wu X., Jaaskelainen S., Linko Y. 1996. An investigation of crude lipase for hydrolysis, esterification, and transesterification. *Enzyme Microb. Technol.* 19:226–231.
- Yadav R.P., Saxena R.K., Gupta R., Davidson W.S. 1998. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Appl Biochem.* 28:243–9.
- Zhang J.W., Zeng R.Y. 2008. Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas sp.* 7323. *Mar Biotechnol (NY).* 10(5):612–21.
- Zhen-qian Z., Chun-yun 2009. G. Screening for lipase-producing *Enterobacter agglomerans* for biodiesel catalyzation. *Afr J Biotechnol.* 8(7):1273–9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Melih KOÇ

Doğum Yeri : Denizli

Doğum Tarihi : 24.03.1986

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Bergama Akif Ersezgin Anadolu Lisesi (2004)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü(2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı (Eylül 2009-Ocak 2013)