



**GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Acinetobacter psychrotolerans* SUŞLARINDAN İZOLE EDİLEN
LİPAZIN KARAKTERİZASYONLARI**

ŞULE SEREN

HAZİRAN 2013

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Acinetobacter psychrotolerans SUŞLARINDAN İZOLE EDİLEN
LİPAZIN KARAKTERİZASYONLARI

ŞULE SEREN

HAZİRAN 2013

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü'nün onayı.

.../.../...

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

.../.../...

Prof. Dr. İhsan AKYURT
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Hatice KATI
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Hatice KATI

Yrd. Doç. Dr. Cengiz MUTLU

Yrd. Doç. Dr. Şahin DİREKEL

ÖZET

Acinetobacter psychrotolerans SUŞLARINDAN İZOLE EDİLEN LİPAZIN

KARAKTERİZASYONLARI

SEREN, Şule

Giresun Ünivesitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Hatice KATI

Haziran 2013, 82 sayfa

Bu çalışmada, *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının lipolitik aktiviteleri Tween 20, Tween 80 ve Tributirin agar besiyerinde kalitatif olarak belirlenmiştir. Lipaz aktivite deneyi için Rhodamine B agar besiyeri kullanıldı ve her iki suшта pozitif sonuç verdi. Lipaz aktiviteleri, p-nitrofenil palmitat kullanılarak spektrofotometre ile kantitatif olarak ölçülmüştür.

Xg1 ve Xg2 suşlarının lipaz aktiviteleri sırasıyla 0,14 ve 0,13 U dır. Xg1 suşunun zamana bağlı en yüksek enzim üretimi 24. saatte olurken Xg2 suşunun 48. saatte olduğu görüldü. *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının ekstraselüler lipazları karakterize edildi. Her iki suşun enzimlerinin maksimum aktivitesi pH 8 ve 30 °C'de görülmüştür. Hekzan, etil asetat, kloroform ve N,N dietil formamid organik çözücülerin varlığında yüksek stabilite göstermiş, izopropanol, asetonitril ve bütan-1-ol çözücülerinin varlığında lipaz aktivitelerinde azalmalar saptanmıştır. Xg1 suşunun enzim aktivitesini FeCl₃, CuCl₂ ve ZnCl₂ önemli ölçüde azaltmıştır. Xg2 suşunu ise CuCl₂ ve ZnCl₂ metal iyonlarının enzim aktivitesini azaltmıştır. EDTA ajanı, Xg1 ve Xg2 suşlarının ürettiği lipazın aktivitesini azaltırken, SDS neredeyse tamamen inhibe etmiştir. Xg1 ve Xg2 suşlarından elde edilen kültür süpernatantları ile sırasıyla, ultrafiltrasyon, jel kromatografi, SDS-PAGE ve aktivite çalışmaları yapıldı.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter psychrotolerans*, Lipaz, kısmi karakterizasyon.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF LIPASES ISOLATED FROM *Acinetobacter psychrotolerans* STRAINS

SEREN, Şule

Giresun University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Doç. Dr. Hatice KATI

June 2013, 82 pages

In this study, lipolytic activities of *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 and Xg2 strains were qualitatively determined in Tween 20, Tween 80 and Tributirin Agar. For lipase activite test was used Rhodamine B agar medium. Both strains gave positive results in this medium. Lipase activities using p-nitrophenyl palmitate was quantitatively measured by a spectrophotometer.

The highest lipase activities of Xg1 and Xg2 strains were 0,14 and 0,13 U, respectively. Time course of enzyme activity by Xg1 was found in the 24th hour, but Xg2 was found in the 48th hour. Next, extracellular lipases of *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 and Xg2 strains were characterized. Both enzymes exhibited maximum activity at pH 8 and 30 °C. The enzyme exhibited the highest stability in the presence of various organic solvents such as hexane, ethyl acetate, chloroform and N,N dietil formamid, but it was determined reducing at organic solvents isopropanol, asetonitril and bütan-1-ol. The lipase of Xg1 strain was inhibited in the presence FeCl₃, CuCl₂ ve ZnCl₂, but the lipase of Xg2 strain was inhibited in the presence CuCl₂ ve ZnCl₂. When in presence EDTA, the lipase activities of Xg1 and Xg2 strains was inhibited. İn presence SDS, they was exactly inhibited. In culture supernatants obtained from Xg1 and Xg2 strains were performed ultrafiltration, gel filtration chromatography, SDS-PAGE and activite tests, respectively.

Key Words: *Acinetobacter psychrotolerans*, Lipase, Partial Characterization.

TEŞEKKÜR

Tez alıŐmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren değerli hocam sayın Doç. Dr. Hatice Katı'ya teŐekkürlerimi sunarım. Lipaz enziminin kolon jel kromatografisinin yapılması konusunda yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen sayın ArŐ.Gör. Dr. Serpil UęraŐ'a teşekkür ederim.

ÇalıŐmalarım sırasında bana yardımcı olan araştırma laboratuvarındaki mikrobiyoloji yüksek lisans öğrencilerine teşekkür ederim.

ÇalıŐmalarımın tümünde, maddi manevi her türlü desteği gösteren, ilgi ve sevgilerini daima hissettiğim sevgili aileme, ve bunun yanı sıra emeği geçen herkese teŐekkürü bir borç bilirim

Bu alıŐma, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: FEN-BAP-A 160512-3

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER DİZİNİ.....	XII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	2
1.1.1. Lipazların Genel Özellikleri.....	3
1.1.2. Lipazın Üç Boyutlu Yapısı.....	4
1.1.3. Lipaz Reaksiyonları.....	5
1.1.3.1. Lipaz Esterazları.....	7
1.1.3.2. Spesifiklikleri.....	8
1.1.3.3. İnhibitör ve Aktivatörleri.....	8
1.1.3.4. Optimizasyon Koşulları	9
1.2. Lipaz Kaynakları	10
1.2.1. Mikrobiyal Lipazlar.....	12
1.2.2. Fungal lipazlar.....	14
1.2.3. Bakteriyel lipazlar.....	15
1.2.3.1. Lipaz Üretimi İçin Bakteri Seçimi.....	16
1.2.3.2. Bakteriyel Lipaz Fermentasyon Özellikleri.....	16
1.2.3.3. Pseudomonas Türlerinde Lipaz Üretimi.....	17
1.2.3.4. Acinetobacter Türlerinde Lipaz Üretimi.....	19
1.3. Lipazların Analiz Yöntemleri.....	22
1.3.1. Kalitatif Analiz.....	23

1.3.2. Kalitatif Analiz.....	23
1.3.2.1. Titrimetri.....	23
1.3.2.2. Spektrofotometrik Analiz.....	24
1.3.2.3. Florimetrik Analiz.....	25
1.3.2.4. Kromatografik Prosedür.....	25
1.3.2.5. İmmünolojik Metotlar.....	26
1.4. Lipazların Önemi.....	26
1.4.1. Bakteriyel Lipazların Önemi.....	27
1.5. Lipazların Kullanım Alanları.....	28
1.5.1. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları.....	28
1.5.2. Uygulama Alanları.....	30
1.5.2.1. Süt Ürünleri Endüstrisinde Lipazlar.....	31
1.5.2.2. Gıda Sanayinde Kullanım.....	33
1.5.2.3. Deterjanlarda Lipazlar.....	33
1.5.2.4. Oleokimyasal Endüstrisinde Lipazlar.....	34
1.5.2.5. Kâğıt Endüstrisi.....	35
1.5.2.6. Biyodizel Endüstrisi.....	35
1.5.2.7. Enzim Endüstrisi.....	35
1.6. Tezin Amacı.....	36
2. MATERYAL VE METOD.....	37
2.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler.....	37
2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerileri.....	37
2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	37
2.4. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar.....	38
2.5. Acinetobacter psychrotolerans Suşlarının Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	38

2.6. Ekstraselüler Lipaz Aktivitesinin Tespiti	39
2.7. Ekstinksiyon Katsayısı Hesaplanması	39
2.8. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Suşlarının Gelişimi ve Lipaz Üretimi.	40
2.9. Enzim Üretimi	41
2.10. Lipazın Karakterizasyonu	41
2.10.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi	41
2.10.2. Optimum Sıcaklığın ve Stabilitenin Belirlenmesi	42
2.10.3. Organik Çözücülerin Lipaz Üzerine Etkileri	42
2.10.4. Metallerin Lipaz Üzerine Etkisi	42
2.10.5. Çeşitli Ajanların Lipaz Üzerine Etkisi	43
2.11. Enzimlerin Ultrafiltrasyonu ve Jel Kromatografisi	43
2.12. Enzimlerin SDS-PAGE Analizi	44
2.13. Aktivite Deneyi	44
3. BULGULAR	45
3.1. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Suşlarında Lipolitik Aktivitenin Belirlenmesi	46
3.2. Ekstraselüler Lipaz Aktivitesinin Tespiti	47
3.3. Ekstinksiyon Katsayı Hesabı	48
3.4. İzolatların Hücre gelişimi ve Lipaz aktivitesi	48
3.5. Ekstraselüller Lipaz Enziminin Karakterizasyonu	50
3.5.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi	50
3.5.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	51
3.5.3. Organik Çözücülerin <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Suşlarının Lipazları Üzerine Etkisi	54

3.5.4. Metallerin <i>Acinetobacter psychrotolerans</i>	
Suşlarının Lipazları Üzerine Etkisi.....	56
3.5.5. Çeşitli Ajanların <i>Acinetobacter psychrotolerans</i>	
Suşlarının Lipazları Üzerine Etkisi.....	57
3.6. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Suşlarının	
Lipazlarının SDS-PAGE Analizi.....	59
3.7. Aktivitenin Belirlenmesi.....	60
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
4.1. Tartışma.....	62
4.2. Sonuç.....	67
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ.....	82

TABLULAR DİZİNİ

TABLO

1.1. Mikrobiyal lipaz kaynakları.....	13
1.2. Lipolitik Acinetobacter suşlarının izolasyonu ve özellikleri.....	21
1.3.Lipolitik Acinetobacter Suşlarının Biyokimyasal Özellikleri.....	22
1.4.Mikrobiyal lipaz kaynakları ve uygulama alanları.....	30
1.5.Mikrobiyal lipazların endüstriyel alanlarda kullanım tablosu.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1.Lipazın 3 boyutlu yapısının şematik görünümü.....	5
1.2. Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu.....	6
1.3. Trigliseridlerin lipolitik hidrolizi.....	7
1.4. Acinetobacterlerin mikroskopik ve besiyeri görüntüsü gösterilmiştir.....	20
3.1. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 ve Xg2 suşlarının Tween 20 besiyerinde oluşturdukları kristaller. 1: Xg1 suşu; 2: Xg2 suşu N.K.: Negatif kontrol <i>E.coli</i>	45
3.2. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 ve Xg2 suşlarının Tween 80 besiyerinde oluşturdukları kristaller. 1: Xg1 suşu; 2: Xg2 suşu;N.K.: Negatif kontrol <i>E. coli</i>	46
3.3. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 ve Xg2 suşlarının Tributirin Agar besiyerinde oluşturduğu zonlar. 1: Xg1 suşu; 2: Xg2 suşu; N.K.: Negatif kontrol <i>E. coli</i> ...47.....	46
3.4. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 ve Xg2 suşlarının Rhodamine B agar besiyerinde oluşturduğu pembe renkli koloniler ve UV ışığı altındaki görüntü. 1:Xg1 suşu; 2: Xg2 suşu; N.K.: Negatif kontrol <i>E.coli</i>	47
3.5. pNPP'in substrat olarak kullanıldığı lipaz aktivitesi standart grafiği.....	48
3.6. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 suşunun basal besiyerindeki hücre yoğunluğu ve ekstrasellüler lipaz aktivitesi.....	49
3.7. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg2 suşunun basal besiyerindeki hücre yoğunluğu ve ekstrasellüler lipaz aktivitesi.....	49
3.8. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 suşuna ait lipaz enziminin farklı pH değerlerindeki aktivitesi.....	50
3.9. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg2 suşuna ait lipaz enziminin farklı pH değerlerindeki aktivitesi.....	51

3.10. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki aktivitesi.....	52
3.11. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg2 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki aktivitesi.....	52
3.12. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki kararlılığın aktivitesi.....	53
3.13. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg2 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki kararlılığın aktivitesi.....	54
3.14. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı organik çözücülerin etkisi.....	55
3.15. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg2 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı organik çözücülerin etkisi.....	55
3.16. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı minerallerin etkisi.....	56
3.17. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg2 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı minerallerin etkisi.....	57
3.18. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı çeşitli ajanların etkisi.....	58
3.19. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg2 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı çeşitli ajanların etkisi.....	58
3.20. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 ve Xg2 suşlarına ait ultrafiltrasyon örneklerinin protein profilleri. M: Marker, 1: Xg1 suşu, 2: Xg2 suşu.....	59
3.21. <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 suşuna ait lipaz enziminin SDS PAGE'deki protein profili. M: Marker, 1: Ultrafiltrasyon örneği, 2:, 3:, 4; Jel filtrasyon örnekleri.....	60
3.22 <i>Acinetobacter psychrotolerans</i> Xg1 ve Xg2 suşlarına ait aktivite bantları.....	61

SİMGELER DİZİNİ

Simge	Açıklama
μm	Mikrometre
ml	Mililitre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
dk	Dakika
sn	Saniye
gr	Gram
mM	Milimolar
M	Molar
A	Alfa
β	Beta
U	Unite
mg	Miligram
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
μm	Mikromol
kDa	Kilodalton
Da	Dalton
UV	Ultraviyole
Gli	Glisin
Ser	Serin

Asp

Aspartat

Glu

Glutamat

Sn

Kalay

Hg

Civa

Co

Kobalt

Ni

Nikel

Zn

Çinko

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ O	Su
NaCl	Sodyum klorür
UV	Ultraviyole
Tris	Tris (Hydroxymethyl) aminomethane
TLC	Thin layer chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitat
dH ₂ O	Distile su
DDT	Dikloro difenil trikloroethan
NC-IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
GC	Gaz Kromatografisi

1. GİRİŞ

Lipazlar, gliserin ile yağ asitlerinden oluşan esterleri hidroliz eden enzimler olarak tanımlanırlar. Lipazlara biyoteknoloji çalışmalarında çok amaçlı kullanılabilirlikleri, spesifikliğin olmadığı kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, yan reaksiyonları önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle her geçen gün artan bir ilgi ve talep vardır.

Günümüzde gelişen biyoteknolojik gelişmeler ile enzimlerin kullanım alanları artmaya başlamıştır. Dolayısıyla dünya genelindeki enzim üretim firmaları da bu büyük potansiyeli değerlendirmeye ve yatırımlarını artırmaya başlamışlardır (Pandey ve ark., 1999). Endüstriyel enzim pazarında büyük bir paya sahip olan hidrolitik enzimler içinde yer alan lipazlar, endüstriyel uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadırlar (Pandey ve ark., 1999). Lipazların, karbohidrolazlar ve proteazlar kadar büyük bir piyasa payına sahip olmamasına rağmen bu grup 1995'te % 100'lük yükselme ile en büyük talep artışını göstermiştir. Bu hızlı büyümenin devam edeceği ve talebin 2015'te % 71'lik artış göstermesi beklenmektedir (Heler, 2006).

Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantio seçicilik, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur. Lipaz enzimleri yeryüzü flora ve faunasında geniş bir yere sahip olmalarına karşın daha çok bakteri, mantar ve mayalardan elde edilmiştir.

Lipazlar, domuz ve insan gibi memelilerde, kene otu tohumu (*Ricinus communis*) ve kolza tohumu (*Brassica napus*) gibi yüksek yapılı bitkilerde de bulunmaktadır. Enzim üretiminde daha çok mikrobiyal kaynak tercih edilmekle birlikte, *Candida*, *Pseudomonas* ve *Rhizopus* türleri ön planda yer alan enzim kaynaklarıdır.

Lipazlarla yapılan endüstriyel uygulamalarda genellikle saflaştırılmış ticari enzimler tercih edilmektedir (Gupta ve ark., 2004). 1960'ların sonuna doğru lipaz, tıpta sindirim yardımcısı olarak kullanılıyordu. Gelişen teknoloji ile beraber lipazların kullanım alanı daha da artmıştır. Endüstriyel alanda kullanılan lipazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunmakla birlikte, mikrobiyal orijinli lipazlar, biyoteknolojik uygulamalar ve organik kimyada yüksek oranda kullanılmaktadırlar.

Her geçen gün farklı endüstrilerde önemi artan lipazların ticari amaca yönelik kullanımını ise başlangıç aşamasındadır (Gupta ve ark., 2004). Bu nedenle yeni mikrobiyal kaynaklara ve enzim üretiminin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yararlanılan çeşitli bakteriyel lipazlar arasında *Acinetobacter* cinsinden elde edilen lipazlar geniş pH ve sıcaklık aralığında aktivite göstermeleri sebebiyle farmakologlar ve kimyacılar tarafından tercih edilen katalizörler olmuşlardır. Bu nedenle, yeni suşların izolasyonu, enzim üretiminin optimizasyonu, klonlama ve ekspresyon, mutasyonlarla enzim özelliklerinin geliştirilmesi gibi çok çeşitli ve yoğun çalışmalar *Acinetobacter* türleri üzerinde odaklanmıştır. Bu çalışmada güçlü ve farklı özelliklere sahip lipaz üreticisi olabilecek *Acinetobacter* cinsine ait bakterilerin farklı suşlarının sahip olduğu lipazların karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Enzimler

Enzimler canlı hücreler tarafından genetik kontrol altında hücre içinde sentez edilen organik katalizörlerdir. Kataliz deyimi, Yunanca'da, kimyasal reaksiyonlarda etkili olan, reaksiyonu hızlandıran ve kolaylaştıran anlamında kullanılmaktadır. Biyolojik olaylarda ise katalizör olma özelliğinde olan maddelere enzim adı verilmiştir (Telefoncu, 1993). Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize eder.

Besin öğeleri vücutta enzimlerin yardımıyla kullanılır ve tepkimeler sonucu vücut yapısına dönüşür. Yaşamsal olayların tümü enzim gerektirir. Enzimler nükleik asitlerden DNA (deoksiribonükleik asit) denetiminde sentezlenir. DNA yapısındaki küçük bir değişiklik bazı enzimlerin sentezlenmemesine veya hatalı sentezlenmesine

neden olur. Hatalı sentezlenen enzim ise etkinlik gösteremez ve çeşitli sorunlara neden olur (Sharma ve ark., 2001).

Endüstriyel alanda kullanılan birçok enzim vardır. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren α -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiseman, 1995).

1.1.1. Lipazların Genel Özellikleri

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açil hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Lipazlar lipid-su ara yüzeyinde aktif olup (Chen ve ark., 2003; Sayari ve ark., 2005), suda çözünmeyen uzun zincirli trigliseritlere karşı maksimum aktive gösterirler (Dröge, 2004).

Lipazlar, hem sulu hem de susuz çözücü sistemlerinde aktivite gösterdikleri için endüstride ve tıp alanında önemli bir yere sahiptirler. Bu enzimlerin lipid içeren atık suların enzimatik degradasyonu, organik sentez, deterjan formülasyonu, biyosüfaktanların sentezi, oleokimyasal endüstri, süt endüstrisi, agrokimyasal endüstri, kağıt yapımı, besin, kozmetik, kimyasal analiz ve ilaç prosesinde umut verici uygulama alanları bulunmaktadır (Bjokling ve ark., 1991).

Lipazlar, genellikle hidroliz reaksiyonları ve sentez veya açil değişim reaksiyonları arasında farklı olabilen yüksek oranda kimyasal, bölgesel veya enantiyoselektif bütün reaksiyonları gerçekleştirirler (Gunstone, 1999). Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma aktif merkezde bulunan serin aminoasidi üzerinde yoğunlaşmıştır. Serinin nükleofilik oksijeni trigliserid ile tetrahedral hemiasetal bir ortam oluşturur. Hemiasetalin ester bağı hidroliz olur ve diaçilgliserid serbest kalır. Aktif merkezdeki serin açil esterinin bir su molekülü ile tepkimeye girdiği, daha sonra açil enzimin bölündüğü ve yağ asidinin ayrıldığı tahmin edilmektedir. Katalitik

prosesin bu aşamasında ürünün aktif merkezden ayrılması özellikle önem taşımaktadır (Yang ve Rhee, 1992).

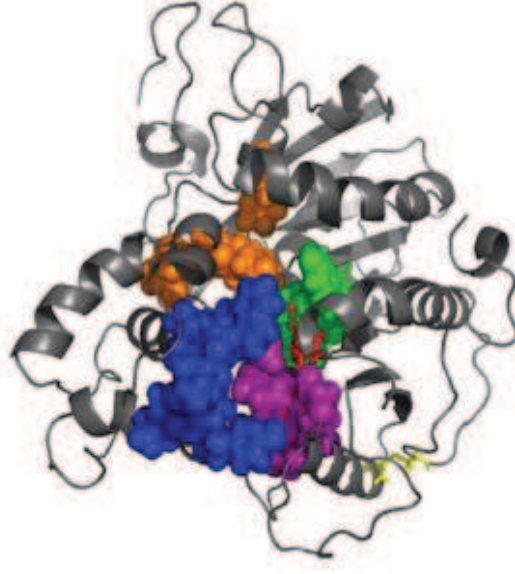
Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantio seçicilik, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur.

1.1.2. Lipazın Üç Boyutlu Yapısı

Tüm kaynaklardan elde edilen lipazların üç boyutlu yapıları hemen hemen birbirine benzemektedir (Şekil 1.1). 1990 ile 1995 yılları arasında 11 değişik lipaz türünün yüksek çözünürlükteki yapısı aydınlatılmıştır. Burada boyut, sıralama benzerliği, substratlar ve aktivatörler dışında çoğunluğunun benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda tüm lipazların karakteristik olarak katalitik grupları içeren merkezi bir β -bandı ile α/β hidrolaz yapıdaki proteinlerin içyapısı incelendiğinde ise paralel β kıvrımlı bantların heliks şeklindeki α yapıları ile ayrıldığı ve süper heliksel olarak gömülmüş bir şerit şeklini aldığı görülmüştür (Malcata ve Hill, 1991).

Heliks yapısındaki peptid kısımları ise bu şeridin dış kısımlarında yer almıştır. Lipazlar genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Bunlardan N- kısmı katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır (Akho ve David, 2008). Bu gruptaki enzimlerin farklı seviyelerdeki benzerliklerinin dışında bir sıralama istisnai olarak sıkça gözlenmiştir; bu sıralama pentapeptid Gli-X-Ser-X-Gli şeklindedir. Bu serin amino asidinin mevcut yapıda korunması ve bunun değişime uğraması veya yer değiştirmesi ile katalitik aktivitenin yitilmesi bu amino asidin kataliz için çok önemli ve gerekli olduğunu göstermiştir. Bunun topografik yerleşimi de korunmuş ve belirgindir; protein zincirinin gergin bir bölümünün en üstünde bulunmaktadır. Fakat bu gergin bölümün serin aminoasidine yakın -2 ve +2 pozisyonlarındaki amino asitlerinin küçük yan zincir gruplar içermesi mecburidir. Katalitik serin amino asidine ilave olarak çoğu lipazın aktif merkezi histidin ve başka bir amino asit (Asp veya Glu) daha içerir.

Nükleofilik serin bir β -bandı ile α -heliksinin arasında yer alırken histidin, aspartik asit ve glutamik asit ise serinin diğer yanlarında yer alır. Katalitik bölgeyi içeren amino asitler çoğu lipaz yapısında korunur (Zaidi, 1995).



Şekil 1.1 Lipazın 3 boyutlu yapısının şematik görünümü (Jaeger ve Reetz, 1998).

1.1.3. Lipaz Reaksiyonları

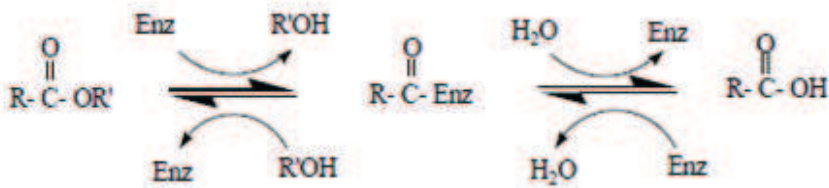
Lipazlar, enzim sınıflandırmasında sırasıyla hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) ve triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology; NC-IUBMB, 1992). Lipaz enzimlerinin spesifikliği; enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısıyla ilgilidir. Genellikle lipazlar, yağ asidinin pozisyonel spesifikliği, stereospesifiklik (izomer seçicilik) gibi substratların özellikleri doğrultusunda sınıflandırılırlar (Chen ve ark., 2003). Bu bakımdan, lipazlar üç gruba ayrılırlar;

1. İlk grup, spesifik olmayan gruptur. Bu grup lipazlar, trigliseritleri tamamen hidrolizleyip yağ asitleri ve gliserol oluşumunu katalizlerler.

2. İkinci grup lipazlar, 1,3-spesifik olup triaçilgliserol parçasının 1 ve 3 pozisyonunda hidroliz gerçekleştirirler ve 1,2-diaçilgliseroller, 2,3-diaçilgliseroller, 2-monogliseroller ve serbest yağ asitleri oluştururlar. Ancak bu ürünler kimyasal olarak kararsızdır ve açil göçüne maruz kalmaktadırlar. Bunun sonucunda 1,3-spesifik enzimlerin son ürünleri; 1,3-diaçilgliseroller, 1-monoaçilgliserol ve serbest yağ asitleri olabilir. Triaçilgliserollerin hidrolizi devam ettiği sürece 1,3-spesifik lipazlar, triaçilgliserollerin tamamen serbest yağ asitleri ve gliserole dönüşmesine sebep olurlar (Chen ve ark., 2003).

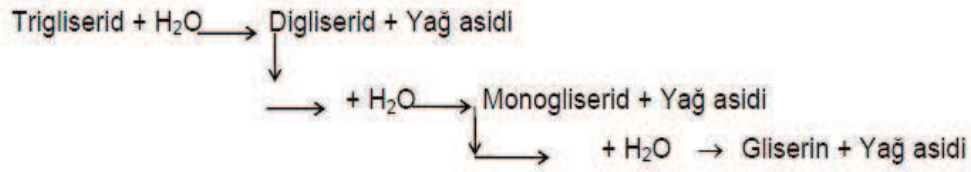
3. Üçüncü grup, yağ asidi spesifik lipazlardır. Bu grup lipazlar, bazı yağ asitlerine spesifik olup bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar.

Lipazın immobilizasyonu sırasında lipaz ile birlikte immobilize edilmiş olan su, bu ara yüzeyin oluşmasını sağlar. Lipazlar, su-yağ ara yüzeyinde suya karışmayan trigliseridlerin hidrolizini katalize eder. Belirli koşullar altında reaksiyon karışımındaki su miktarı, lipaz tarafından katalize edilen reaksiyonun yönünü belirler. Suyun çok az miktarda olduğu ya da hiç olmadığı zamanlarda yalnızca esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları meydana gelirken su içeriğinin yüksek olduğu koşullarda hidroliz reaksiyonları oluşur (Malcata ve ark., 1992). Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu şekil 1.2'de verilmektedir.



Şekil 1.2 Lipaz tarafından katalizlenen bir ester-hidroliz sentez reaksiyonu

Hidroliz tepkimesi sonucu digliserid, monogliserid, gliserin ve yağ asidi oluşur. Lipazın katalizleyici etkisiyle trigliserid hidrolizi tepkimesi şekil 1.3'de gösterilmektedir.



Şekil 1.3 Triglisericidlerin lipolitik hidrolizi

1.1.3.1. Lipaz Esterazları

Lipazlar, yağ asit esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Esterazların aksine, lipazlar sadece su-yağ ara yüzeylerine adsorbe olduklarında aktive edilirler. Katalizleme, su ile çözünmez substratın oluşturduğu ara yüzeyde gerçekleşir. Su ve yağın oluşturduğu bu ara yüzey enzim aktivitesi için gereklidir. Esterazlar çözünebilir substratlara, lipazlar ise suda çözünemeyen substratlara karşı su / lipid arayüzeyi varlığında etkindirler. Esterazlar çok çeşitli moleküllerin ester bağlarını parçalayan enzimlerin genel adıdır. Lipazlar ise esterazların bir alt sınıfıdır. Çeşitli substrat spesifisiteleri, protein yapıları ve biyolojik işlevleri olan farklı esteraz tipleri vardır.

Lipazlar, Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komitesince verilen “Glycerol-Ester Hydrolase (3.1.1.3)” sistematik adıyla tanımlanır (NC-IUBMB, 1992). Bu adlandırmada kullanılan rakamların karşılığı aşağıda ifade edilmiştir;

3. Hidrolaz

3.1. Ester bağımlı etkileyenler

3.1.1. Karboksilik hidrolazlar

3.1.1.3. Gliserol-ester hidrolazlar

Yağ asiti esterleri, yağ alkollerini ve bilinen diğer yağ asidi ester türevlerinin hazırlanmasında kullanılan ham maddelerdir. Ayrıca gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak ve kozmetik endüstrisinde koku veren maddelerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Endüstride yağ asidi esterleri genel olarak yağların metanol içerisinde 100-200 °C’de ısıtılmasıyla elde edilir. Kısmen açillenmiş sakkarit

esterlerinin yüzey aktif, antitümör aktivitesi gösteren ve bitki büyümesini inhibe eden aktiviteleri verilebilir (Zaidi ve ark., 1995).

Propilen glikol monoesterleri iyi özellikte emülsifiye edici ajanlardır. Bu bileşikler gıdalarda özellikle keklerde, kek karışımlarında ve ekmelerde kullanılırlar. Bunlar monogliseritlerle beraber kek hacminin artırılmasında ve homojen bir yapı elde edilmesi amacıyla kullanılır. Lipazların büyük bir çoğunluğu aktif bölgelerini örten bir helikal segmente (kapak/lid) sahiptir. Lipid kümelerinin varlığında bu kapak açılır ve yüzeyler arası aktivasyon gerçekleşir. Sulu ortamda lipazlar için baskın konformasyon kapalı formdur. Aktif bölge, kapak yapısını oluşturan bir ya da daha fazla “loop” tarafından çözücünden korunmuştur. Kapağın dış parçası hidrofiliktir. Bu konformasyon elektrostatik etkileşimler aracılığıyla kararlı kılınmıştır. Bir su-yağ emülsiyonunda kapağın açılması, substratların aktif bölgeye girişine izin verir (açık konformasyon). Kapağın açılmasıyla, nükleofilik serin artığı büyük hidrofobik yüzeyler ile etkileşir ve lipaz enziminin aktif forma geçmesi sağlanır (Malcata ve ark., 1992).

1.1.3.2. Spesifiklikleri

Lipazlar gliseridleri hidrolizleme yeteneklerine göre üç ana gruba ayrılırlar. İlk grup (örneğin; *Rhizopus* ve *Rhizomucor* lipazları) 1,3 bağlarına spesifiktir. Terminal gruplardan parçaladığından 1,3 spesifik olarak adlandırılırlar. İkinci grup lipazlar spesifik değildir, hem primer hem sekonder esterleri parçalayabilirler. Üçüncü grup cis-9 ise sadece özel bir tip yağ asidinin bulunduğu ester bağı parçalarlar (*Geotrichum candidum* ve çimlenmemiş yulaf tohumları öncelikle 9-10 doymamış yağ asitlerinin esterlerini parçalarlar) (Kamini ve ark., 2000).

1.1.3.3. İnhibitör ve Aktivatörleri

Serbest yağ asitleri ve alkollerin, lipaz katalizli hidroliz reaksiyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Serbest yağ asitlerinin, ara yüzeyde birikerek enzimin trigliserid moleküllerine ulaşmasını önlemek yoluyla, düşük molekül ağırlıklı alkollerin ise enzimin üç boyutlu yapısına zarar vermek yoluyla etki gösterdiği düşünülmektedir. Safra tuzları bazı lipazların (*Phycomyces nitens* lipazı) aktivitesini arttırmaktadır

(Kamini ve ark., 2000). Bazı hafif metal katyonları substratları üzerine etki ederek lipaz aktivitesini etkilerler. Kalsiyum iyonları genellikle reaksiyon hızını artırır. Sodyum iyonları çözümlü pankreatik ve *Aspergillus wentii* lipazının aktivitesini artırırken, bu iki iyon *Aspergillus niger*'in iki lipazını inhibe eder. İyon konsantrasyonu ve maruz kalma süresine bağlı olarak ağır metal katyonları dönüşümlü ya da dönüşümsüz inhibisyona neden olabilir. Fe^{+3} iyonları *A. niger* lipazı ve *Streptococcus faecalis* lipazı hidrolitik aktivitelerini artırırken, Fe^{2+} iyonları *A. niger*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* ve *S. faecalis* lipazı aktivitelerini inhibe etmektedir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

1.1.3.4. Optimizasyon Koşulları

Lipazların büyük ölçüdeki endüstriyel uygulamaları için büyük miktarlarda üretimleri gereklidir. Bu nedenle lipazın yüksek miktarda üretilebildiği koşulların belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır (Chen ve ark., 2007). Karbon ve azot kaynakları, sıcaklık, pH, inorganik tuzların konsantrasyonu ve oksijen varlığı gibi faktörler lipaz seviyesini etkilemektedir (Sharma ve ark., 2001; Chen ve ark., 2003). Lipaz üretimi şekerler, şeker alkoller, polisakkaritler, süt suyu, kazaminoasitleri ve diğer kompleks kaynaklar gibi karbon kaynaklarından da önemli ölçüde etkilenmektedir (Ghanem ve ark., 2000; Rashid ve ark., 2001). *Bacillus* sp'nin % 0,5 pepton ve % 0,3 maya ekstraktı bulunan bazal besiyerinde % 20 kesilmiş süt suyu + % 1 triolein içeren bazal ortamda en yüksek lipaz aktivitesi saptanmıştır (Ertuğrul ve ark., 2007). Oleik, linoleik ve linolenik asitler gibi uzun zincirli yağ asitlerinin, *P. mephitica* gibi çeşitli bakterilerin lipaz üretimini desteklediği bilinmektedir. Genellikle çeşitli *Bacillus* (*Bacillus* A30-1, *B. alcalophilus*, *B. licheniformis* H1) ve *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp., *P. fragi*, *P. fluorescens* BW 96CC) türleri ve *Staphylococcus haemolyticus*'un lipaz üretimi için pepton ve maya ekstrakt gibi nitrojen kaynakları kullanılmıştır (Lanser ve ark., 2002; Sharma ve ark., 2002). *Burkholderia multivorans*'ın lipaz üretimini indükleyici olan zeytinyağı/oleik asit ve nitrojen kaynağı olarak eklenen maya ekstraktlarının lipaz üretimini maksimum oranda etkilediği bildirilmektedir (Gupta ve ark., 2007).

Amonyum klorid ve diamonyum hidrojen fosfat gibi inorganik nitrojen kaynaklarının bazı mikroorganizmaların lipaz üretimini etkilediği kaydedilmiştir (Rathi ve ark., 2001). Üre ve amonyum sülfat lipaz sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir (Sztajer ve Maliszewska, 1989). Kofaktörler genellikle lipaz aktivitesi için gerekli değildir fakat divalent katyonlar enzim üretimini stimüle etmekte ya da inhibe etmektedir. Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} ve Sn^{2+} gibi ağır metaller lipaz aktivitesini büyük ölçüde inhibe etmektedir. Fakat Zn^{2+} ve Mg^{2+} lipaz aktivitesi için önemsiz inhibitörlerdir (Patkar ve Björkling, 1994). Ca^{2+} ve Mg^{2+} *Burkholderia* türlerinin lipaz üretimini stimüle ederken (Rathi ve ark., 2001), *B. multivorans*'ta Ca^{2+} lipaz üretimine pozitif etki ederken Mg^{2+} ise negatif etki etmiştir (Gupta ve ark., 2007). Kalsiyum klorid varlığında ise *Bacillus* sp. RSJ1'in lipaz üretimini stimüle olduğu bildirilmektedir. Fakat diğer metal iyonu tuzlarının çoğu lipaz üretimini inhibe etmiştir (Sharma ve ark., 2002). Fe'nin ise *Pseudomonas* sp. G6'nın lipaz üretiminde kritik rol oynadığı kaydedilmiştir (Kanwar ve ark., 2002). Gelişim ortamındaki başlangıç pH'sı lipaz üretimi için önemlidir.

Lipaz üretimi için optimum sıcaklık, mikroorganizmaların gelişim sıcaklıklarına benzerlik göstermektedir. Örneğin *Bacillus* sp. RSJ1 (Sharma ve ark., 2002) ve *B. cepacia*'da (Rathi ve ark., 2001) olduğu gibi lipaz üretimi için en iyi sıcaklık 50 °C'dir. Genel olarak lipazların 20-45 °C arasındaki sıcaklıklarda üretildiği görülmüştür (Kanwar ve ark., 2002; Ertuğrul ve ark., 2007; Kiran ve ark., 2007). Bakterilerin maksimum lipaz üretimi için en uygun inkübasyon süresi, inkübasyon periyodunun birkaç saatten birkaç güne kadar değiştirilmesi ile belirlenebilmektedir. *A. calcoaceticus* ve *Bacillus* sp. RSJ1 12 saatte (Mahler ve ark., 2000; Sharma ve ark., 2002) ve *B. thermocatenulatus* 16 saatte (Schmidt-Dannert ve ark., 1997) maksimum lipaz üretimi sağlanmıştır. *Pseudomonas* sp. ve *P. fragi*'nin 72 saat ve *P. fluorescens* BW 96CC'nin 96 saat inkübasyonundan sonra maksimum lipaz ürettiği tespit edilmiştir (Dong ve ark., 1999).

1.2. Lipaz Kaynakları

Lipazlar bitkisel kaynaklardan, hayvansal dokulardan ve mikroorganizmalardan elde edilir. Hayvansal lipazlar, doku ve vücut sıvılarının

çoğunda; bitkisel lipazlar, bitkilerde katman doku, kabuk ve köklerde bulunurlar. Hayvansal kaynaklı lipaz eldesi, genel olarak lipaz enzimi bakımından zengin olan pankreastan elde edilir. Bitkilerde lipazlar en çok yağlı tohumlarda ve daha az derecede tahıl tanelerinde bulunur (Mukherjee ve Hills, 1994). Yağ içeriği yüksek olan özellikle zeytin, ayçiçeği, fındık vb. bitkilerde lipaz enzimi mevcuttur (Arpigny ve Jaeger,1999). Lipazlar, pek çok mikroorganizma türlerinin bünyelerinde doğal olarak bulunur. Bu kaynaklar arasından, kolay üretilmesi ve pek çok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizlemesinden dolayı en fazla kullanılan ise mikrobiyal kaynaklı lipazlardır.

Ökaryotlarda lipazlar; yağların sindirimi, absorpsiyon, yeniden oluşum ve lipoprotein metabolizmasının dahil olduğu lipid metabolizmasının farklı aşamaları için gereklidir. Bitkilerde lipazlar enerji rezerv dokularında bulunmaktadır (Balashev ve ark., 2001). Lipazlar doğada bol bulunmasına rağmen (Klibanov, 2001) sadece mikrobiyal lipazlar ticari olarak önemlidir (Saxena ve ark., 2003). Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, yüksek verim imkânının olması, genetik manipülasyonlarının kolaylığı, mevsimsel dalgalanmanın olmamasından dolayı düzenli kaynağının olması ve pahalı olmayan ortamlarda mikroorganizmaların gelişiminin kolay olmasıdır (Wiseman, 1995). Ayrıca lipazların hayvansal ve bitkisel dokulardan elde edilmeleri zordur. Çünkü bu tür dokularda, hücrenin ya da hücre duvarının parçalanması gereklidir ve bunun için ekstra hücre parçalayıcılara ihtiyaç vardır. Bu işlemler sırasında enzimin yapısına da zarar verilebilmektedir (Taipa ve ark., 1992). Mikroorganizmaların ekstraselüler lipaz üretebilme kabiliyetleri mikrobiyal lipazların elde edilmesini kolay (Rathi ve ark., 2001) ve ekonomik kılar (Sharma ve ark., 2001). Bunun yanı sıra, mikrobiyal lipazlar küçük hacimlerde çok büyük miktarlarda (Jaeger ve Eggert, 2002) üretiltiklerinden endüstriyel açıdan hayvansal ve bitkisel lipazlardan daha önemlidirler (Gill ve Parish, 1997). Mikrobiyal enzimler aynı zamanda bitkisel ve hayvansal enzimlerden daha stabildir ve bunların ürünleri daha kullanışlı ve güvenlidir (Wiseman, 1995). Lipaz üreten mikroorganizmalar; bakteri, maya ve küflerdir (Sharma ve ark., 2001). Bu mikroorganizmalar, değişik alanlardaki topraklar (Jinwal ve ark., 2003), endüstriyel atıklar (Gombert ve ark., 1999), kompost yığınları (Rathi ve ark., 2000; Tsai ve ark.,

2007), kömür madenleri (Wang ve ark., 1995) ve sıcak su kaynakları (Castro-Ochoa ve ark., 2005; Li ve Zhang, 2005) gibi farklı habitatlardan izole edilmişlerdir.

Lipaz tarafından katalizlenmiş olan reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzetmesinden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla daha çevre dostu olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle lipazın katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve notral pH gerektirir, enerji gereksinimi düşüktür ve de ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir ve bu aktivite özellikle de substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Bu kavram ara yüzey aktivasyonu olarak tanımlanabilir. Bu sebeple, en yüksek aktivitelere, substrat için yüksek yüzey alanına ulaşıldığı emülsiyon sistemlerinde ulaşılmaktadır (Yang ve Rhee, 1992).

1.2.1. Mikrobiyal Lipazlar

Çeşitli yağlı esterlerin hidrolizlerini katalizleyen lipazlar, hayvan, bitki ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler. Bunlar içerisinde özellikle mikrobiyal lipazlar ticari olarak daha önemlidirler (Ghosh, 1996) (Tablo 1.1). Lipaz üreten mikroorganizmalar, endüstriyel atıklar, sebze yağı üreten fabrikalar, mandıralar, yağ ile kontamine olmuş topraklar, yağ içeren tohumlar, çürümüş gıdalar, kompost yığınları gibi farklı habitatlardan elde edilebilmektedir. Tek bir suşdan birden fazla enzim üretilir ve bunlar farklı genetik orijine sahip olabilirler ya da bir amino asidin modifikasyonu sonucu üretilirler. Örneğin *Rhizopus delemar*'ın kültür filtratından üç farklı lipaz (A, B, C) elde edilmiştir. Bu enzimler saflaştırıldıktan sonra, Lipaz B ve C'nin tek bir proteinin farklı formları olduğu, ancak Lipaz A'nın farklı bir protein olduğu görülmüştür.

Penicillium crustosum'dan fermentasyon ile elde edilen iki lipaz, zeytinyağı ve tribütirin üzerinde farklı aktiviteler göstermelerine rağmen, bunların değiştirilebilir oldukları gösterilmiştir. Taksonomik olarak yakın suşlar farklı tiplerde lipaz üretebilirler. Toprakta, alkali lipaz üreten iki *Pseudomonas* suşu izole edilmiştir ve *P. nitroreducens* ve *P. fragi*'den elde edilen lipazların çok farklı termal stabilitelerde oldukları bulunmuştur (Kulkarni, 2002).

Tablo 1.1 Mikrobiyal lipaz kaynakları

Mikroorganizma	Fermentasyon	Aktivite (EU.m/L)	Deney Ortamı
BAKTERİ			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Çalkalamalı kültür	4,5	Zeytinyağı, 37°C, pH 8.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Çalkalamalı kültür	17	Tributirin, 37°C, pH 8.0
<i>Chromobacterium viccosium</i>	30 L-fermentör	10,8	Domuz yağı, 40°C, pH 7.0
<i>Micrococcus caseolyticus</i>	Çalkalamalı kültür	15	Zeytinyağı, 40°C, pH 9.5
<i>Bacillus licheniformis</i>	Çalkalamalı kültür	6	Zeytinyağı, 45°C, pH 8.5
<i>Pseudomonas fragi</i>	20 L-fermentör	75	Zeytinyağı, 37°C, pH 9.0
<i>Pseudomonas nitroductens</i>	20 L-fermentör	500	Zeytinyağı, 37°C, pH 9.0
<i>Alcaligenes sp.</i>	15 L-fermentör	800	Zeytinyağı, 37°C, pH 8.7
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Çalkalamalı kültür	-	Tributirin, 55°C, pH 8.8
MAYA			
<i>Candida cylindracea</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytinyağı, 30°C, pH 7.0
<i>Candida cylindracea</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytinyağı, 37°C, pH 7.0
<i>Torulopsis ernobii</i>	30 L-fermentör	110	Zeytinyağı, 37°C, pH 6.5
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Çalkalamalı kültür	40	Zeytinyağı, 30°C, pH 9,5
<i>Candida lipolytica</i>	2 L-fermentör	1	Zeytinyağı, 37°C, pH 8.2
KÜF			
<i>Aspergillus luchuensis</i>	Katı substrat		Zeytinyağı, 40°C, pH 7.0
<i>Aspergillus niger</i>	Çalkalamalı kültür	4	Zeytinyağı, 37°C, pH 6.5
<i>Rhizopus delemar</i>	Batık kültür	60	Zeytinyağı, 37°C, pH 7.5
<i>Rhizopus arrhizus</i>	100 L-fermentör	350	Zeytinyağı, 37°C, pH 8.5
<i>Geotrichum candidum</i>	Yüzey kültür	6	Zeytinyağı, 32°C, pH 8.5
<i>Geotrichum candidum</i>	Çalkalamalı kültür	170	Zeytinyağı, 30°C, pH 5.6
<i>Mucor lipolyticus</i>	Çalkalamalı kültür	90	Zeytinyağı, 37°C, pH 8.0
<i>Humicola lamiginosa</i>	600 L-fermentör	55	Zeytinyağı, 45°C, pH 8.0
<i>Myricum sp.</i>	20 L-fermentör	4	Zeytinyağı, 55°C, pH 8.0
<i>Phycomyces spp.</i>	Fermentörler	160	Zeytinyağı, 37°C, pH 7.0
<i>Penicillium funiculosum</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytinyağı, 37°C, pH 8.0
<i>Byssoschlamys fulva</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytinyağı, 37°C, pH 8.0
<i>Fusarium solani</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytinyağı, 37°C, pH 8.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	Çalkalamalı kültür	220	Tributirin, 30°C, pH 7.0

1.2.2. Fungal lipazlar

Fungal lipazlarla ilgili çalışmalar 1950'lerin başında başlamış, Lawrence ve daha sonra Brockerhoff ve Jensen tarafından bu enzimler çeşitli yönlerden tartışılarak kapsamlı olarak incelenmiştir. Bundan sonra birçok araştırmacı termal stabilite, substrat zgllg ve organik çözücülerdeki aktivitelerinden dolayı lipaz kaynağı olarak fungusların önemli bir yere sahip olduğunu gstermiştirler. Fungal lipazlar, grup fermentasyonunda kullanılmaları ve düşük maliyette ekstraksiyon metotlarından dolayı bugün teknolojiye tercih edilmektedir. Bu sebeplerden lipaz üretimi için funguslar araştırılmıştır. Ticari lipazların belli başlı reticileri; *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. carneus*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae*'dir (Ghosh ve ark., 1996).

Kflerden elde edilen lipazlar, hem katı kültür hem de derin kültür metodu kullanılarak üretilmektedir. Ezilmiş buğday kepeği ortamında *Aspergillus luchuensis*'i kullanarak katı kültür yöntemi başarı ile uygulanmıştır. *R. delemar*'ın katı kültür yönteminde, buğday kepeği üzerinde, belirlenebilir miktarda lipaz üretmedikleri, ancak sulu kültürler içinde üretebildikleri gösterilmiştir. Bu olay sıvı kültürlerde değil de yarı katı kültürlerde ekstraselüler olarak üretilen proteazın, lipazı dejenere etmesinden kaynaklanır.

Araştırmacılar, *Aspergillus* türleri için, katı kültür ya da derin kültür yöntemlerinden hangisinin kullanılacağının suşlara göre değişebileceğini ne sürmüşlerdir (Iwai ve Tsujisaka, 1984). Sıvı kültürlerinde havalandırmalı veya çalkalamalı kültür yöntemlerin uygulanması, tek hücreli organizmalardan veya birçok filamentöz kften lipaz eldesinde fayda sağlamıştır. Statik kültürün havalandırmalı veya çalkalamalı kültüre değiştirilmesi ile lipaz verimindeki artışlar literatürde mevcuttur.

1.2.3. Bakteriyel lipazlar

Lipazlar, bakteriler tarafından da üretilmektedir. 1901'de *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* ve *B. fluorescens*'de bu enzimlerin varlığı gözlenmiştir. Günümüzde en çok çalışılan, lipaz üreten bakterilerden bazıları sırasıyla *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* ve *P. fluorescens* olarak bildirilmiştir (Arpigny ve Jaeger, 1999). Ayrıca, *Streptomyces* sp., *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Burkholderia* sp. ve *Chromobacterium* sp. (Ghosh ve ark., 1996) cinsleri lipaz üretimi için kullanılmaktadır.

Gram negatif bakteriler lipaz üretimi açısından ele alındığında *Pseudomonas*'lar bu grup içinde kuşkusuz ki en önemli cinslerden biridir. Bu cinse ait lipazların cazipliği, sahip oldukları enantiyospesifik biyokatalitik etkinliği ve organik çözücü toleransı ve buna ilaveten alkali ve termostabil olması nedeniyledir (Singh ve Banerjee, 2007). *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ürettiği lipazların çoğunluğu hücre dışıdır. Aminoasit sekans analizlerine göre yapılan değerlendirme sonucunda *Pseudomonas* lipazları moleküler ağırlıklarının (Mr) artışına göre üç gruba ayrılmıştır. Grup-I, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fragi* ve diğer *Pseudomonas* türlerini içeren moleküler ağırlığı en küçük lipazların bulunduğu birinci gruptur. Grup-I lipazları, yaklaşık 285 aminoasit içeren ve Mr değeri yaklaşık 30.000 dalton olan lipazları kapsamaktadır. Grup-II lipazları, *P. cepacia* ve *P. glumae* türlerini kapsamaktadır. Grup II lipazları yaklaşık Mr 33.000 dalton olan ve grup I aminoasitleri ile %60 homoloji gösteren 320 aminoasitden oluşur ve bir tane disülfid köprüsü içerir. *P. cepacia* ve *P. glumae*'dan elde edilen lipazlar geniş substrat spesifitelerinden dolayı Novo-Nordisk (Danimarka) ve Unilever (Hollanda) firmaları tarafından ayrıntılı biçimde incelenmiştir. Doğru biçimde katlanmada ilave gen ürününe (lif) bağımlılık gösterir. *Pseudomonas*ların grup III lipazları 50.000 Dalton Mr'lık yaklaşık 475 aminoasit içeren büyük proteinlerdir. *P. fluorescens* tarafından üretilir. Bu lipazlar grup I ve grup II lipazlarından tipik sinyal sekansı, sistin kalıntısı içermediğinden ve lif benzeri proteinlere ihtiyaçları olmadığından tamamen farklıdır. Tek basamaklı yol izleri ile hücre dışına salgılanırlar (Jaeger ve ark., 1994).

1.2.3.1. Lipaz Üretimi İçin Bakteri Seçimi

Lipaz üretimi için seçilecek olan bakteri türünde aranması gereken ilk şart lipazı bol miktarda üretiyor olmasıdır. Bunun yanında bakteri tür seçimini aşağıda belirteceğimiz başka parametreler de etkiler (Jaeger ve Eggert, 2002).

1. Kısa bir fermantasyon süresi sonunda organizma yüksek verimle lipaz üretmelidir.
2. Ekstrasellüler enzim üretimi tercih edilir. Çünkü hücre membranı parçalama işlemi gerektirmeden enzim izolasyonu kolaydır.
3. Seçilecek bakteri türü, toksik madde ve antibiyotik üretmemeli, ucuz besi ortamında çoğalıp faaliyet göstermeli ve gerek üretilecek enzime zarar verecek gerekse izolasyon ve saflaştırma adımlarında problem yaratabilecek yan ürünleri (renkli ve sümüksü maddeler, proteazlar vb.) de salgılamamalıdır.
4. Bakteri kültür ortamı koşullarında enzim verimliliği açısından kararlı olmalıdır.
5. Kültürler filtrasyon veya santrifüjleme ile berraklaştırma sırasında olabildiğince az problem çıkarmalıdır.
6. İntrasellüler enzimler durumunda hücreler kolay parçalanmalıdır.

1.2.3.2. Bakteriyel Lipaz Fermentasyon Özellikleri

Sıcaklık, pH, azot, karbon kaynakları, lipit kaynakları ve oksijen konsantrasyonu gibi çeşitli çevresel faktörlerin lipaz üretiminde etkili oldukları bilinmektedir. Lipaz üretimi genellikle lipitler tarafından indüklenmektedir. Lipaz aktivitesi sürekli olarak bir pik yapıncaya kadar artar sonrada azalır. Lipaz üretimi genellikle ortamda bulunan trigliseridlerin varlığına bağlıdır. Serbest yağ asitleri, hidrolizlenebilen esterler, safra tuzları ve gliserol de lipaz üretiminde indükleyici olarak görev yapabilen diğer maddelerdir.

Lipaz üretimi için kültür ortamının başlangıç pH'sı daima önemlidir. *P. fragi* için maksimum aktivitenin pH > 7,0 ve *P. aeruginosa* için ise pH 9,0'da olduğu belirtilmiştir (Saxena, 2003). Bunun aksine, *S. lipolytica*, *M. caseolyticus*, *B. licheniformis*, *A. wentii*, *M. hiemalis*, *R. nigricans*, *Mucor racemosus*, *R. oligosporus*

ve *P. aeruginosa* EF2 için maksimum lipaz aktivitesinin asidik pH'da (4,0-7,0) olduğu bildirilmiştir.

P. fluorescens ve *P. fragi* tarafından yapılan lipaz üretiminde sıcaklığın 8 °C derecenin üstüne çıkarılmasının baskılayıcı bir etki yaptığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, *P. fluorescens* tarafından yapılan lipaz üretiminin 20 °C derecede ani inaktivasyonu, gizli proteinazlar tarafından eş zamanlı bir şekilde potansiyel olarak bakteriyel lipazları inaktive edebildiklerini ve bu etkinin daha yüksek sıcaklıklardaki (30-40 °C) kültür ortamlarında daha fazla olduğunu göstermektedir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

1.2.3.3. Pseudomonas Türlerinde Lipaz Üretimi

Pseudomonas cinsinin üyeleri tarafından üretilen ekstraselüler lipazlar; trigliseridlerin hidrolizi, esterifikasyonu, transesterifikasyonu veya esterlerin kiral seçici sentezinde geniş potansiyel uygulama alanına sahiptirler. Pseudomonas türlerinden bakteriyel ekstraselüler lipazların üretimi bunların endüstriyel alanda kullanılma özelliklerinden dolayı geniş çapta çalışılmaktadır (Roseau ve Jaeger, 2000).

Bakterilerin lipaz genleri klonlanmış, sekansları yapılmış ve karakterize edilmiştir. Buna göre bakteriyel lipazlar sekiz familyaya ayrılmıştır. Bu familyalar içinde toplam 22 üyeden oluşan familya I en büyüğü olup altı alt familya içermektedir. Alt familya I.1, I.2 ve I.3 *Pseudomonas* cinsi lipazlarını içermektedir. Alt familya I.1 ve I.2, yüksek aminoasit sekans homolojilerine (% 40'da fazla) rağmen regio- ve enantiyo- selektivitelerinde belirgin farklılıklar gösterirler. Bunlar endüstride farmasötikler, pestisitler ve insektisitlerin sentezinde yapı vazifesini gören kiral kimyasalların üretimi için kullanılırlar. Alt familya I.1 ve I.2 lipazlarından daha büyük bir moleküler ağırlığa sahiptir. Familya I.1'in prototip enzimi, *P. aeruginosa*'dan saflaştırılmış ve moleküler ağırlığının 29 kDa olduğu tespit edilmiştir. Bu enzimin ayrıntılı olarak çalışılmasının iki sebebi vardır. Bunlardan ilki immün sistemi zayıf olan hastalarda çeşitli enfeksiyon hastalıklarına sebep olan fırsatçı patojen *P. aeruginosa*'nın virulans faktörü olup, bu durumda lipazlar, diğer

enzimlerle birlikte karaciğer sürfaktantlarını içeren konakçı selüler membranın bozulmasına yol açarak sinerjistik aktivite gösterirler. Diğer sebebi ise *P. aeruginosa* lipazının, endüstriyel olarak önemli substratların hidroliz ve sentezini katalizlemesi ve biyoteknolojik uygulamalarda yüksek oranda kullanılmasıdır (Dong ve ark., 1999).

Deterjan sanayisinde Lipolase'dan sonra 1995'de iki bakteriyal lipaz *P. mendocina*'dan 'Lumafast' ve *P. alcaligenes*'den 'Lipomax'– Genencor International tarafından çıkarılmıştır (Jaeger ve Eggert, 2002). *Pseudomonas*'lar arasında üç önemli tür; *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* lipaz üretimi için kullanılmaktadır. Çiğ deve sütünden izole edilen on suşun lipaz aktivitesi araştırılmış ve en yüksek aktivite *P. fluorescens* RM4 olarak tanımlanan suшта gözlenmiştir. Bu suşun geniş bir sıcaklık aralığında gelişme gösterdiği ve lipaz ürettiği belirtilmiştir. Lipaz üretimi için topraktan izole edilen suş *Pseudomonas* olarak tanımlanmıştır. *Pseudomonas luteola* suşunun lipaz üretimi Rhodamine B agarda tespit edilmiş, lipaz aktivitesi substrat olarak zeytinyağı kullanılarak titrasyon metoduyla belirlenmiştir. Bu suştan elde edilen ekstrasellüler lipaz, sıvı-sıvı ve anyon değişim kromatografisiyle 17 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin termostabil olduğu ve optimum sıcaklığın 55 °C olduğu belirtilmiştir (Jaeger ve Eggert, 2002).

Topraktan izole edilen *P. mendocina* PK-12CS suşu, pH 8'de uzun zincirli yağ asitlerinin trigliseridlerine (tripalmitin, triolein, trilinolin) ve doğal yağlara (zeytinyağı, soya yağı, hardal yağı, hindistan cevizi yağı ve badem yağı gibi), kısa zincirli trigliseridlere oranla daha yüksek aktivite sergilemiştir. Lipaz optimum aktiviteyi pH 8'de göstermiş ve pH 8.6'nın üstünde ve pH 7.6'nın altında aktivitenin ani olarak düştüğü tespit edilmiştir. Enzim üretimi, 37 °C'de pH 7.6-8.6 aralığında en yüksek olmakla birlikte, geniş pH aralığında (5.6-9.0) stabil olduğu gözlenmiştir (Beisson ve ark., 2000). Lipaz, yağ atıkları ve poliüretan degradasyonunu hızlandırmada da kullanılabilir. Restoran atık sularından izole edilen ve lipaz üreten *P. aeruginosa* LP602 suşunun, yüksek lipit içeren gıda ünitelerindeki atık suların iyileştirilmesinde iyi bir potansiyel olacağı bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2004).

1.2.3.4. Acinetobacter Türlerinde Lipaz Üretimi

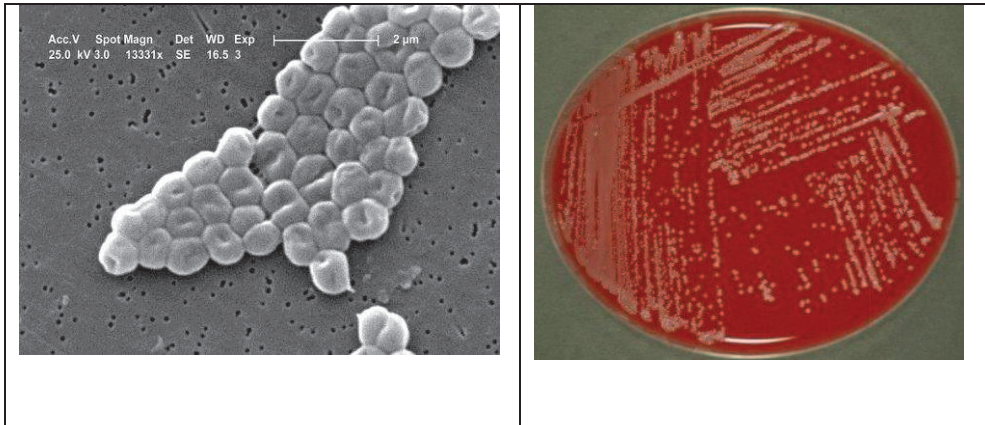
Acinetobacter cinsi gram negatif, hareketsiz ve fermentasyon yapmayan, Moraxellaceae familyasına ait bir bakteri cinsidir. Acinetobacter cinsine ait 17 tane adlandırılmış ve 14 tane adlandırılmamış tür vardır. Önemli toprak organizmalarından olup aromatik bileşenleri metabolize ederler.

1986'da Bouvet ve Grimont Acinetobacter genusunu DNA-DNA hibridizasyonu ve beslenme özelliklerine göre 12 farklı gruba ayıran yeni bir sınıflandırma yapmıştır. Tjenberg ve Ursing (1989) 13-15 arasında kodlanan 3 ilave DNA grubu daha bildirmişlerdir. Bunu takiben Bouvet ve Jeanjcan (Bouvet ve Jeanjcan, 1989) proteolitik Acinetobacter türlerinden oluşan ve 13-17 arasında numaralandırılan 5 DNA grubu daha bildirmişlerdir. Ancak Tjenberg ve Ursing'in tanımladığı 2 DNA grubu Bouvet ve Jeanjcan'ın (1989) tanımladığı DNA gruplarından fenotipik olarak farklı olduğu bildirilmiştir. Bunun sonucunda farklı DNA grupları aynı sayıyla ifade edilmiştir. Şu anda Acinetobacter genusu içinde en azından 25 genomik tür tanımlanmıştır.

Acinetobacterlerin de içinde yer aldığı nonfermenter Gram negatif basiller 15 familya içinde sınıflandırılır. Bunlar; Alcaligenaceae (Alcaligenes, Achromobacter, Bordotella, Oligella), Alteromonadaceae (Alishewanella, Shewanella), Brucellaceae (Ochromabactrum), Burkholderiaceae (Burkholderia, Cupriavidus, Pandoraea, Ralstonia), Caulobacteraceae (Brevindumonas), Comamonadaceae (Comamonas, Acidovorax, Delftia) Flavobacteriaceae (Flavobacterium, Bergeyella, Chryseobacterium, Empedobacter, Myroides, Weeksella) Methylobacteriaceae (Methylobacterium, Roseomonas), Moraxellaceae (Moraxella, Acinetobacter, Psychrobacter) Oceanospirillaceae (Balneatrix), Pseudomonadaceae (Pseudomonas), Rhizobiaceae (Rhizobium, Agrobacterium), Sphingobacteriaceae (Sphingobacterium, Pedobacter), Sphingomonadaceae (Sphingomonas) ve Xanthomonadaceae (Stenotrophomonas). Bunlara ilave olarak henüz bir familya içerisinde gösterilmemiş ve taksonomik pozisyonları hala belirsiz olan bir grup klinik açıdan önemli nonfermenter daha vardır.

Günümüzde yeni, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı olarak diğer nonfermentatif bakterilerle birlikte hastane infeksiyonlarının en sık saptanan etkenlerinden biri haline gelmiştir. *Acinetobacter* sp., hastane infeksiyonlarının % 3-20'sinden sorumludur. *A. baumannii-calcoaceticus* kompleksi tüm klinik *Acinetobacter* izolatlarının % 80'ini oluşturur. *A. baumannii* dışında kalan türler daha çok gıdalardan izole edilir. *A. baumannii* dışındaki türlerin klinik örneklerden tekrarlanan izolasyonu anlamlı kabul edilmektedir (Kok ve Thor, 2006).

Kanlı agardaki inkübasyonun 24. saatinden sonra koloniler 0.5-2 mm çapında yarı saydam opak, dışbükey ve bütün olarak görünmektedir. Çoğu suş Mac Conkey agarda iyi ürer ve zayıf pembe renk tonu oluşturur (Şekil 1.4). *Acinetobacter* türlerinin muhtemel tanımlanması; sitokrom oksidaz aktivitesinin olmaması, hareketsizlik ve penisiline direnç temeline dayanarak yapılabilir.



Şekil 1.4 *Acinetobacter*lerin mikroskopik ve besiyeri görüntüsü gösterilmiştir.

Acinetobacter lipofilik suşları insan derisi, süt ve diğer gıda ürünleri gibi substratlar dışında temiz ve kirli toprak ve su habitatlarında bulunur. Lipolitik *Acinetobacter* suşlarının izolasyonu ve özellikleri Tablo 1.2 de gösterilmiştir. Sakrofilik bakteriyel suşlarında lipaz üretimi süt ürünlerinde ekşime ve bozulmalara yol açmaktadır.

Acinetobacter suşlarının genelde yaşam alanlarının geniş olması, metabolik özelliklerinin güçlü olması, modern moleküler genetik manipülasyona uygun olması

nedeniyle biyoteknolojik gelişim için uygun bir kaynak olma özelliği oluşturmaktadır.

Tablo 1.2 Lipolitik *Acinetobacter* suşlarının izolasyonu ve özellikleri.

Suş	Kaynak	Tanımlama
Çeşitli	Taze su (kirletilmiş)	Mezofilik / psikrofilik
O ₁₆ /O ₄	Taze su	Mezofilik / psikrofilik
69 V	Bilinmiyor	
SY1,IB2,BO2	Sulu çamur	
BD413	Toprak	
RAG-1	Deniz suyu	
OPA 55	Zeytinyağı	
AAAC323-1	Toprak	BD413 derivasyonu
CMC-1	Toprak	
LP009	Çiğ süt	Psikotrofik
KM109	Toprak	
16265	Klinik	
Suş No:6	Toprak	
Varyasyon (50)	Klinik	Psikotrofik
SY-01	Çamurlu su	

Arpigny ve Jaeger (1999) tarafından lipaz üreten bazı *Acinetobacter* suşları tablo 1.3'deki gibi alt gruplara ayrılmıştır. Saflaştırılmış *Acinetobacter* lipazlarının biyokimyasal özellikleri suşlara göre belirtilmiştir.

Tablo 1.3 Lipolitik Acinetobacter Suşlarının Biyokimyasal Özellikleri

Suş	MW (kDa)	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	İnhibitörler	Tanım
<i>A.calcoaceticus</i> AAC323-1	NR				Ca ⁺² stabilize
<i>A.calcoaceticus</i> BD413	32	7.8-8.8			LCFA spesifitesi mevcut.
<i>A.radioresistens</i> CMC-1	45	10.5/8-11	40	Zn ⁺² , PMSF	LCFA spesifitesi mevcut.
<i>Acitenobacter</i> nov.suş.KM109	62	8 /6-8	45		Benzoat esterlerini hidrolize eder.
<i>A.calcoaceticus</i> LP009	23	7/4-8	50	EDTA, Acetonitrile	Ca ⁺² ile aktive edilir.
<i>Acitenobacter</i> sp.0 ₁₆	≥200	7.5/NR	35		Ca ⁺² ile aktive edilir.
<i>Acitenobacter</i> sp.RAG-1	33	9/6-9	55	EDTA, piridin	C ₆ karşı spesifite
<i>Acitenobacter</i> sp.SY-01	43.8	10/9-11	50		C ₂ -C ₆ spesifite

1.3. Lipazların Analiz Yöntemleri

Enzim aktivitesinin tayini aslında enzimatik reaksiyonun hızının tayinidir. Bu nedenle genelde reaksiyon hızı için kullanılabilen yöntemler aktivite tayini için de kullanılabilirler. Aktivite tayininde ya kaybolan substrat miktarı veya meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülmektedir. Lipazlar, trigliseridleri hidrolize ederler ve serbest yağ asitleri ve gliserolün meydana çıkmasına sebep olurlar. O nedenle, bu enzimler için analiz metotları genel olarak serbest yağ asitlerinin oluşumunun analiz edilmesi kriterleri etrafında gelişmiştir. Serbest yağ asitlerinin oluşumunu araştırmak amacıyla kalitatif olarak jel difüzyon analizleri ve kantitatif olarak titrimetri, kalorimetrik analiz, floresans, kromatografik prosedürler (Thin Layer Chromatography; TLC/Gas chromatography; GC /High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ve immünolojik metotlar kullanılmaktadır (Beisson ve ark., 2000).

1.3.1. Kalitatif Analiz

Lipaz üreten suşlar tribütirin agarda geleneksel olarak incelenmektedir. Dört karbonlu sentetik bir trigliserid olan tribütirinin hidrolizi ile oluşan zon ya esteraz ya da lipaz aktivitesini göstermektedir. Ayrıca Tween 20 ve Tween 80'li besiyerlerinde de bakteri kolonilerinin etrafında kristalleşmenin görülmesi esteraz veya lipaz aktivitesini göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, zeytinyağı ilave edilen katı besiyerleri lipaz pozitif kolonilerin araştırılmasında kullanılmıştır (Haki ve Rakshit, 2003).

Alternatif olarak katı besiyerlerine indikatör eklenerek renkli zon oluşumu gözlenmiştir. Nile blue sülfat, victoria blue, metil red, fenol red indikatör olarak kullanılmıştır (Beisson ve ark., 2000). Bu testler katı besiyerlerinde lipolitik mikroorganizmaların gelişimlerini hızlı bir şekilde araştırmak için uygundur. Ancak bazı pozitif yanlış sonuçlar görülebilir. Bu mikrobiyal lipazlar tarafından serbest bırakılan yağ asitlerinin, asidik metabolitler üretmesinden dolayı ortamın asidifikasyonundan kaynaklanmaktadır. Bunu engellemek için floresan Rhodamine B boyasını kullanarak 365 nm dalga boyunda UV ışığı altında turuncu floresan olarak lipolizis zonlarını göstermişlerdir. Rhodamin, serbest yağ asitleriyle floresan bir kompleks oluşturur. Böylece lipaz üreten koloniler görünür UV ışığı altında floresan hâleler gösterir. Burada substrat olarak triolein (trioleoilgliserol) kullanılır. Ayrıca zeytinyağı içeren besiyerlerinde (Matinez and Soberón-Chávez, 2001) ve Tween 80 içeren besiyerinde kristalleşmenin gözlenmesi (Smibert ve Krieg, 1994) ile de lipaz aktivitesinin belirlenmesi mümkündür (Jaeger ve Eggert, 2002).

1.3.2. Kantitatif analiz

1.3.2.1. Titrimetri

Hidrolaz sınıfı enzimlerin katalizlediği reaksiyonların büyük çoğunluğunda H^+ açığa çıkar. Oluşan H^+ konsantrasyonu reaksiyon hızı ile orantılıdır (Beisson ve ark., 2000). Özellikle substratları suda iyi çözünmeyen hidrolazların (lipazlar gibi) aktivite tayinleri için titrasyon çok uygun bir yöntemdir. Burada substrat olarak uluslararası kabul gören triolein veya buna ucuz bir alternatif olan zeytinyağı

kullanılır. Bundan başka tribütirin, triasetin (triasetilgliserol) ve tripropiyonin (tripropiyonilgliserol) de enzimatik aktivite tayininde substrat olarak kullanılabilir. Bununla birlikte lipazlar, kısa zincirli triaçilgliserollerle karşılaştırıldığında, triolein gibi uzun zincirli triaçilgliserolleri daha yüksek oranda hidrolize etmektedir (Jaeger ve Eggert, 2002). Lipolitik reaksiyonda, asidin serbest bırakılması titrimetrik olarak analiz edilebilir. Nicel yöntemde reaksiyon yönünde pH ölçülür. Titrimetrik metotlar zamana bağlı olarak serbest yağ asitlerinin serbest bırakılmasıyla sodyum veya potasyum hidroksitin nötralizasyon oranını ölçmektedir.

1.3.2.2. Spektrofotometrik Analiz

Genel olarak yağ asidi zinciri çeşitli uzunluğa sahip *p*-nitrofenil esterleri substrat olarak kullanılır ve meydana gelen *p*-nitrofenol 410 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür. Kısa zincirli esterler suda çözünür ve o nedenle bu hidroliz lipaz aktivitesinden ziyade esteraz aktivitesinin ölçülmesini sağlar. Bununla birlikte *p*-nitrofenil palmitat lipaz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılır. Bu analiz için sınırlayıcı olan enzimatik aktivitenin asidik pH’da *p*-nitrofenol’ün absorbans vermemesinden dolayı asidik pH’da yapılamamasıdır. Enzimatik aktivite sadece nötral veya alkali pH değerlerinde bu prosedürle tespit edilebilir (Kouker ve Jaeger, 1987).

Kalorimetrik analiz, renksiz naftil karpilat (oktanat) esterinin hidrolizi ile meydana gelen renkli naftol’un 560 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle de yapılabilir. Renk üretiminin ölçülmesinden başka spektrofotometrik analizler yağ asitlerinin, kalsiyum veya bakırla çöktürülmesiyle yapılabilir. Substrat olarak tween kullanılır. Absorbans artışı 500 nm’de ölçülür ve bu türbidimetrik metot, basit bir yöntem olup tween 20 ile yapılan titrimetrik analizden 36 kat, *p*-nitrofenil palmitatla yapılan spektrofotometrik analizden en az dört kat daha hassastır (Von Tigerstrom ve Stelmaschuk, 1989)

1.3.2.3. Florimetrik Analiz

Floresan bileşikler lipaz analizi için kullanılırlar. Metot, lipaz aktivitesinden dolayı serbest bırakılan floresan yağ asitlerinin ölçümünü gerektirir. Triaçilgliserollerin alkil grubunun, pirenil gibi floresan grupla yer değiştirmesiyle analiz gerçekleşir. Floresan özellikle serbest pirenil grupları oluşur.

Triaçilgliseroller hidrolize olduktan sonra pürin grupları 400 nm'de yer değiştirir. Floresan olmayan 4-metilum belliferil oleat substratı, lipaz etkisinden sonra floresan 4-metilum belliferon'un serbest bırakır. Hızlı bir yöntem olmasına rağmen substratların pahalı olması bunların kullanımını sınırlandırmaktadır (Jacks ve Kircher, 1967).

1.3.2.4. Kromatografik Prosedür

Kromatografi; lipit substratında, enzim katalizinin hidrolizini takiben serbest bırakılan yağ asitlerinin direk tespit edilmesi için kesin bir metottur. Spesifik kolonlar vasıtasıyla ürün veya artakalan substratın miktar tayini ve analizi yapılır.

Rutin analizler için zaman alıcı olmasına rağmen substrat spesifikliğinin tayininde kullanımı tavsiye edilmektedir. TLC; triaçilgliserollerden serbest yağ asitlerinin kalitatif analizde, işaretlenmiş triaçilgliseroller densitometrik veya autoradiografik metotları kullanılarak uygulanır.

Bunlar çok hassas metotlar olmalarına rağmen zaman alıcıdır. GC; resmi American Oil Chemists Society metoduna göre; yağ asitleri bunların metil esterlerine çevrilir ve GC ile miktar tayinleri yapılır. High Performance Liquid Chromatography (HPLC); lipolizis ürünleri kolaylıkla HPLC kullanılarak tanımlanabilir. Naftil laurat'ın substrat olarak kullanıldığı Maurich tarafından lipaz aktivitesini tanımlanması için HPLC metodu geliştirilmiştir (Maurich ve ark., 1991).

1.3.2.5. İmmünolojik Metotlar

İmmünolojik metotlar veya ELISA yüksek hassasiyet ve lipazların tespiti ve miktar analizleri için spesifik sistemlerdir. Bu immünolojik metotlar aktif veya aktif olmayan lipazların tespit edilmesinde kullanılırlar. Lipazların immünolojik tespitinde doğal veya rekombinant kaynaklardan enzimin saflaştırılmasına ihtiyaç vardır (Beisson ve ark., 2000).

1.4. Lipazların Önemi

Endüstriyel enzimler, çok çeşitli proseslerde uygulanabilmelerinden dolayı özellikle mikrobiyal kökenli olanlar için gelen talep sürekli artmaktadır. Enzim ortamlı reaksiyonlar, alternatifleri olan yorucu ve pahalı kimyasal reaksiyonlardan daha caziptir. Son on yılda lipazlar, özellikle organik sentez alanında, proteazlar ve amilazlara oranla kesinlikle büyük bir önem kazanmıştır.

Lipazların doğal enantio selektivite ve regiyo selektivitesinden, kiral ilaçların çözümlenmesi, yağ modifikasyonu, bitkisel yağ yerine kullanılan maddelerin sentezi, biyolojik yakıtların sentezi, kişisel bakım ürünlerinin sentezi ve aroma artırıcıların sentezi için yararlanılmaktadır. Bu nedenle lipazlar, günümüzde, organik kimyacıların, eczacıların, biyofizikçilerin, biyokimya ve proses mühendislerinin, biyoteknologların, mikrobiyolog ve biyokimyacıların enzim seçimidir.

Lipazlar serin hidrolazları sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Jaeger ve ark., 1994). Lipazların doğal substratları olan trigliseridler, suda çok düşük çözünürlüğe sahiptir. Doğal şartlar altında lipazlar, çözünmeyen bir substratlı faz ile enzimin çözünmediği sıvı faz arasındaki arabirimde bulunan ester bağlarının hidrolizini katalizler. Bazı deneysel şartlar altında, örneğin su yokluğunda, reaksiyonu tersine çevirebilmektedirler. Ters çevirme reaksiyonları, esterifikasyon ve yağ asitleri ile gliserolden gliseridlerin oluşmasına yol açar. Substrat ve sıvı faz arasındaki bir arabirim üzerinde lipaz reaksiyonunun oluşu, reaksiyonun kinetik analizi ve denemede zorluklara neden olur.

Alışılmış endüstriyel lipazlar, katı ve sıvı yağlar üzerine etki eden ve onların başlangıçta gliserid ve yağ asitlerinin yerine konulan maddeler için hidrolize ederler ve son olarak gliserol ve yağ asitlerinin toplam hidrolizlerini gerçekleştirirler.

Lipazlar ester bağlarına etki ettiği için, yağların ayrıştırılmasında, interesterifikasyonda (transesterifikasyon) peynirde farklı aromaların geliştirilmesinde, köpek maması yapımı için biftek yağının tadının değiştirilmesinde vs. kullanılmaktadır. Günümüz uygulamalarından biri, organik asit ve alkollerden farklı değerlerde eklenmiş esterlerin sentezi için susuz organik çözücüler için lipazların kullanımını gerektirmektedir.

Araştırmalar, bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların bilhassa bakteriyel ve fungal lipazların üzerinde uygulanmaktadır. Her ne kadar pankreatik lipazlar alışlageldiği gibi çeşitli maksatlar için kullanılsa da, günümüzde mikrobiyal lipazların çok yönlü özellikleri, kolay çoğalmalarından dolayı ticari uygulamalarda tercih edildikleri kabul edilmektedir.

1.4.1. Bakteriyel Lipazların Önemi

Bakteriyel lipazlar hücre içinde sentezlenip hücre dışına salgılanmasından, genetik manipülasyonlarla enzim üretiminin artırılabilir olması ve bitki ve hayvan lipazına kıyasla daha stabil olmasından dolayı endüstrilerde ve yağların tanınmasında enzimatik olarak geniş kullanım alanları bulmaktadırlar (Jaeger ve Reetz, 1998).

Hayvansal ve bitkisel hücrelerden elde edilen lipazlara göre avantajları;

- 1) Mikrobiyal enzimler daha kısa süre ve daha az maliyetle elde edilebilmektedir.
- 2) Mikroorganizmalardan elde edilen enzimin çeşitleri oldukça fazladır.
- 3) Enzimlerin mikroorganizmalardaki sentezlenen miktarı türüne göre değişir.
- 4) Ortam koşullarının değiştirilmesi ve genetik manipülasyonlarla sentezlenen enzim miktarı artırılabilir.
- 5) Sterospesifiklik, seçimlilik ve substrat seçimliliği gibi özellikleri sayesinde kimyasal katalizatlara göre daha kaliteli ürün üretimine imkan tanınması,
- 6) Düşük aktivasyon enerjisine gereksinim duymalarından ve ılımlı koşullarda (düşük ısı ve pH) reaksiyon vermelerinden dolayı, reaksiyon için ihtiyaç duyulan

enerjinin azalması ve reaksiyon ürünlerinin ortam ısısından dolayı göreceklere zararın indirgenmesidir.

Potansiyel endüstriyel uygulamalarda bakteriyel enzimler geniş çapta kullanılmaktadır. Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi pazar faktörleri tarafından da etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim nispeten kolay elde edilebilir. Fakat bitkisel kaynakların da endüstriyel hammadde olarak kullanılmaları gıda ihtiyaçlarına bağlıdır.

Bakteriyel enzimler ise büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca, mikroorganizmaların üreme süreleri kolaylıkla enzimlerin pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir. Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle bakteriler birçok üretim alanı için potansiyel olarak görünmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

1.5. Lipazların Kullanım Alanları

1.5.1. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

Endüstriyel uygulamalardaki potansiyelinden dolayı mikrobiyal lipaz üretimine ilgi son yıllardır giderek artmıştır. Protein ekstraksiyonu ve saflaştırma metotları, genetik mühendisliği ve buna bağlı olarak klonlama çalışmalarının ilerlemesi ile lipaz katalizli reaksiyonların klasik kimyasal yöntemlere kıyasla, ticari açıdan daha uygun alternatif oluşturacağı düşünülmektedir.

Ekolojik kaygılar da lipaz kullanımını desteklemektedir, lipaz katalizli reaksiyonlar canlı metabolizmasında gerçekleşen metabolik yollara eşdeğer olduğundan bu reaksiyonlar, kimyasal katalizli reaksiyonlara göre çevre açısından sorun oluşturmamaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998). Bu uygulamalara örnek olarak; gıda katkısı (lezzet artırıcı), kaliteli kimyasallar (ester sentezleri), deterjanlar (yağların hidrolizi), atık su arıtımı (yağ kalıntılarının uzaklaştırılması ve ayrılması), kozmetik (lipidlerin uzaklaştırılması), eczacılık (gıdalardaki katı ve sıvı yağların sindirimi), dericilik (hayvan derisindeki yağların uzaklaştırılması), medikal (kan

trigliserid tayini) verilebilir (Kirk ve ark., 2002). Bunun yanı sıra lipazların diğer avantajları;

- 1) Sterospesifiklik, seçimlilik ve substrat seçimliliği gibi özellikleri sayesinde kimyasal katalizatlere göre daha kaliteli ürün üretimine imkan tanınması,
- 2) Düşük aktivasyon enerjisine gereksinim duymalarından ve ılımlı koşullarda (düşük ısı ve pH) reaksiyon vermelerinden dolayı, reaksiyon için ihtiyaç duyulan enerjinin azalması ve reaksiyon ürünlerinin ortam ısısından dolayı görecekları zararın indirgenmesidir.

Yıkama esnasındaki yağ uzaklaştırma işlemi, lipolitik yıkım gerektirdiğinden sentetik kimyasal deterjanlar yerine enzim içeren deterjan üretimi lipazlar için büyük pazar oluşturmaktadır.

Çok yönlü mikrobiyal lipazlar hızla gelişmekte olan modern biyoteknolojide vazgeçilmez bir role sahip olmuşlardır. Biyolojik önemlerinin yanında lipazlar, yağların işlenmesi, deterjan ve yağ temizleyicilerin üretimi, gıdaların işlenmesi, ilaç ve kimyasal madde sentezleri, kağıt üretimi ve kozmetik ürünlerinin sentezi gibi pek çok alanda karşımıza çıkmaktadır.

Lipazlar aynı zamanda yağ atıkları ve poliüretanın parçalanmasını hızlandırmak için kullanılabilir. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar tablo 1.4'de verilmiştir.

Tablo 1.4 Mikrobiyal lipaz kaynakları ve uygulama alanları

Tip	Kaynak	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Fungal	<i>C.rugosa</i>	Organik Sentez	Amano,Biocatalysistis,Boehringer Mannheim,Fluka,Sigma,Genzyme
	<i>C.antarctica</i>	Organik Sentez	Boehringer Mannheim,Novo Nordisk
	<i>T.lanuginosus</i>	Deterjan katkıısı	Boehringer Mannheim,Novo Nordisk
Bakteriyel	<i>R.miehei</i>	Gıda işlenmesi	Novo Nordisk, Biocatalysistis,Amano
	<i>B.cepacia</i>	Organik Sentez	Boehringer Mannheim,Amona,Fluka
	<i>P.alcaligenes</i>	Deterjan katkıısı	Genencor
	<i>P.mendocina</i>	Deterjan katkıısı	Genencor
	<i>Ch.viscosum</i>	Organik Sentez	Asahi, Biocatalysistis

1.5.2. Uygulama Alanları

Günümüz endüstrisinde, lipazların spesifikliklerine bağlı olarak hem sulu hem de organik sistemlerde çeşitli reaksiyonlardaki gereksinimleri dolayısıyla birçok sektörde kullanım alanı bulunmaktadır (Tablo 1.5).

Tablo 1.5 Mikrobiyal lipazların endüstriyel alanlarda kullanım tablosu.

Sektör	Etki	Ürün
Ekmekçilik	Tatlandırma ve raf ömrü uzatımında	Unlu mamuller
Meşrubat	Aroma	Meşrubatlar
Kimyasal	Enantioseçicilik	Kiral yapılar ve kimyasallar
Temizleme	Sentez ve hidroliz	Kimyasallar, surfaktanlar gibi temizleme ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emulsifiyerler, nemlendiriciler
Süt	Sütteki yağın hidrolizi, peynir olgunlaştırılması, tereyağının modifikasyonu	Tatlandırıcı, peynir, tereyağı
Katı ve sıvı yağlar	Trans-esterifikasyon	Kokoa yağı, margarin
Gıda süsleme	Hidroliz	Yağ asitleri, gliserin, mono ve ve digliseridler
Dericilik	Kalite artırma	Mayonez, süsleme
Et ve balık	Hidroliz	Deri işleme
	Tat geliştirme ve yağ uzaklaştırılması	Et ve balık ürünleri
Kâğıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Sağlıklı gıda	Trans-esterifikasyon	Sağlıklı gıda ürünleri

1.5.2.1. Süt Ürünleri Endüstrisinde Lipazlar

Lipazlar, süt yağının hidrolizi için süt ürünleri endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüz uygulamaları, peynir aromasının artırılması, peynir olgunlaşmasının hızlandırılması, peynir benzeri ürünlerin imalatı ve kaymak hidrolizi işlemlerini içermektedir. Lipazların ilavesi öncelikle kısa zincirli (C4 ve C6) yağ asitlerinin uzaklaştırılmasıyla keskin ve hoş aromanın gelişmesine yol açar; orta zincirli (C12 ve C14) yağ asitlerinin uzaklaştırılması ise üründe sabunumsu bir tat oluşumuna yol açmaktadır. Katkı içeriğinde, serbest yağ asitleri, aseto asetat, β -keto asitleri, metil ketonları, aroma asitleri ve laktonlar gibi diğer aroma içeriklerinin sentezini başlatan basit kimyasal reaksiyonların yerini almaktadır.

Mucor miehei, *Aspergillus niger* ve *A. oryzae* gibi tamamen bir dizi mikrobiyal lipazlardan hazırlanmış preparatlar peynir imalatı endüstrisi için geliştirilmiştir. Bir çok kaliteli peynir sadece mikrobiyal lipazların veya çeşitli preparatlarının karışımlarının kullanıldığı proseslerde üretilmiştir (Chen ve ark., 2003). İtalyan peynirlerinde tadın oluşturulması, Çedar peynirinde olgunlaştırmanın hızlandırılması ve işlenmiş mavi peynirde tadın iyileştirilmesi işlemleri lipaz enziminin yardımlarıyla gerçekleştirilir.

Lipazla kısmen hidrolize edilmiş tereyağı, zenginleştirilmiş kaymaksı tada sahip olup, patlamış mısır, sıvı yağlar, katı yağlar, tahıllar, şekerlemeler, tüketime hazır gıdalar ve unlu mamuller gibi çeşitli gıda maddelerine eklenmektedir. Lipazla modifiye edilmiş kremalar, kahve beyazlatıcılarına, şekerlemelere, hamurlara, çorbalara ve unlu mamullere süt tadı katması amacı ile ilave edilmektedir. Süt yağlarının hidrolizi de lipaz tarafından kontrol edilmektedir.

Lipaz kullanımına yer veren süt sanayinde, lipaz konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve emülsiyon miktarının belirli değerlere ayarlanması spesifik yağ asitlerinin kontrollü salınmasına izin vermektedir. Alışlagelen kimyasal interesterifikasyon işlemiyle yapılması mümkün olmayan bu işlem, aynı zamanda kötü tat oluşturan spesifik yağ asitlerinin de en aza indirilmesini sağlar. Ayrıca farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar farklı özellikler ve seçicilik gösterdiğinden, istenilen özellikte ürün elde etmek için lipaz tipinin seçimi çok önem taşımaktadır.

Süt yağı besinsel yağların çok önemli bir kaynağı olmakla birlikte, yüksek oranlarda kolesterol ve koroner kalp hastalıklarının artmasının sebebi olarak gösterilen birincil doymuş yağ asidi kalıntıları ihtiva etmesi sebebiyle birkaç yıldır sağlık açısından zararlı olarak görülmektedir (Kirk ve ark., 2002).

İnsan diyetindeki doymuş asitlerden kaynaklanan sağlık sorunlarının başlıca sorumluları laurik, miristik ve palmitik asitlerdir. Bunların tam tersine oleik asit (C18:1), kandaki kolesterol miktarını azaltmaktadır. Bu nedenle, tada yaptığı etkilerin yanında lipaz, yağ asidi kombinasyonlarının değiştirilmesi ve bu yolla besinsel kalitesinin artırılması amacıyla süt yağının işlenmesinde kullanılmaktadır.

1.5.2.2. Gıda Sanayinde Kullanımı

Lipaz tarafından katalizlenmiş ester sentezinin piyasada tat verici esterlere giderek artan talebi karşılayabileceği düşünülmektedir. Bunlardan bir tanesi ananas ve muz gibi doğal meyve aromalarına sahip olan etil bütirat olup gıda sanayinde lezzet arttırıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Kirk ve ark., 2002). Kısa bir süre önce, lipazın gıdalarda bozulmaya yol açan mikroorganizmaların ve bazı gıda toksinlerinin hızlı tespitinde bir indeks olarak kullanılabilmesi keşfedilmiştir. Ayrıca bir başka çalışmada lipazların, gıdaların çürümesine yol açan psikotrof organizmaların üzerindeki etkisine ve bunların kontrolünde kullanılabilirliğine yer verilmiştir. (Kuo, 2002). Bir trigliseridin pozisyonu, zincir uzunluğu ve doymamışlık derecesi yalnızca fiziksel özelliklerini etkilemekle kalmayıp aynı zamanda besinsel ve duyuşsal değerlerini de etkilemektedir.

Palmitik ve stearik asitleri bünyesinde bulunduran kakao yağının erime noktasının yaklaşık 37 °C'dir. Bu sebeple ağza alınması ile birlikte erir ve bir serinlik duyusunun algılanmasına sebep olur. 1976'da Unilever adlı firma immobilize lipaz kullanmak suretiyle yaptığı bir dizi hidroliz ve sentez reaksiyonları sonucunda kakao-tereyağı yerine geçen bir madde üretmiş ve bunun patentini almıştır.

1.5.2.3. Deterjanlarda Lipazlar

Temizlik malzemelerinde enzimlerin kullanımı hala endüstriyel enzimler için tek büyük pazar olmayı sürdürmektedir. Dünya çapında, evlerde kullanılan deterjan formülasyonu için daha düşük çamaşır yıkama sıcaklıklarına yönelme, taleplerin oldukça artmasına sebep olmuştur. Yağları hidroliz etmelerinden dolayı lipazlar, endüstriyel temizlik alanlarında ve evde kullanılan deterjanlarda geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Deterjan lipazlarında özellikle dikkat edilen hususlar; ilk olarak yağ lekelerini oluşturan trigliseritlerdeki çeşitlilik nedeniyle substrata spesifik olması, ikinci olarak sert yıkama koşullarında (pH 10-11, 30-60 °C) enzim stabilitesinin devamlılığı ve son olarak da sürfektan ve proteazlar gibi katkı maddelerinin neden olduğu proteolitik degradasyondan etkilenmemesidir (Sharma ve ark., 2002).

Deterjan yapımında enzim kullanımı, endüstriyel enzimlere talebi arttırmıştır. Dünya çapında yıkama sıcaklıklarını indirmeye yönelik yapılan çalışmalarda, ev deterjan formülasyonları için daha gelişmiş ürünler, yeni araştırma programları, genetik manipulasyonlarla bir takım uygun preparasyonların tanımlanması sağlanmıştır. Deterjan enzimleri, toplam lipaz satışlarının yaklaşık % 32'sini oluşturmaktadır. Deterjanlarda kullanılması için lipazın, termostabil ve makinede yıkanmada alkali ortamda aktif kalmaya gereksinimi vardır. Yaklaşık 1000 ton lipaz, her yıl yaklaşık olarak 13 milyon ton deterjan üretiminde kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2002).

1.5.2.4. Oleokimyasal Endüstrisinde Lipazlar

Lipazların olekimyasal endüstrideki kullanımı, hidroliz, gliseroliz ve alkoliz reaksiyonları sırasında termal bozunmayı minimize ettiği ve ayrıca enerji tasarrufundan dolayı oldukça büyüktür. Japon Miyoshi Yağ şirketi, sabun üretiminde *Candida cylindracea* lipazının ticari bir şekilde kullanıldığını bildirmiştir. Yeni nesil ucuz ve sıcaklığa daha dayanıklı enzimlerin piyasaya sürülmesi ile lipaz kullanımının artacağı düşünülmektedir.

Oleokimyasal endüstrisinde bugünkü eğilim, organik çözücüler ve emülsifiyerlerin kullanımından uzaklaşma yönündedir. Hidroliz, alkoliz ve gliseroliz reaksiyonlarını içeren çeşitli reaksiyonlar, doğrudan karışık substratlar üzerinde bir dizi immobilize olmuş lipazların kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Bunun sonucu olarak da proses sürekli işlediği için yüksek verim elde edilmektedir.

Enzimatik hidrolizlerin önümüzdeki zaman içerisinde, fazla miktarda enerji ve pahalı ekipman olmaksızın, yağ ayrıştırma işlemlerinde başarılı bir şekilde kullanılacağı tahmin edilmektedir (Van Beilen ve Li, 2002). İlaç ve kimyasal üretiminde optikçe aktif ve saf polimerlerin (rasemik karışımları yerine) lipaz katalizli sentezidir. Lipaz katalizi ile üretilen monogliseritler, gıda ve kişisel bakım ürünlerinin (cilt, güneş kremleri, banyo yağları) üretiminde emülsifiye edici olarak görev alırlar.

1.5.2.5. Kâğıt Endüstrisi

Zift veya ağacın hidrofobik bileşeni (başlıca trigliseridler ve mumlar), kağıt hamuru ve kağıt sektöründe bir çok problem yaratmaktadır. Lipazlar, kağıt yapımında üretilen kağıt hamurundan bu ziftin uzaklaştırılmasında kullanılır. Japonya'da, Nippon Kağıt Endüstrisi, ağaç trigliseridlerinin % 90'ını hidrolize eden *Candida rugosa* fungal lipazını kullanarak zifti kontrol eden bir metot geliştirmiştir (Sharma ve ark., 2001).

1.5.2.6. Biyodizel Endüstrisi

Gelişen ülkelerde alkol, bitkisel yağ, biyokütle, biyogaz, sentetik yakıt, vb. gibi biyo orijinli yakıtlar gittikçe önem kazanmaktadır. Alternatif yakıtlar içerisinde biyodizel dizel yakıt için iyi bir alternatiftir. Biyodizelde sülfür bulunmaz. Biyodizelin egzoz gazlarındaki karbonmonoksit, yanmamış hidrokarbon ve partikül madde miktarı normal dizel yakıtınkinden daha düşüktür. Günümüzde biyodizel ticari olarak bir yağın bir alkol ile alkali katalizörlü interesterifikasyonu ile üretilmektedir (Kuo, 2002).

Biyodizelin lipaz katalizörlü reaksiyonlarla nazik reaksiyon şartlarında üretilmesi son zamanlarda ticari ilgiyi çekmiştir. Alkoliz, biyodizel üretilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Alkoliz bir alkol ve bir esterin esterifikasyon reaksiyonudur ve triaçilgliserollerle metanolün esterifikasyonundan metil esterler üretilmesinde kullanılmaktadır.

1.5.2.7. Enzim Endüstrisi

Enzimler, kimyasal reaksiyonları büyük bir spesifiklikle ve hızını artırarak katalizlerler. Bütün bu enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar, canlı organizmaların metabolizmasının temeli olup randımanlı ve ekonomik olarak biyokatalitik değişim uygulamalarında endüstri için muazzam fırsatlar sağlamaktadır (Van Beilen ve Li, 2002).

1960'lara kadar toplam enzim satışı her yıl sadece birkaç milyon dolarken; biyokimyasal üretim, fermentasyon prosesleri, iyileştirme metotları ve enzim sayısının artmasıyla enzim piyasası önemli bir şekilde gelişmiştir. Dünyada enzim üretimi, 12 büyük ve 400 küçük firma tarafından sağlanmaktadır (Sharma ve ark., 2001).

Endüstriyel öneme sahip mikrobiyal enzimler dünyada Genencor International, Amano Pharmaceuticals, Biocatalysts, Novo Nordisk vs (Gupta ve ark., 2004) gibi çeşitli firmalar tarafından üretilmektedir. Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı 1.4 milyar dolarken yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve %4-5 dolayında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından biridir. Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin %75'i gıda ve deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadır ve proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar en yaygın kullanılan enzim gruplarından biridir. Bu alanda her gün yeni potansiyel kaynaklar aranmakta ve gündeme gelmektedir (Kirk ve ark., 2002).

1.6. Tezin Amacı

Son yıllarda çeşitli endüstri kollarında özellikle lipaz enzimi kullanımı artmaktadır. Bu durum lipaz kaynaklarına yoğun bir ilgiye neden olmuştur. Özellikle bakteriler lipaz üreten canlılar arasında çok fazla öneme sahiptir. Bu çalışmada *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarından izole edilen lipaz enzimlerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada fındık zararlısı olan *Xylosandrus germanus* (Blandford) (Coleoptera: Curculionidae)'dan izole edilen *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşları kullanıldı. Bu bakteriler Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalındaki stoktan temin edildi. Bu suşlar fenotipik, biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler teknikler kullanılarak diğer bir çalışmada tanımlanmıştır (Yayınlanmadı).

2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeriler

Bakterilerin aktifleştirilmesinde nutrient broth kullanıldı. Lipaz/esteraz aktivitesinin incelenmesi için bazal medium olarak %1 tryptone, %0.5 maya ekstrakt, %0.5 NaCl, %0.01 CaCl₂.2H₂O içeren sırasıyla %1 Tween 20, 80 ve tributirin besiyeri hazırlandı (Smibert ve Krieg. 1981; Kugiyama ve ark. 1980). Lipaz aktivitesini belirlemek için 8 gr Nutrient broth (merck), 4 gr NaCl, 16 g Agar ve 1000 ml saf su ile hazırlanan besiyeri içine % 2.5 zeytinyağı ilave edilerek otoklav ile steril edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 10 ml 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilen Rhodamine B (sigma) boyası (1 mg/ml) ilave edildi (Haba ve ark., 2000; Litthauer ve ark., 2002).

2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Çalışmada hekzan, etil asetat, izopropanol, etanol, butanol, SDS, DDT, EDTA, gliserol, merkaptoetanol, N-N dietil formamid, Mg, Ni⁺², Ca⁺², Mn⁺², Hg⁺², Cd⁺², Cr⁺³, Fe⁺³ ve Na⁺ iyonlarının klorür tuzları kullanıldı. Tween 20, Tween 80, tributirin, rhodamin B, arabic gum, triton X-100, *p*-nitrofenil palmitat (pNPP) kimyasalları kullanıldı.

Xg1 ve Xg2 suşları çalkalamalı inkübatörde (STIK, PSE-T150) 30°C de büyütüldü. Hermlerle soğutmalı santrifüj cihazında santrifüj edildi. Shimadzu UV Mini 1240 markalı spektrofotometre cihazında lipaz aktivitesi ölçüldü. Termoblok

(WiseTherm HB-96D) cihazında farklı sıcaklık değerlerinin lipaz enzimine etkisi araştırıldı. Bakteri ekimleri steril ortam sağlamak amacıyla hood (ESCO)'da yapıldı.

2.4. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

Substrat solüsyonu Winkler ve Stuckmann (1979)'ın metodu modifiye edilerek kullanıldı.

1. Solüsyon

p-nitrofenil palmitat (*p*NPP, Sigma N2752) 30 mg, izopropanol 10 ml

2. Solüsyon

Arabic Gum 0.1 g, Triton X-100 2 ml, Tris-HCl (50 mM, pH 8.0) 90 ml

1. solüsyon ile 2. solüsyonun karıştırılarak iyice çalkalanır. Bu solüsyon *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarından elde edilen ekstraselüler lipaz aktivitelerinin kantitatif ölçümünde kullanıldı.

2.5. *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarının Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatların lipolitik aktivitelerinin kalitatif olarak belirlenmesi amacı ile Tribütirin, Tween 20 ve Tween 80 içeren besiyerlerine steril tahta çubukla ekim yapıldı ve 30°C'de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tribütirin agar besiyerinde kolonilerin etrafında şeffaf zon olması, tween 20 ve Tween 80 agar besiyerinde kolonilerin etrafında kristallerin oluşması lipolitik aktivite deneyleri için pozitif olarak değerlendirildi.

İzolatların lipaz aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile %2.5 zeytinyağı ilave edilerek hazırlanan Rhodamine B Agar Besiyeri kullanıldı. Bu besiyerine izolatlar çizgi ekim yapıldıktan sonra 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda besiyerindeki kırmızı renkli koloniler olması pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Ayrıca kolonilerin etrafında oluşan turuncu hâleler UV

transilluminatörde 365 nm’de gözlemlendi. Çalışmalarda negatif kontrol olarak *Escherichia coli* bakterisi kullanıldı.

2.6. Ekstrasellüler Lipaz Aktivitesinin Tespiti

İzolatların ekstrasellüler lipaz aktiviteleri, *p*-nitrofenolpalmitat’ın (*p*NPP, Sigma) substrat olarak kullanıldığı, spektrofotometrik yöntemle 410 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlendi. Bu ölçüm temel olarak *p*-nitrofenol esterlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda meydana gelen *p*-nitrofenol’ün 410 nm’de kolorimetrik olarak tespit edilmesine dayanmaktadır (Winkler ve Stuckmann, 1979). Lipaz aktivitesi ölçümünde hazırlanan substrat solüsyonundan 900 µl ve ekstrasellüler enzimden 100 µl alınarak spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Bir lipaz ünitesi (U), dakikada 1 µmol *p*-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarı olarak belirlendi. *p*-nitrofenol kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Bu hesaplamada önce ekstinksiyon katsayısı hesaplandı ve aktivite hesabında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$A \text{ (U/ml)} = \mu\text{Mol/min/ml} = \frac{\Delta A/\text{min} \cdot V_T \cdot 10^3}{\epsilon \cdot d \cdot V_E}$$

$\Delta A/\text{min}$ = Dakikadaki absorbans değişimi

V_t = Toplam reaksiyon hacmi

V_E = Örnek hacmi

ϵ = Ekstinksiyon katsayısı

d = Işık yolu (cm)

2.7. Ekstinksiyon Katsayısı Hesaplanması

Her proteinin kendi molar ekstinksiyon (absorbsiyon) katsayısı (ϵ) vardır. Bu işlemlerde molar konsantrasyon kullanılır ve ışığın geçtiği yol ise genel olarak 1 cm olduğu için molar ekstinksiyon katsayısı birimi ($M^{-1}cm^{-1}$) dir. Absorbans yardımıyla

konsantrasyonun belirlenmesi için molar absorbans katsayısının kesin değerinin bilinmesi gerekir. İşlemlerde kullanılan cihazlar da ayrı olduğu için literatürde verilen değerleri kullanmak yerine molar ekstinksiyon katsayısı (ϵ) değerinin hesaplanması daha uygundur (Gill ve Von Hippel, 1989). Molar ekstinksiyon katsayısının değeri absorbansı veren maddenin değişimi ve absorbansı arasındaki sabit oranın ifadesidir (Telefoncu; 1996).

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde standart olarak *p*-nitrofenol kullanıldı. Standartı hazırlamak için 0,5 mM *p*-nitrofenolden seri çözeltiler hazırlandı ve 410 nm'deki absorbans değerleri belirlendi ve grafik çizildi. Bu grafiğe göre ekstinksiyon katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Eğim} = \epsilon \cdot d = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

ϵ : Molar ekstinksiyon katsayısı ($M^{-1}cm^{-1}$)

d: Işık yolu (cm)

y_1 : Absorbansın ilk değeri

y_2 : Absorbansın son değeri

x_1 : *p*-nitrofenol konsantrasyonunun ilk değeri

x_2 : *p*-nitrofenol konsantrasyonunun son değeri

2.8. *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarının Gelişimi ve Lipaz Üretimi

Suşların 620 nm'de 0.5 OD absorbans verecek şekilde 30°C'de nutrient broth'da üretildi. Bu kültürden 250 ml'lik erlenide 50 ml bazal medium bulunan besiyerine %2 oranında inoküle edildi ve 150 rpm'de 30°C'deki çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Kültürün hücre yoğunluğu ve ekstraselüler lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi (Rajmohan ve ark., 2002). Buna göre 0. saatten başlayarak her 24 saatte bir 620 nm'de hücre yoğunluğu ölçüldü. Kültürün ekstraselüler lipaz aktivitesi ise *p*-NPP'in substrat olarak kullanılmasıyla 410 nm'de ölçüldü.

2.9. Enzim Üretimi

Acinetobacter psychrotolerans Xg1 ve Xg2 suşlarının aktiveleştirilmesi ve ön kültür çalışması için nutrient broth besiyeri kullanıldı. Kültürlerin gelişme durumu spektrofotometrik olarak ölçüldü. 620 nm'de 0.5 OD absorbans verecek şekilde 30 °C'de Nutrient Broth'da üretilen ön kültürler 500 ml'lik erlenide 100 ml Bazal Medium'a % 2 oranında inoküle edildi ve 150 rpm'de 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde üretildi. İnkübasyondan sonra kültürler 10.000 rpm'de 10 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırıldı. Süpernatant ekstraselüler enzim kaynağı olarak kullanıldı ve lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi (Öztürk; 2006). Elde edilen bu süpernatant ham enzim olarak değerlendirildi. Ham enzimde pH, sıcaklık, organik çözücü ve metal iyonlarının etkisi için kullanıldı

2.10. Lipazın Karakterizasyonu

Acinetobacter psychrotolerans Xg1 ve Xg2 suşlarından elde edilen lipaz enzimi ile ilgili özellikleri belirlenerek karakterize edildi. Bu amaçla, bu enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değeri belirlenerek, farklı organik çözücüler, ağır metaller ve çeşitli ajanların varlığında aktivite belirlenmesi amacıyla aktivite testleri yapıldı (Boran, 2008).

2.10.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

Acinetobacter psychrotolerans Xg1 ve Xg2 suşlarından elde edilen lipazın en yüksek aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek üzere yapılan çalışmada, pH'ları 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 olan 50 mM'lık farklı tamponlar kullanıldı. pH 4-5 aralığında sodyum asetat tamponu, pH 6-7 aralığında potasyum fosfat tamponu, pH 8 Tris-HCl tamponu ve pH 9-10 aralığında da glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Çalışmada farklı pH değerlerindeki tamponlar kullanılarak substrat çözeltileri hazırlanacaktır. Substrat solüsyonundan 900 µl alınarak 100 µl enzim ile karıştırılacak ve 30 °C'de 15 dakika inkübatörde inkübe edilip sonra +4°C'de 10 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede lipaz aktiviteleri belirlendi.

2.10.2. Optimum Sıcaklığın ve Stabilitenin Belirlenmesi

Acinetobacter psychrotolerans Xg1 ve Xg2 suşlarından elde edilen lipazın en yüksek aktivite gösterdiği reaksiyon sıcaklığını belirlemek amacıyla; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 , 80 ve 90°C sıcaklıklarda 15 dakika bekletilerek lipaz aktiviteleri belirlendi. Ayrıca hangi sıcaklıklarda stabil oldukları incelendi. Bunun için aktivitenin görüldüğü en yüksek sıcaklıklarda enzimler 1 saat inkübe edildi. Çalışmada lipazın en iyi aktivite gösterdiği tampon kullanılarak hazırlanan substrat solüsyonu kullanıldı. Lipazın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık, bundan sonra yapılan tüm aktivite testlerinde kullanıldı (Boran, 2008).

2.10.3. Organik Çözücülerin Lipaz Üzerine Etkileri

Acinetobacter psychrotolerans Xg1 ve Xg2 suşlarından elde edilen lipazın aktivitesi üzerine organik çözücülerden hekzan, etil asetat, izopropanol, etanol, asetonitril, aseton, butanol-1-ol ve N,N-dietilformamid etkisi araştırıldı. 300 µl enzim 100 µl organik çözücü ile karıştırılarak ve 30°C sıcaklıktaki çalkalayıcıda 1 ve 2 saat ön inkübasyona tabi tutuldu. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında organik çözücü içermeyen enzim tampon (3:1) karışımı kullanıldı. Ön inkübasyon sonucunda 1. ve 2. saatlerde 100 µl enzim alınacak ve en iyi aktivite gösterdiği tampon kullanılarak hazırlanan substrat solüsyonundan 900 µl alınarak karıştırıldı. 30 °C de 15 dakika inkübe edilerek, 4°C 10 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrik olarak aktivitesi belirlendi (Boran, 2008).

2.10.4. Metallerin Lipaz Üzerine Etkisi

Metal iyonlarının *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarından elde edilen lipazın aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile MnCl₂, FeCl₃, CdCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, CuCl₂ ve NiCl₂, NH₄Cl, CaCl₂, MgCl₂ , HgCl, kullanıldı. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında ağır metal içermeyen örnekler kullanıldı. Metal iyonları derişimleri 5 mM ve 10 mM metal iyonu olacak şekilde enzimle karıştırıldı ve 30 °C'de 1 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrası 100 µl enzim alındı ve en iyi aktivite gösterdiği tampon kullanılarak hazırlanan

substrat solüsyonundan 900 µl alınarak karıştırıldı. 30°C de 15 dakika inkübe edildi, 4°C 10 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrik olarak aktivitesi belirlendi (Boran, 2008).

2.10.5. Çeşitli Ajanların Lipaz Üzerine Etkisi

Acinetobacter psychrotolerans Xg1 ve Xg2 suşlarından elde edilen lipazın aktivitesi üzerine çeşitli ajanların etkisinin araştırılması amacı farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde SDS, Tween 80, Tween 20, Tribütirin, gliserol, DTT, EDTA, Triton X-100 ve merkaptoethanol ile enzim karıştırıldı ve 30°C sıcaklıkta 1 saat ön inkübasyona tabi tutuldu. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında herhangi bir ajan içermeyen örnekler kullanıldı. Ön inkübasyon sonunda en iyi aktivite gösterdiği tampon kullanılarak, aktivitesi belirlendi (Boran, 2008).

2.11. Enzimlerin Ultrafiltrasyonu ve Jel Kromatografisi

Nutrient broth besiyerinde *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının üremesi ile elde edilen kültürler 620 nm'de 0.5 OD absorbans verecek şekilde geliştirildikten sonra kültürlerden 500 ml'lik erlende 100 ml bazal medium içine % 2 oranında inoküle edildi ve 30 °C'de 150 rpm'de çalkalayıcıda sırasıyla 24 ile 48 saat üretildi. İnkübasyondan sonra kültürler 10.000 rpm'de 10 dk +4°C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırıldı. Süpernatant filtre edildi ve filtre edilen örnekler ultrafiltrasyon ile konsantre edildi. Ultrafiltrasyon işleri için özel hazırlanan 30 kDa büyüklüğündeki moleküllerin tutabilme potansiyeline sahip membran içerikli falkon tüpler kullanıldı. 10000 g' de 10 dk. tüm örnekler tükeninceye kadar santrifüj edildi. Falkon içerisinde var olan konsantre örnek daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C de muhafaza edildi.

Jel filtrasyon kromatografisi çalışmasında kolon dolgu maddesi olarak Sephadex G-50 kullanıldı. Dolgu maddeleri 10 ml için 1 g tartılarak dH₂O içerisinde 1 saat kaynar su banyosunda kaynatıldı ve sonrasında soğutuldu. 35 cm x 2 cm boyutlarındaki kolona karıştırılarak döküldü. Konsantre ultrafiltrasyon örneklerinden 3' er ml kolona yüklendi ve dH₂O kullanılarak akış başlatıldı. Kolon akış hızı 30 ml / saat olacak şekilde ayarlandı. Kolondan çıkan örnekler mikrosantrifüj tüplerine 1,5

ml hacminde toplandı. Toplanan fraksiyonların aktiviteleri ölçüldü. Aktivite sonuçlarına göre %10' luk SDS- PAGE çalışması yapıldı. Bunun için daha önce hazırlanmış tüm örnekler yükleme boyası ile muamele edildikten sonra 5 dk. kaynayan su banyosunda bekletildi ve jele yüklendi. Yürütme boyası olarak aşağıdaki maddeler kullanılmıştır:

Tris 6,8 1 M	→	150 µl
Gliserol %87	→	250 µl
Bromofenol blue	→	100 µl
dH ₂ O	→	500 µl

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 Metanol, %10 Asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı. Daha sonra yıkama I (%50 Metanol, %10 Asetik asit) çözeltisinde 1 saat bekletildikten sonra yıkama II (%5 Metanol, %7 Asetik asit) çözeltisine alındı. Daha sonra fotoğrafı çekildi

2.12. Enzimlerin SDS-PAGE Analizi

Protein ve peptitleri moleküler ağırlıklarına göre ayırma ilkesine dayanan, sodyum dodesil sülfat/poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) enzim çalışmalarında en çok kullanılan elektroforetik yöntemdir (Copeland, 2000). Çalışmada ultrafiltrasyondan elde edilen örnekler kullanıldı. SDS-PAGE tekniği Laemmli'ye göre yapıldı (Laemmli, 1970).

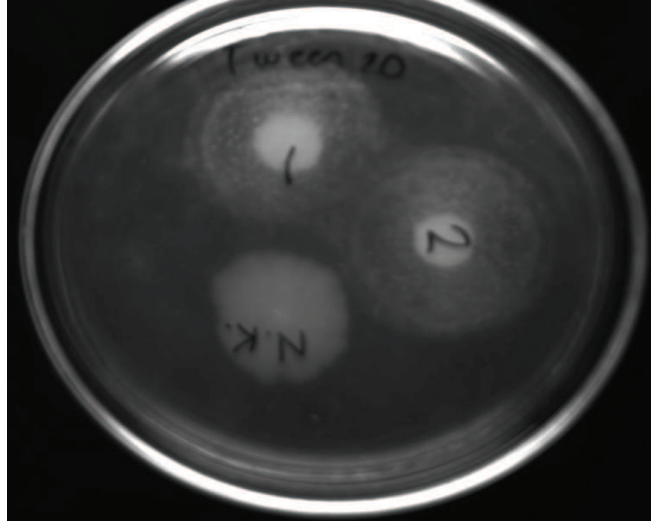
2.13. Aktivite Deneyi

Native jel hazırlandı. Örnekler yürütüldü. Sonra jel alındı. Yıkama solüsyonları 1 (%1'lik Triton-X-100 50 mM Tris tamponu) 'de 10 dk bekletildi. Daha sonra yıkama solüsyonları 2 (%0,1'lik Triton-X-100 50 mM Tris tamponu) 'de 10 dk. bekletildi. 10 dakika da steril saf suda bekletildi. En sonunda jelin üzerine hazırlanan Tween 20 besiyeri (%1 Tween 20, 20 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, %0,5 gum Arabic , %1,5 Agar, dH₂O) ilave edildi. Bir gece 30°C'de bekletildi.

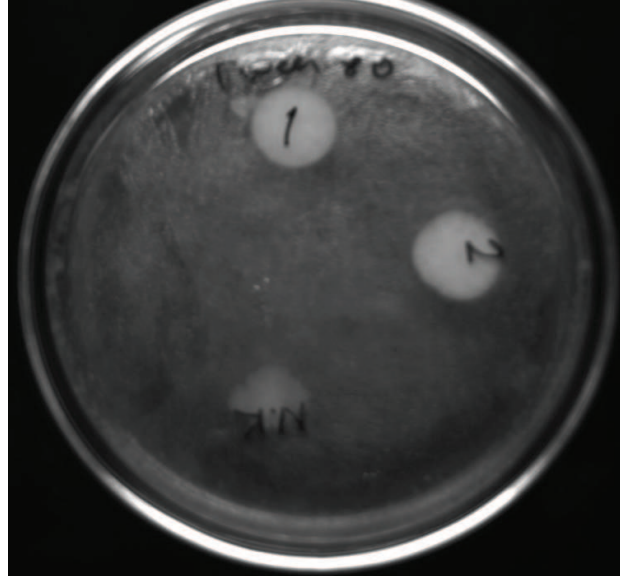
3. BULGULAR

3.1. *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarında Lipolitik Aktivitenin Belirlenmesi

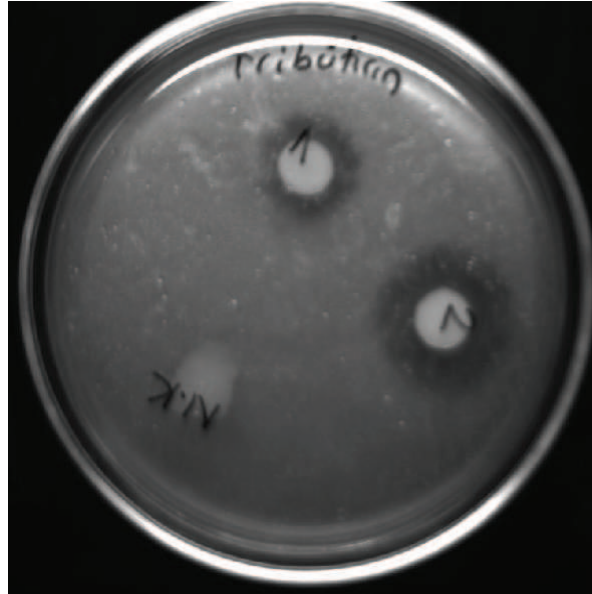
Acinetobacter psychrotolerans Xg1 ve Xg2 suşlarının lipolitik aktiviteleri kalitatif olarak Tween 20, Tween 80 ve Tribütrin Agar besiyerlerinde 30 °C’de 4 gün inkübe edilerek belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda suşlara ait kolonilerinin etrafında kristal/şeffaf zon oluştuğu gözlenmiş ve lipolitik aktiviteleri pozitif olarak değerlendirilmiştir. Şekil 3.1 ve 3.2’de izolatlara ait Tween 20, Tween 80 agar besiyerlerinde kristal varlığı belirlenmiştir. Şekil 3.3’de izolatların Tribütirin Agar besiyerinde lipolitik aktivitesinden dolayı oluşturduğu zon görülmektedir. Rhodamine B agar besiyerinde lipaz aktivite varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3.4). Çalışma sonucunda kalitatif sonuçları incelendiğinde en iyi aktivite Tween 20 besiyeri olarak belirlendi ve çalışmalarda Tween 20 besiyerisi kullanıldı.



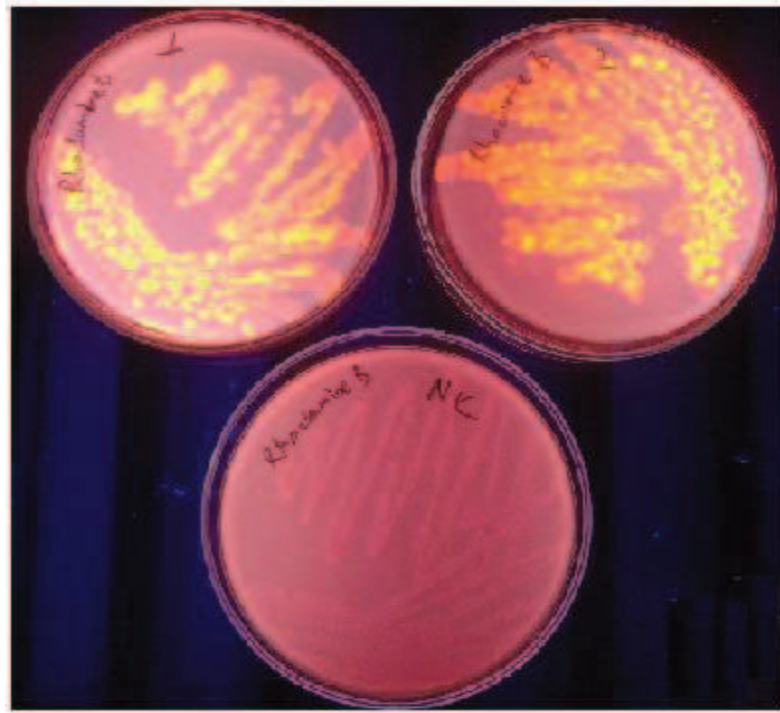
Şekil 3.1 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının Tween 20 besiyerinde oluşturdukları kristaller. 1: Xg1 suşu; 2: Xg2 suşu; N.K.: Negatif kontrol *E. coli*.



Şekil 3.2 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının Tween 80 besiyerinde oluşturdukları kristaller. 1: Xg1 suşu; 2: Xg2 suşu; N.K.: Negatif kontrol *E. coli*.



Şekil 3.3 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının Tributirin Agar besiyerinde oluşturduğu zonlar. 1: Xg1 suşu; 2: Xg2 suşu; N.K.: Negatif kontrol *E. coli*.

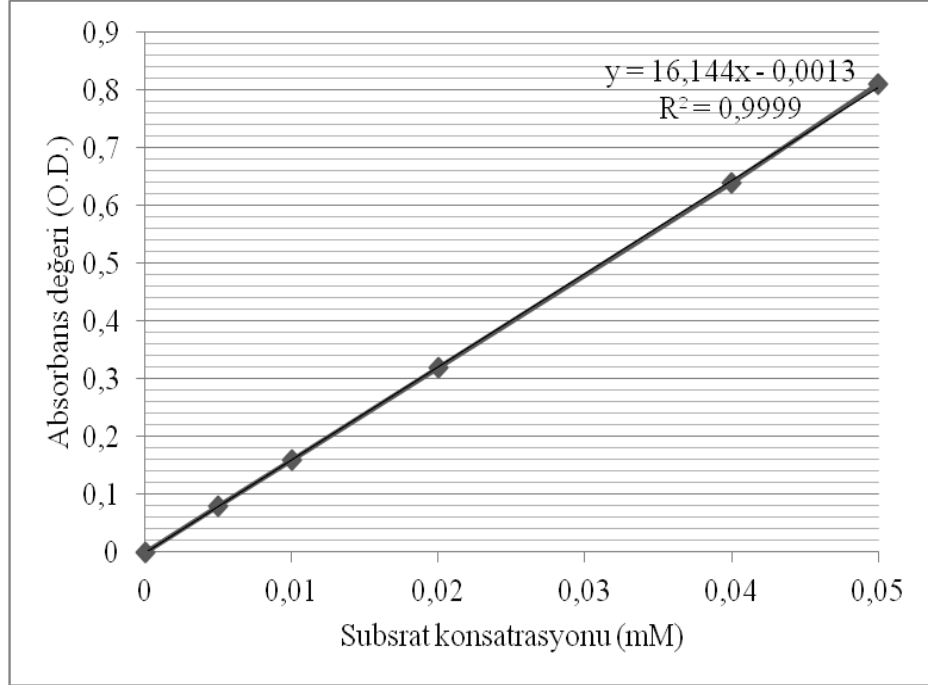


Şekil 3.4 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının Rhodamine B agar besiyerinde oluşturduğu pembe renkli koloniler ve UV ışığı altındaki görüntü. 1: Xg1 suşu; 2: Xg2 suşu; N.K.: Negatif kontrol *E. coli*.

3.2. Ekstrasellüler Lipaz Aktivitesinin Tespiti

Suşların ekstrasellüler lipaz aktivitesini belirlemek için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Deneylede *p*-nitrofenolpalmitat substratı kullanılarak dalga boyu 410 nm’de ölçüm yapılarak lipaz aktivitesi belirlenmiştir.

Konsantrasyonu bilinen *p*NPPin substrat olarak kullanılmasıyla yapılan spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre elde edilen standart grafiği şekil 3.5’de görülmektedir.



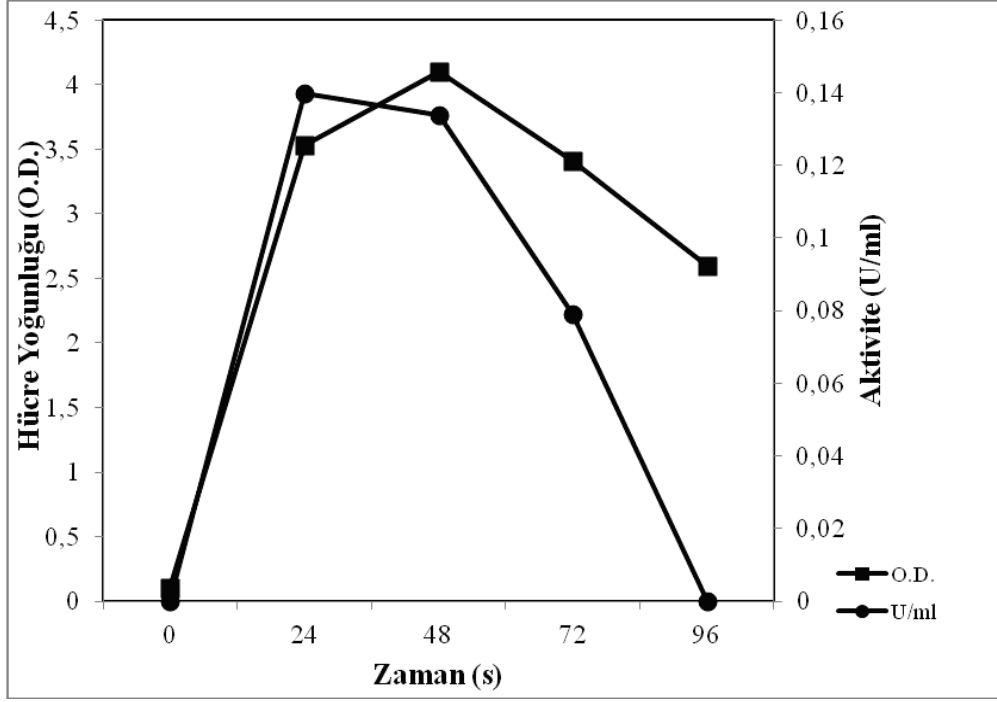
Şekil 3.5 *pNPP*'ın substrat olarak kullanıldığı lipaz aktivitesi standart grafiği.

3.3. Ekstinksiyon Katsayı Hesabı

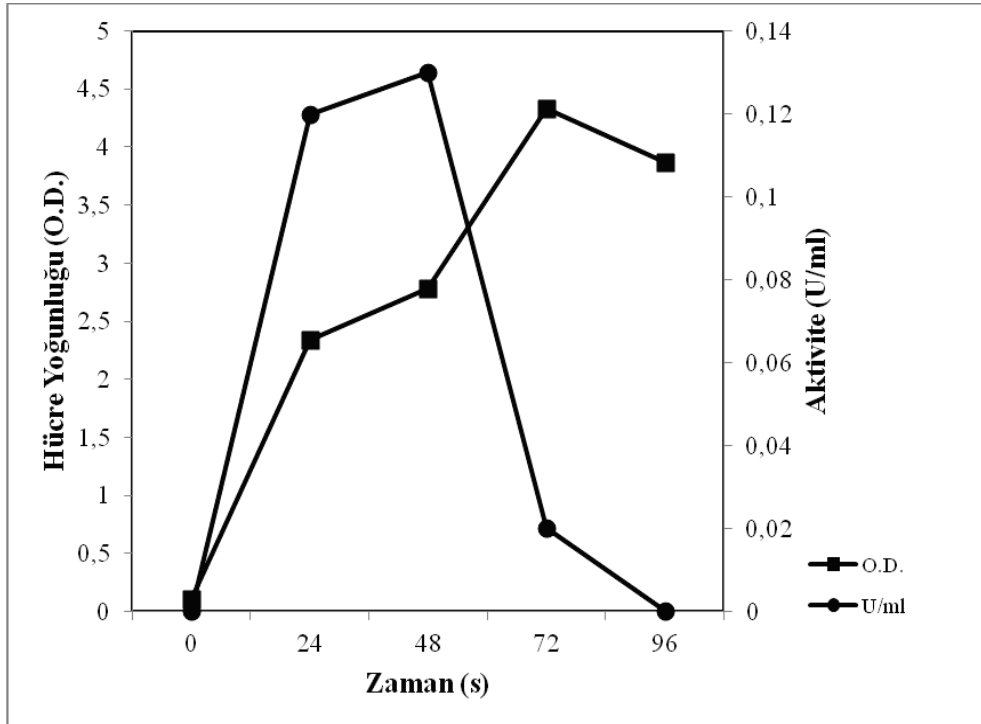
Enzim aktivitesinin belirlenmesinde standart olarak *p*-nitrofenol kullanıldı. Standartı hazırlamak için 0,5 mM *p*-nitrofenolden seri çözeltiler hazırlandı ve 410 nm'deki absorbans değerleri belirlendi ve grafik çizildi (Şekil 3.5). Bu grafiğe göre sonuçlar formülde yerine konularak ekstinksiyon katsayısı $16.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirlendi.

3.4. İzolatların Hücre Gelişimi ve Lipaz Aktivitesi

Acinetobacter psychrotolerans Xg1 ve Xg2 suşlarının bazal besiyerinde 24 saatlik aralıklarla alınan numunelerin hücre büyümesi 620 nm lipaz aktivitesi 410 nm dalga boylarında ölçümleri yapıldı (Şekil 3.6 ve 3.7). Elde edilen sonuçlara göre Xg1 suşunun 24 saatte Xg2 suşunun 48 saatte en yüksek lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi.



Şekil 3.6 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşunun basal besiyerindeki hücre yoğunluğu ve ekstrasellüler lipaz aktivitesi.



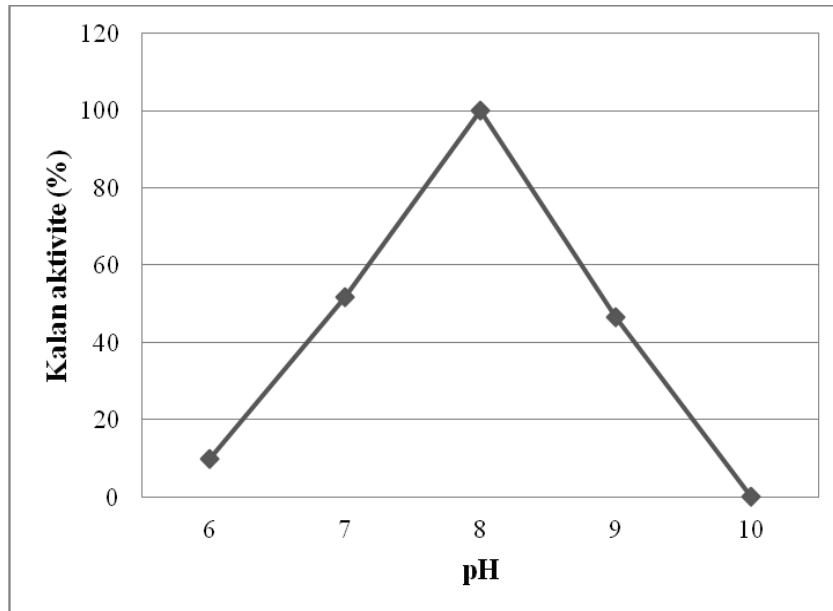
Şekil 3.7 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg2 suşunun basal besiyerindeki hücre yoğunluğu ve ekstrasellüler lipaz aktivitesi.

3.5. Ekstraselüller Lipaz Enziminin Karakterizasyonu

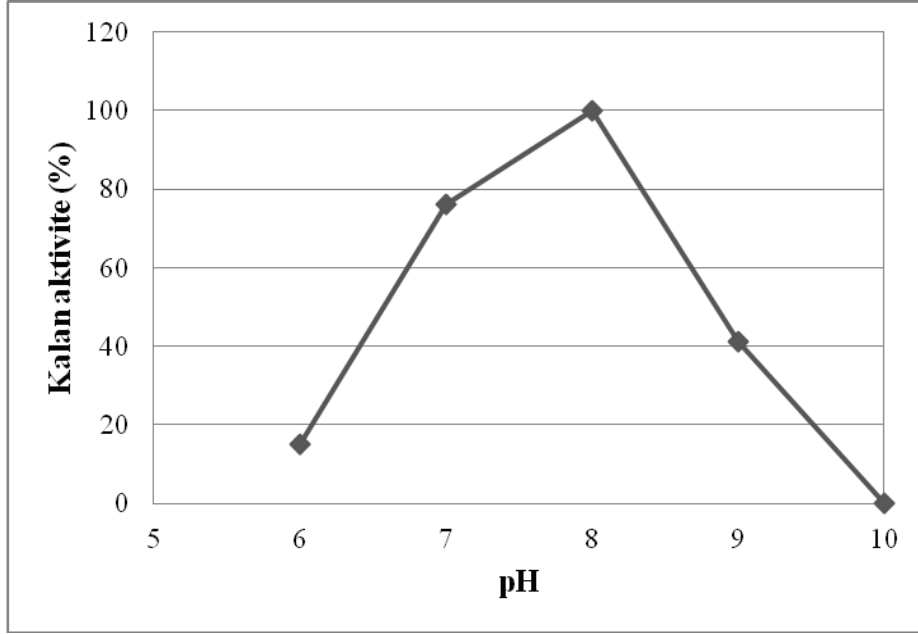
Xg1 ve Xg2 suşları 500 ml'lik erlende 100 ml'lik Tween 20 besiyerinde sırasıyla 24 ve 48 saat üretildikten sonra 10.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham enzim olarak adlandırıldı ve kullanılmaya kadar +4°C'de bekletildi. Ham enzim kullanılarak optimum ısı, optimum pH, farklı çözücülerin etkisi, farklı ajanların etkisi ve farklı minerallerin etkisi incelendi.

3.5.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

Ekstraselüller lipaz enziminin optimum pH'ını belirlemek için farklı tamponlar kullanılmıştır. Xg1 ve Xg2 suşlarına ait pH 6-10 aralığında ölçülen aktivite değerleri Şekil 3.7 ve 3.8'de verilmiştir. Çalışmada kullanılan 3, 4, 5 pH değerlerinde aktivite tamamen kaybolmuştur. Her iki suş için en yüksek lipaz aktivitesinin pH 8 olduğu belirlendi. pH 8'de ki lipaz aktivite değeri % 100 kabul edilmiştir ve diğer pH değerlerindeki aktiviteler buna oranlanmıştır. Xg1 ve Xg2 suşlarına ait enzimler pH 7'de sırasıyla %51, %76, ve pH 9'da ise sırasıyla %46 ve %41 kalan aktivitelere sahiptir.



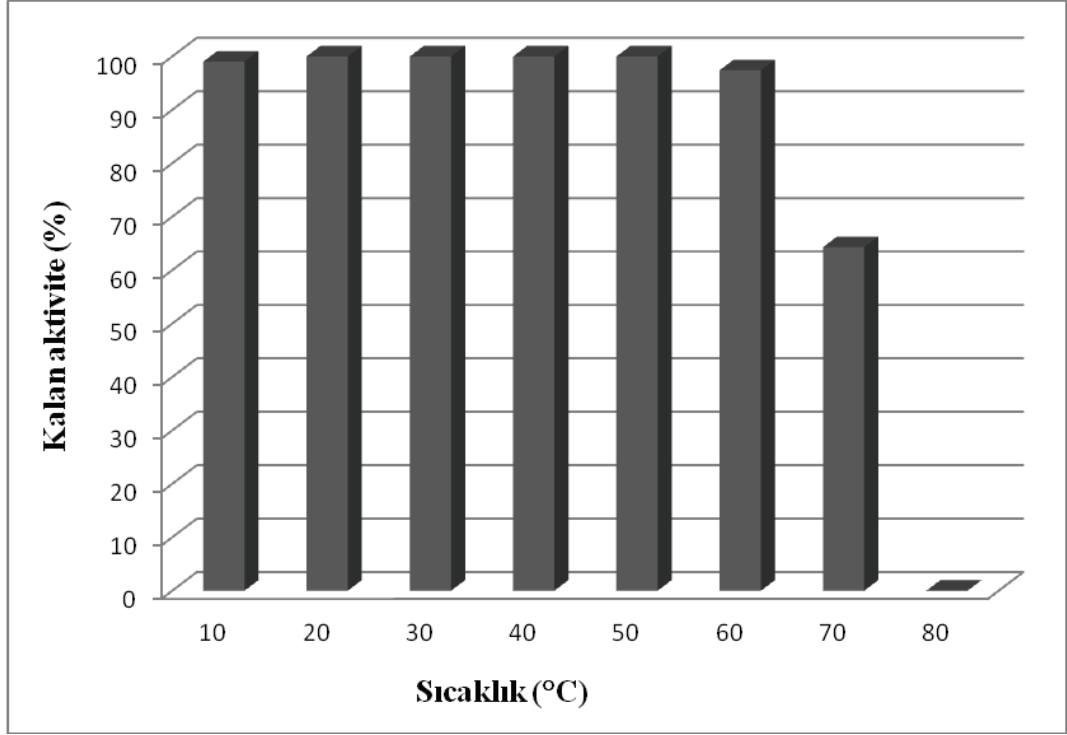
Şekil 3.8 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşuna ait lipaz enziminin farklı pH değerlerindeki aktivitesi.



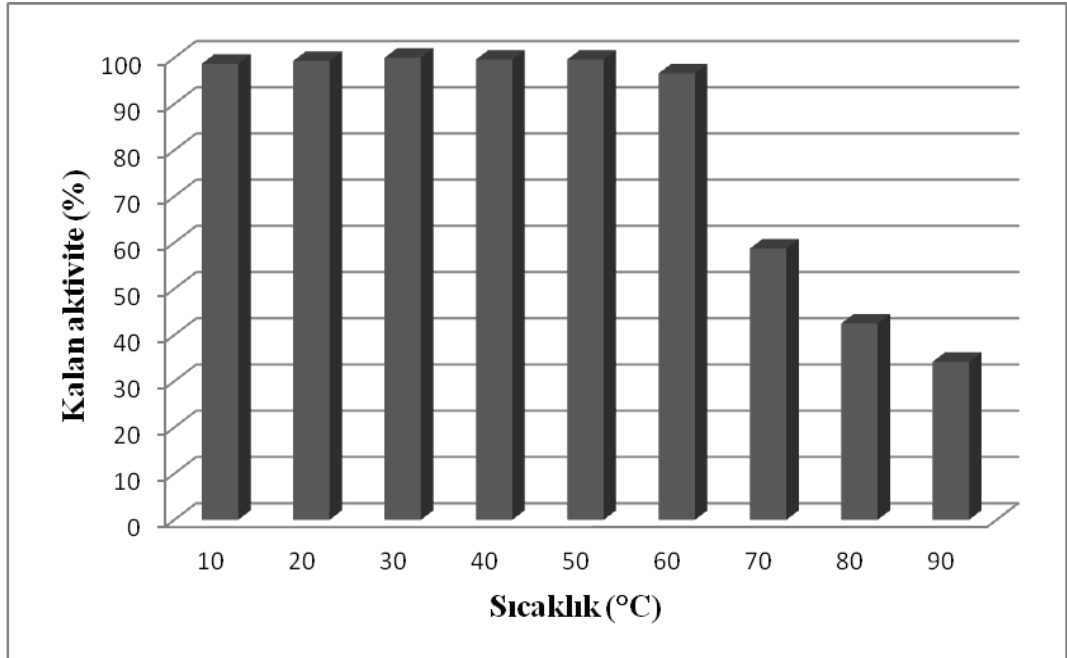
Şekil 3.9 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg2 suşuna ait lipaz enziminin farklı pH değerlerindeki aktivitesi.

3.5.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Xg1 ve Xg2 suşlarına ait lipazların optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacı ile 10–90°C aralığında 15 dakika bekletilerek enzim aktiviteleri incelenmiş, sıcaklığın Xg1 ve Xg2 suşlarına ait lipaz enziminin aktivitesine etkisi şekil 3.10 ve 3.11’de verilmiştir. 30°C’deki aktivite değeri % 100 kabul edilmiştir ve diğer sıcaklık değerlerindeki aktiviteler buna oranlanarak belirlenmiştir. Bu basamaktan sonra yapılan bütün karakterizasyon çalışmaları 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

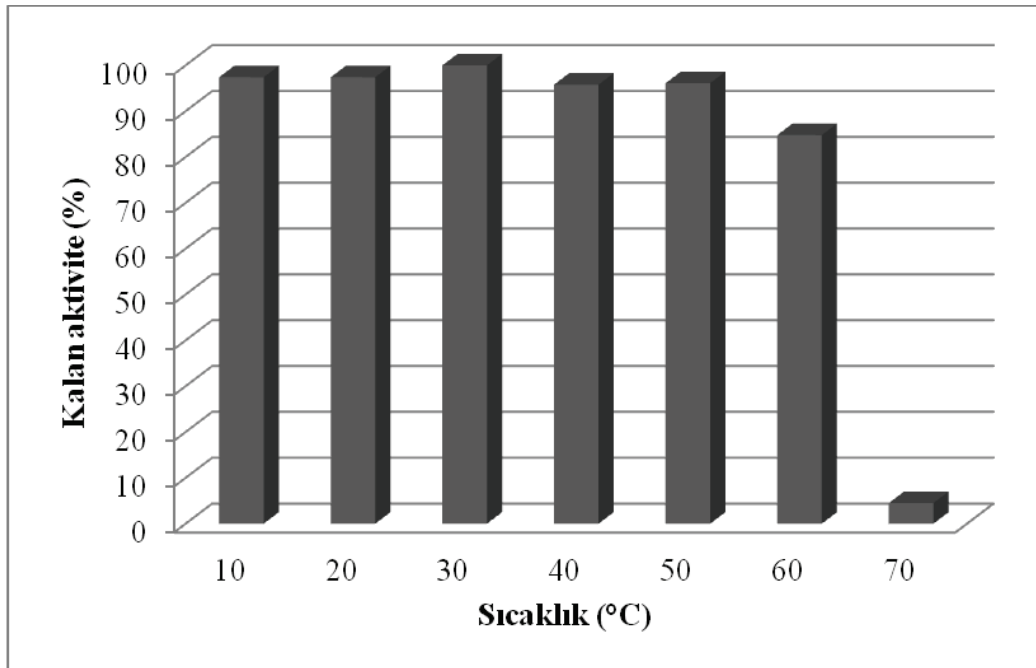


Şekil 3.10 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki aktivitesi.

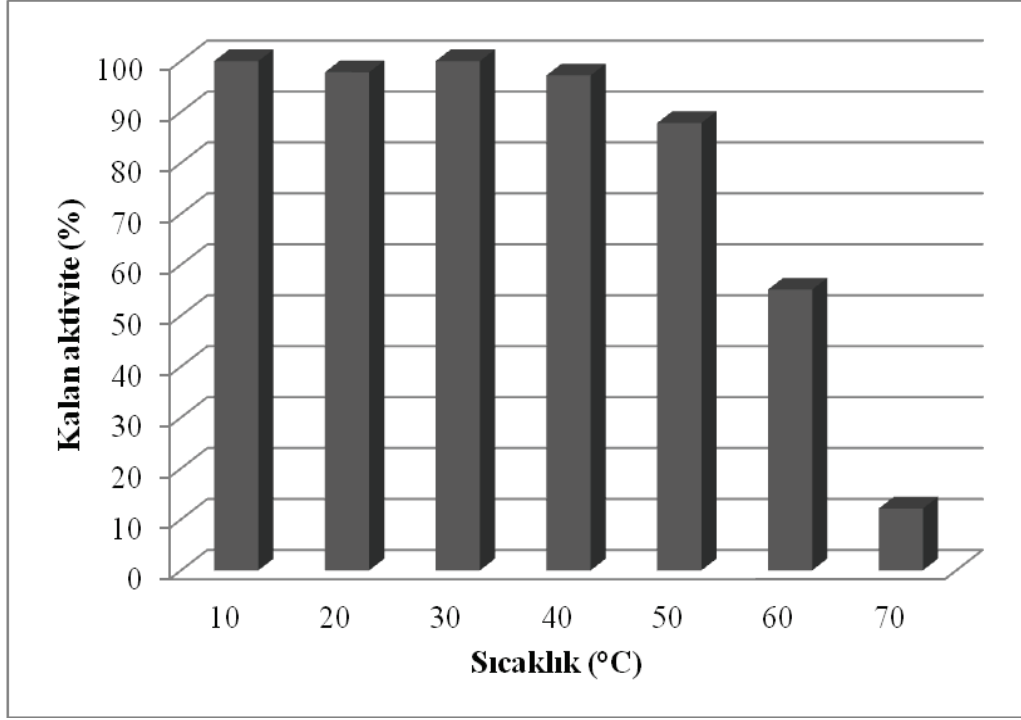


Şekil 3.11 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg2 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki aktivitesi.

Ayrıca hangi sıcaklıklarda stabil oldukları incelenmiştir. Bunun için aktivitenin görüldüğü en yüksek farklı sıcaklıklarda enzimler 1 saat inkübe edildikten sonra aktivite çalışmaları yapılmıştır (Şekil 3.12 ve 3.13). Her iki suşa ait lipazların optimum reaksiyon sıcaklığı 30°C olarak tespit edilmiştir. Xg1 ve Xg2 suşlarına ait lipaz 10-60 °C aralığında aktif olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.12 ve 3.13). 60°C’de sıcaklıkta; Xg1 suşuna ait lipaz %80 üzerinde aktivite gösterirken Xg2 suşuna ait lipaz %55 aktivite göstermiştir.



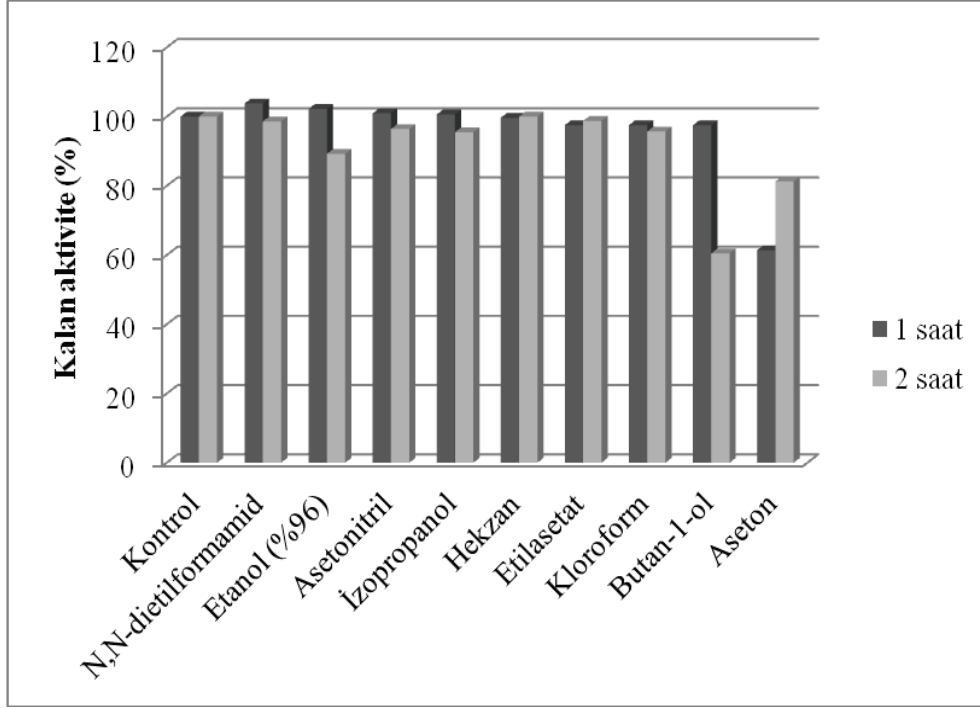
Şekil 3.12 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki kararlılığın aktivitesi.



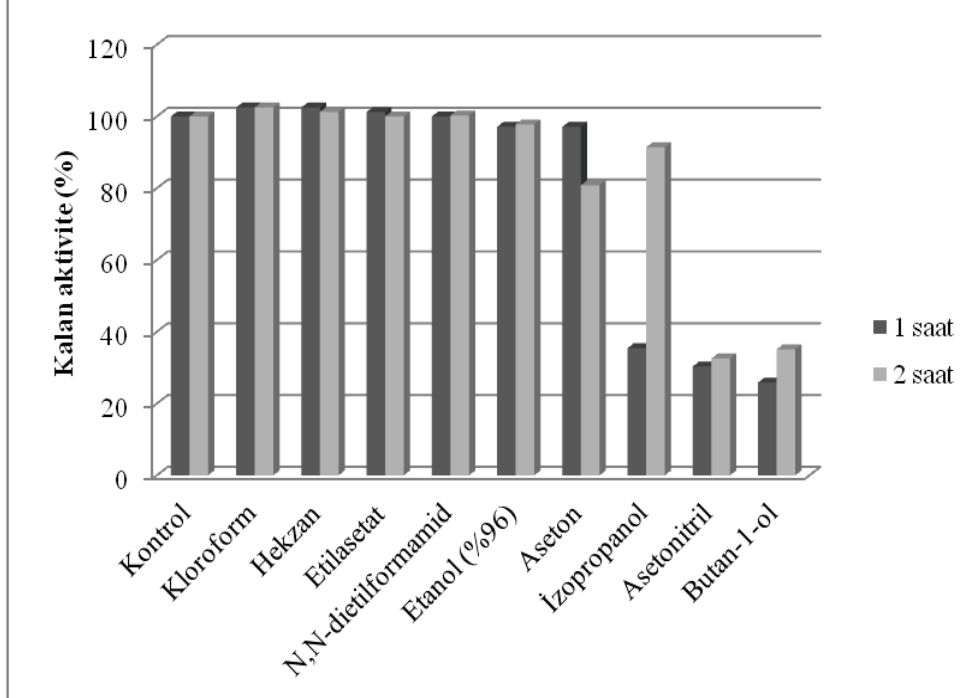
Şekil 3.13 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg2 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki kararlılığın aktivitesi.

3.5.3. Organik Çözücülerin *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarının Lipazları Üzerine Etkisi

Xg1 ve Xg2 suşlarına ait lipaz enzimleri üzerine hekzan, etil asetat, izopropanol, etanol, asetonitril, aseton, butan-1-ol, N,N-diethylformamid ve kloroform etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 300 µl enzim 100 µl organik çözücü ile karıştırılmış ve 30 °C sıcaklıktaki çalkalayıcı da 1 ve 2 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında organik çözücü içermeyen enzim tampon (3:1) karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda enzim aktivite ölçümleri spektrofotometrede ölçülerek belirlenmiş ve çıkan değerlerden kontrol % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanmıştır. Suşlara ait lipaz enzimi üzerine çeşitli organik çözücülerin etkisi Şekil 3.14 ve 3.15’de verilmiştir.



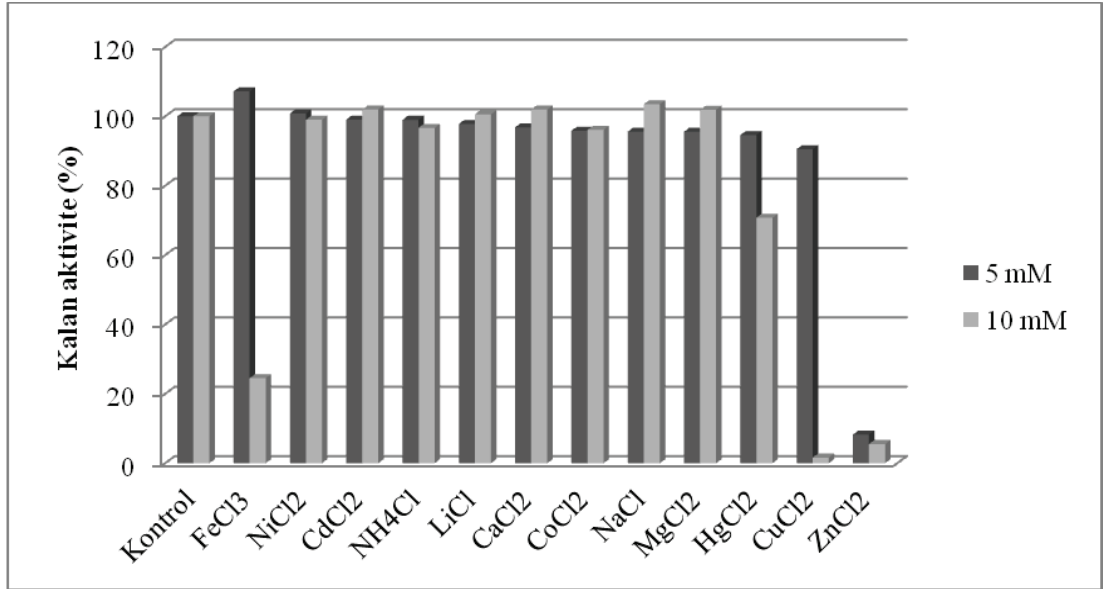
Şekil 3.14 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı organik çözücülerin etkisi.



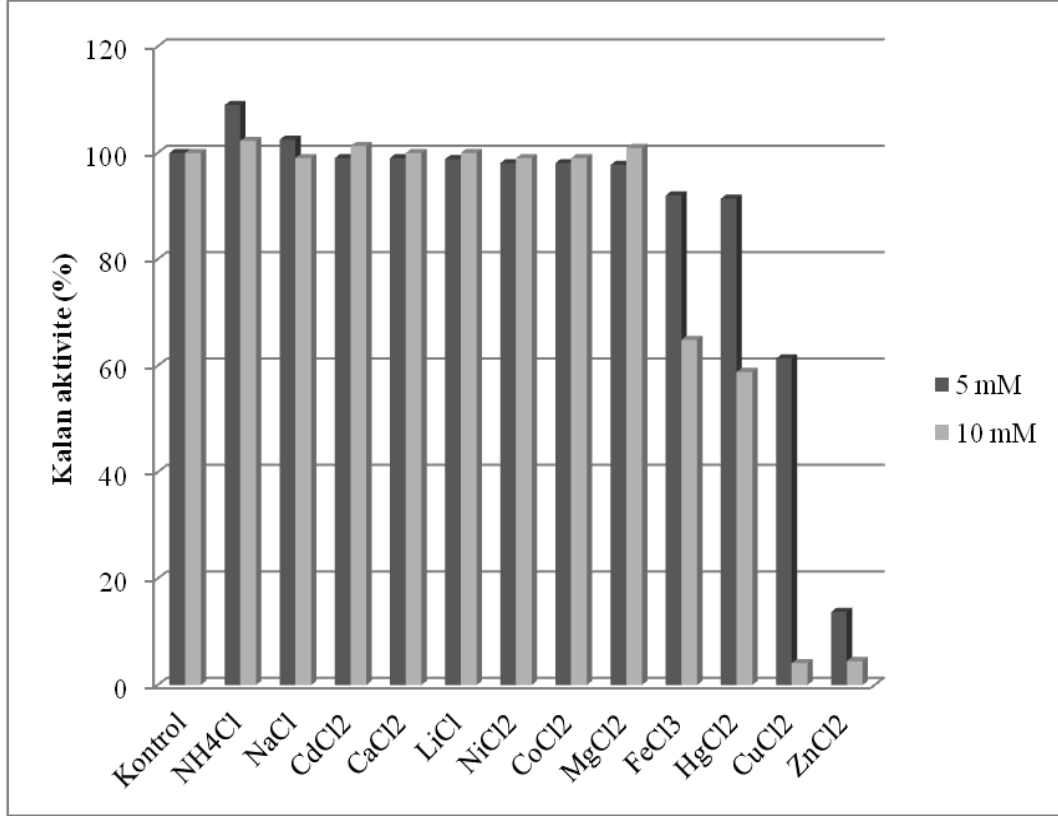
Şekil 3.15 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg2 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı organik çözücülerin etkisi.

3.5.4. Metallerin *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarının Lipazları Üzerine Etkisi

Xg1 ve Xg2 suşlarına ait lipazın enzimatik aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi amacı ile FeCl₃, CdCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, CuCl₂, NH₄Cl, LiCl, CaCl₂, NaCl, MgCl₂, HgCl₂ ve NiCl₂ kullanılmıştır. Aktivitenin belirlenmesi için ham enzim ile son konsantrasyon 5 mM ve 10 mM olacak şekilde metal iyonları ilave edildi. 1 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivite ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar metal iyonu içermeyen kontrole göre değerlendirilmiştir. Kontrol %100 kabul edilip diğer sonuçlar kıyaslanmıştır. Şekil 3.16 ve 3.17’de metal iyonlarının lipaz enzimleri üzerine etkisi gösterilmiştir.



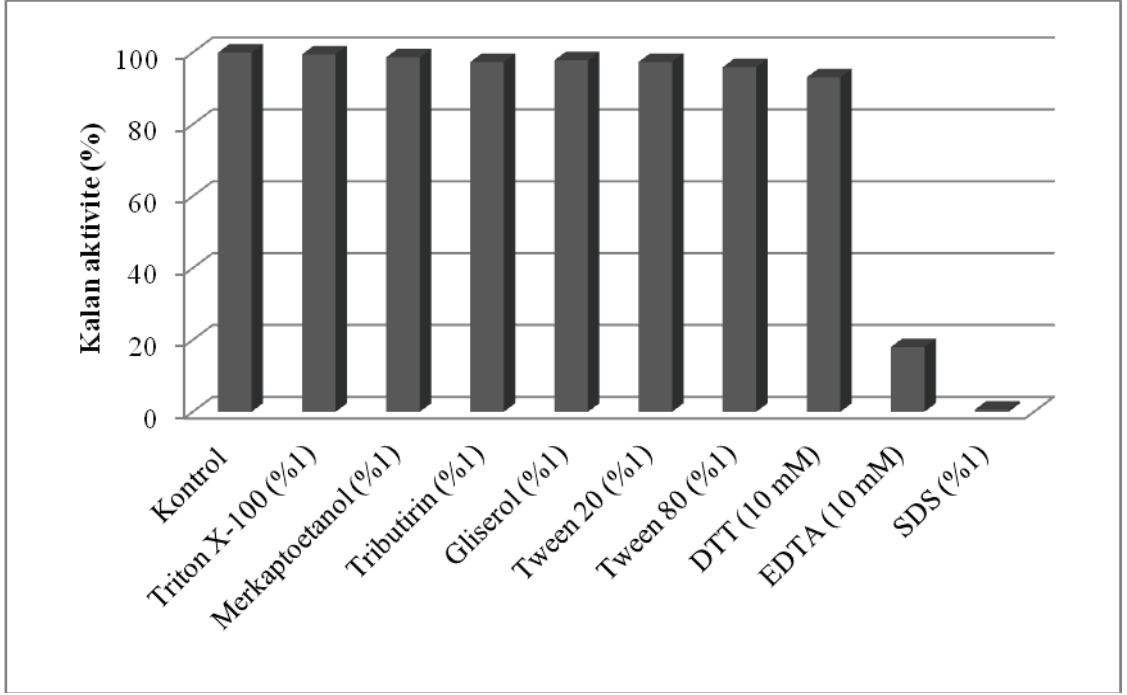
Şekil 3.16 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı metallerin etkisi.



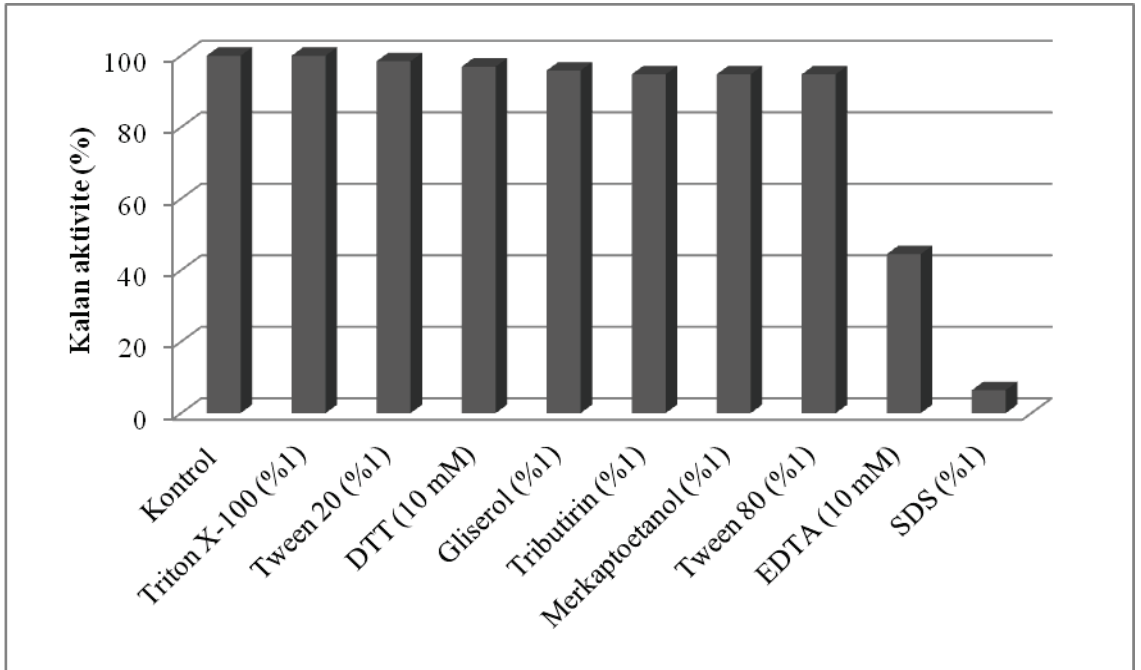
Şekil 3.17 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg2 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı metallerin etkisi.

3.5.5. Çeşitli Ajanların *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarının Lipazları Üzerine Etkisi

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde SDS, Tween 20, Tween 80, Tribütirin, gliserol, DTT, EDTA, Triton X-100 ve merkptoethanol ile enzim karıştırıldı ve 30°C sıcaklıkta 1 saat ön inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında herhangi bir ajan içermeyen örnekler kullanıldı. Ön inkübasyon sonunda aktivitesi belirlendi (Şekil 3.18 ve 3.19). Deney sonuçlarında EDTA ve SDS ajanlarında her iki enzim için yüksek aktivite kaybı olduğu görüldü.



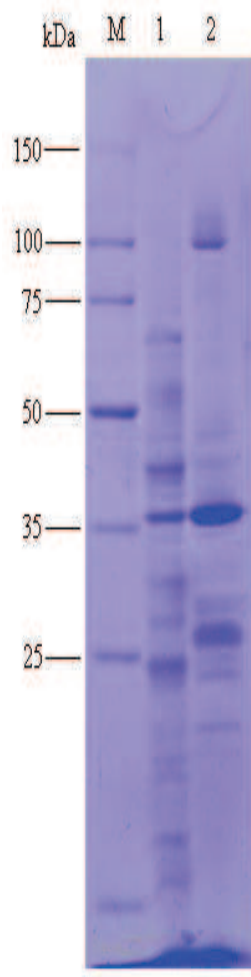
Şekil 3.18 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı çeşitli ajanların etkisi.



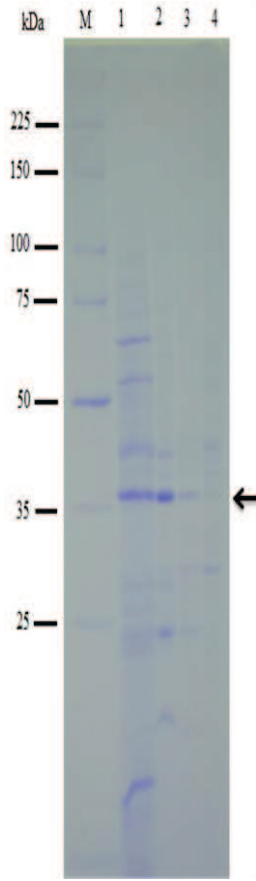
Şekil 3.19 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg2 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı çeşitli ajanların etkisi.

3.6. *Acinetobacter psychrotolerans* Suşlarının Lipazlarının SDS-PAGE Analizi

İzolatların üretmiş olduğu ekstraselüler lipazın ham enziminin ultrafiltrasyonundan sonra elde edilen örneklerinin şekil 3.20’de protein profilleri görülmektedir. Xg1 ultrafiltrasyon örneklerine jel kromatografisi yapıldıktan sonra fraksiyonlardan elde edilen protein örnekleri SDS-PAGE’de yürütülmüş ve protein bantları görüntülenmiştir (Şekil 3.21). Xg1 suşuna ait lipazın moleküler ağırlığının yaklaşık 37 kDa olduğu belirlenmiştir. Xg2 suşuna ait ultrafiltrasyon örneklerinden yapılan jel kromatografi çalışmalarında düşük aktiviteli fraksiyonlar elde edildiğinden lipaza ait protein bantı görüntülenememiştir.



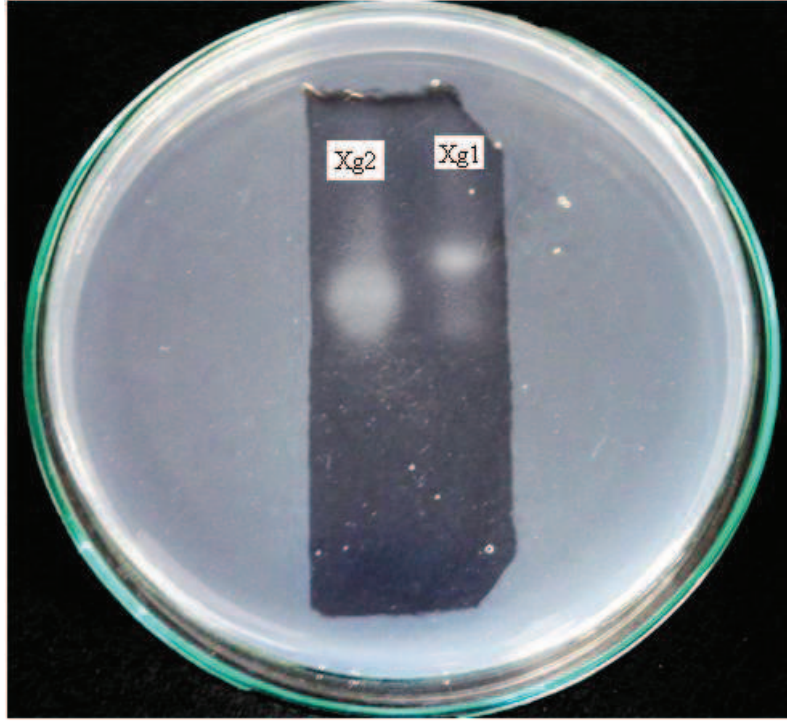
Şekil 3.20 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarına ait ultrafiltrasyon örneklerinin protein profilleri. M: Marker, 1: Xg1 suşu, 2: Xg2 suşu.



Şekil 3.21 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşuna ait lipaz enziminin SDS PAGE'deki protein profili. M: Marker, 1: Ultrafiltrasyon örneği, 2., 3., 4; Jel filtrasyon örnekleri.

3.7. Aktivitenin Belirlenmesi

Xg1 ve Xg2 suşlarına ait lipazların aktivite çalışmaları native jel kullanılarak yapıldı. Aktivite deneyinde hazırlanan Tween 20 besiyeri kullanıldı. Sonuçta her iki suşta birbirine yakın aktivite bantları tespit edildi (Şekil 3.22).



Şekil 3.22 *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarına ait aktivite bantları.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Tartışma

Bu tezde *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarından izole edilen lipaz enzimlerinin karakterizasyonu yapılarak, enzimlerin karşılaştırılmaları yapıldı. Bu suşların lipolitik aktiviteleri Tween 20, Tween 80, Tribütirin ve Rhodamin B Agar besiyerleri kullanılarak belirlendi. Her iki suş içinde en fazla aktivite görüldüğü besiyeri Tween 20 besiyeri olduğundan daha sonraki bütün çalışmalarda bu besiyeri kullanıldı. Suşların ürettiği ekstrasellüler lipaz enzimleri *p*-nitrofenilpalmitat substratı kullanılarak spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir.

Ekstrasellüler lipaz aktivitesi Tween 20, Tween 80 ve Tribütirin agar besiyerleri kullanılarak kalitatif olarak belirlendi (Kugiyama ve ark. 1980; Smibert ve ark. 1981). Mikroorganizmaların Tween 20 ve Tween 80 agar besiyerlerinde lipolitik aktivitesini tespit etmek için yapılan ekim sonucu mikroorganizmaların etrafında kristaller oluşmaktadır. Tribütirin agar lipaz üreten bakterilerin seçimi için kullanılan besiyeridir. Lipaz üreten mikroorganizmalar bu besiyerinde açık zon oluşturmaktadır. Rhodamine B agar besiyeri florescent boya olan Rhodamine B boyası içeren bir besiyeridir. Bu besiyeride lipaz üreten bakterilerin etrafında UV ışığı altında 365 nm'de incelendiği zaman turuncu haleler oluşturmaktadır (Kouker ve Jaeger, 1987). Rhodamine B agar besiyerinde substrat olarak zeytinyağı kullanılmakta ve zeytinyağındaki oleik asitin 18 C'lu olmasından dolayı Rhodamine B ile lipaz aktivitesi göstermektedir. Rhodamine B agar lipaz enziminin kalitatif olarak belirlenmesinde çok sık kullanılan bir besiyeridir (Haba, 2000).

Xg1 ve Xg2 suşları nokta ekim yapılarak Tween 20 ve Tween 80 besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra inkübasyon sonucu kolonilerin etrafında kristaller tespit edildi (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Bu suşların Tribütirin agar besiyerine ekimleri sonucu ise açık zon oluşumu incelenmiştir (Şekil 3.3). Yapılan bazı çalışmalarda Tribütirin agar besiyerinin esteraz ve lipaz aktivitesi sonucunda da açık zon oluşumu tespit edilmiştir (Boran, 2008) Bu nedenle Rhodamine B agar besiyeri kullanılarak suşların lipaz varlığı doğrulandı (Şekil 3.4).

Lipazlar uzun zincirli triaçilgliserolleri hidroliz ettiği için bu çalışmada 16 C’lu sentetik substrat olarak *p*-nitrofenilpalmitat, basit ve hızlı bir yöntem olan spektrofotometrik yöntemde kullanıldı ve 410 nm’de absorbans alındı (Hernaiz, 1997).

Mikroorganizmalardan izole edilen lipaz enziminin en yüksek üretiminin olduğu inkübasyon dönemleri farklı zamanlarda olabilmektedir (Kasana ve ark., 2008; Chaturvedi ve ark., 2010). Bu çalışmada kullanılan *Acinetobacter* cinsininin aynı türün farklı suşları farklı zamanlarda lipaz aktivitesi göstermiştir. Bu iki suşun lipaz üretimi saatlere göre spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. *A. psychrotolerans* Xg1 suşunun en yüksek lipaz üretimi 24. saatte gözlenmiş ve 0,14 U/ml aktivite, *A. psychrotolerans* Xg2 suşunun en yüksek lipaz üretimi 48. saatte gözlenmiş ve 0,13 U/ml aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *A. psychrotolerans* suşlarının birbirine yakın lipaz aktivitesi gösterdiği bulundu. *Acinetobacter* cinsine ait farklı türlerinden izole edilen lipaz enzimlerinin karakterizasyonu yapılmıştır ve 0.085 U aktivite tespit edilmiştir (Kasana ve ark., 2008; Chaturvedi ve ark., 2010).

A. psychrotolerans suşlarından izole edilen lipazların en iyi aktivite gösterdiği optimum pH, pH 8 olarak bulundu. Benzer sonuçlar *Acinetobacter* KM109 (Mitsuhashi ve ark., 1999), *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 (Kok ve ark., 1995) ve *Acinetobacter lwoffii* CR9 (Kasana ve ark., 2008) suşları ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan suşlardan elde edilen enzimler, *Acinetobacter* RAG1 (Snellman ve ark., 2002) ile SY-01 (Han ve ark., 2003) suşundan elde edilen lipaz enziminin daha düşük pH’da aktiftir. Yapılan benzer çalışmalarda daha yüksek pH’da aktivite göstermiştir (Hong ve Chang, 1988; Pratuangdejkul ve Dharmstithi, 2000). *Acinetobacter* sp. ES-1 suşundan elde edilen yeni enantioselektive lipazı pH 7,0’de, *Acinetobacter haemolyticus* TA106 suşunda pH 7’de (Jagtap ve ark., 2010), *Acinetobacter* sp. RAG-1 pH 9’da (Snellman ve ark., 2002) *Acinetobacter calcoaceticus* 1-7 suşlarında pH 9’da ve (Wang ve ark., 2012) *Pseudomonas aeruginosa* BN-1 suşunda pH 8’de aktivite göstermişlerdir (Syed ve ark., 2010). Bunun yanı sıra *Acinetobacter lwoffii* 16C-1 suşundan elde edilen ekstraselüler lipaz pH 9’dan yüksek ve pH 7.5’den düşük değerlerde (Kim ve Park, 2002); *Acinetobacter* sp. RAG-1’de pH 10’da; *Acinetobacter haemolyticus*

TA106'da pH 5'den daha düşük ve pH 9'dan yüksek değerlerde lipaz aktivitesi çok azalmıştır (Jagtap ve ark., 2010).

Her iki suşunda en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 30°C'dir. Xg1 10-60 °C aralığında 15 dakikalık deney sonucunda aktivite %90 üzerinde korunmuştur. 70 °C'de bu suşun yaklaşık %60 aktivitesinin korunduğu belirlendi. 80 °C'de ise aktivitenin %10'nun altına düştüğü görülmektedir (Şekil 3.10). Xg2 suşunun enzimi 10-60 °C 15 dakikalık deney sonucunda aktivite %90 üzerinde korunduğu, 70-90°C aralığında ise kalan aktivitenin %30 ile %60 arasında olduğu tespit edildi (Şekil 3.11). Xg1 ve Xg2 suşlarından izole edilen enzim *Acinetobacter* ile yapılan diğer benzer çalışmalardaki enzimlerden daha düşük sıcaklıkta aktivite gösterdiği bulunmuştur (Hong ve Chang, 1988, Han ve ark., 2003, Mitsunashi ve ark., 1999, Pratuangdejkul ve Dharmstithi, 2000; Snellman ve ark., 2002). Bu çalışmalarda enzimlerin kararlılığı 30 °C'de %90 üzerinde olduğu görülmektedir. Aynı zamanda Xg1 enzimi için kararlılığı 10-60°C aralığında kalan aktivite %80'nin üzerinde olduğu tespit edildi. Xg2 için benzer sonuçlar tespit edildi. Ancak Xg2 enzimi 60°C'de yaklaşık kalan aktivite % 50 olarak belirlendi. Düşük sıcaklıklarda aktivite gösteren enzimler endüstriyel uygulamalarda önemli olmaktadır. *Acinetobacter lwoffii* CR9 suşu 40°C'de, *Acinetobacter* sp. ES-1 suşundan elde edilen yeni enantioselektive lipazı 40°C'de, *Acinetobacter haemolyticus* TA106 suşunda 37°C'de (Jagtap ve ark., 2010), *Acinetobacter* sp. RAG-1 55°C'de (Snellman ve ark., 2002), *Acinetobacter calcoaceticus* 1-7 suşlarında 40°C'de, (Wang ve ark., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* BN-1 suşu ise 37 °C'de en yüksek aktiviteyi göstermişlerdir (Syed ve ark., 2010). Bunun yanı sıra *Acinetobacter lwoffii* 16C-1 suşundan elde edilen ekstraselüler lipaz 50 °C'den yüksek sıcaklıklarda, (Kim ve Park, 2002); *Acinetobacter* sp. RAG-1'de 30 °C'den düşük ve 60°C' den yüksek sıcaklıklarda; *Acinetobacter haemolyticus* TA106'da 45°C'den yüksek ve 28°C' den düşük sıcaklıklarda lipaz aktivitesi tespit edilmiştir (Jagtap ve ark., 2010).

Lipaz substratları genellikle suda çözünmeyen ya da kısmen çözülebilen bileşiklerdir. Bazı reaksiyonlar için organik çözücülerden veya sulu organik çözücülerden yararlanılmaktadır. Bununla birlikte organik çözücülerin, enzimler ve

mikroorganizmalar üzerinde zararlı etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Organik çözücü varlığında birçok organizma işlevini kaybeder ve büyümesi durur. Enzimler genel olarak organik çözücü varlığında denatüre olduğunda aktivitelerini kaybettiklerinden organik çözücülere tolerans gösteren enzimler endüstride oldukça geniş bir uygulama alanı bulabilmektedir (Hun ve ark., 2003). *Acinetobacter psychrotolerans* suşlarından izole edilen lipazların organik çözücüler üzerinde yüksek oranda kararlı olduğu bulundu. *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 suşunun lipaz aktivitesi N,N-dietilformamid, etanol, asetonitril, izoproponal, hekzan, etilasetat ve kloroform çözücülerinde %80 üzerinde iken; butan 1-ol çözücünde 2 saatlik ön inkübasyon sonucu kalan aktivitesi yaklaşık %60 ve aseton çözücüsünde 1 saatlik ön inkübasyon sonucu %60 aktivite göstermiştir. *Acinetobacter psychrotolerans* Xg2 suşunda ise N,N-dietilformamid, etanol, hekzan, etilasetat, aseton ve kloroform çözücülerini lipaz aktivitesini etkilemezken; izoproponal, asetonitril ve butan-1-ol çözücülerini varlığında aktivite kaybı tespit edilmiştir. Organik çözücülerin enzimleri inaktive ve denatüre etmesi enzimlerin kullanımını engellemektedir (Ogino ve ark., 1995). *Pseudomonas aeruginosa* BN-1 ile yapılan çalışmada hekzan lipaz aktivitesini değiştirmezken etanol, izopropanol ve aseton aktiviteyi azaltmıştır (Syed ve ark., 2010) *Acinetobacter* sp. RAG-1 ile yapılan çalışmada izopropanol ve aseton varlığı lipaz enziminin aktivitesini çok azaltmışken asetonitrilin %30 azaldığı tespit edilmiştir (Snellman ve ark., 2002). *Acinetobacter*in bazı alt suşlarıyla yapılan çalışmalarda etanol, izopropanol ve aseton lipaz aktivitesini bir miktar artırdığı asetonitril, metanol ve hekzan çözücülerinin hemen hemen aktiviteyi değiştirmediği bulunmuştur (Khoramnia ve ark., 2011). *Pseudomonas* suşlarıyla yapılan tez çalışmasında ise hekzan, izoproponol çözücülerinin lipaz aktivitesini önemli ölçüde (Boran, 2008) artırdığı ve butanol çözücüsünün aktiviteyi bir miktar azalttığı, etil asetat çözücüsünün ise 2 saatlik inkübasyon sonucunda aktivitede önemli ölçüde kayıplara neden olduğu saptandı (Boran, 2008).

Metal iyonlarının, genellikle enzimin spesifik bölgelerdeki negatif yüklü aminoasit birimlerine bağlanarak enzimin aktif ve kararlı yapısını korumasında etkili bir rol oynadığı bilinmektedir (Şişik, 2003). *Acinetobacter psychtolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının extraselüler lipaz enzimleri NiCl₂, NH₄Cl, CuCl₂, CoCl₂, CdCl₂, CaCl₂, FeCl₃, NaCl, ZnCl₂, HgCl, MgCl₂ ve LiCl metallerinin 5 mM ve 10 mM'lık

çözeltileri ile 30°C'de 1 saat inkübasyondan sonra Xg1 suşunun ürettiği lipaz FeCl₃ ve CuCl₂ metallerin 10 mM'lık çözeltisi ile ZnCl₂'nin her iki konsantrasyonundaki çözeltileri enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Xg2 bakterilerinin ürettiği lipaz enzimi NiCl₂, CoCl₂, CdCl₂, CaCl₂, NaCl ve LiCl metallerin 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının varlığında kontrol grubuna yakın değerlerde aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. NH₄Cl'ün 5 mM ve 10 mM konsantrasyonları lipaz aktivitesini sırasıyla yaklaşık olarak %10 ve %2 oranında artırmıştır. Buna karşılık CuCl₂'ün 5 mM'lık konsantrasyonu %40 oranında lipaz aktivitesini azalttığı, 10 mM'lık konsantrasyonu ve ZnCl₂'ün her iki konsantrasyonu ise lipaz aktivitesini çok büyük oranda azalttığı ölçülerek bulunmuştur. Yapılan diğer benzer çalışmalarda Ca⁺² iyonları kontrol ile benzer sonuçlar göstermiştir (Han ve ark., 2003; Kok ve ark., 1999; Mitsuhashi ve ark., 1999, Snellman ve ark., 2002). Bir diğer çalışmada Cu⁺² ve Zn⁺² iyonlarının 10 mM konsantrasyonu enzim aktivitesini azalttığı bulunmuştur (Snellman ve ark., 2002).

Çeşitli ajanların *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının ekstraselüler lipaz enzimleri üzerindeki sonuçlar incelendiğinde her iki suşta EDTA ve SDS ajanlarının varlığından etkilenirken diğer ajanların etkilenmediği belirlendi. Yapılan bir çalışmada Triton X-100, Tween 20 ve Tween 80 ajanlarının enzim aktivitesi üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. (Khoramnia ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012). Xg1 10 mM'lık EDTA varlığında kalan aktivite yaklaşık % 40 iken Xg2 suşunda ise % 20'nin altında olduğu belirlendi. Xg1 suşunun enzim aktivitesi % 1'lik SDS ile tamamen inhibe edilirken Xg2 suşunda ise kalan aktivite yaklaşık % 6 civarındadır.

Xg1 suşundan elde edilen ekstraselüler enzimin SDS-PAGE analiz sonuçlarında moleküler ağırlığı 37 kDa olarak bulundu. *Acinetobacter* türlerine ait enzimlerin molekül ağırlıkları 23-62 kDa arasında oldukları belirtilmektedir (Wang ve ark., 2011). *Acinetobacter* türlerinden *Acinetobacter* sp. ES-1 (Kasana ve ark., 2008), *Acinetobacter venetianus* RAG-1 (Snellman ve ark., 2008), *Acinetobacter* sp. RAG-1 (Snellman ve ark., 2002), ve *A. calcoaceticus* BD413 (Kok ve ark., 1995) suşlarının yaklaşık 32 kDa olduğu bulundu. Diğer çalışmalarda; *A. junii* SY-01 40 kDa (Yoon ve ark., 2004), *Acinetobacter* sp. B2 60 kDa ((Son ve ark., 2004), *A.*

calcoaceticus LP009 23 kDa (Pratuangdejku ve ark., 2000), *A. radioresistens* CMC-1 45 kDa (Hong ve ark., 1998), *Acinetobacter* sp. KM109 62 kDa (Mitsubishi ve ark., 1999), *Acinetobacter* CMC-2 38 kDa (Ng ve ark., 1999) ve *Acinetobacter johnsonii* LP28 53 kDa (Wang ve ark., 2011) olduğu görüldü. Yapılan bir çalışmada kullanılan *Acinetobacter baumannii* BD5 suşundan izole edilen enzim ile Xg1 suşundan izole edilen enzimin aynı molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edildi (In-Hye ve ark., 2009). Xg1 suşundan izole edilen enzim üzerinde 10 mM konsantrasyondaki Zn^{+2} ve Fe^{+3} yaklaşık %90 aktivite kaybı olmuştur. Ancak BD5 suşundan izole edilen 10 mM konsantrasyondaki Zn^{+2} %46 aktivite kaybına neden olurken Fe^{+3} 'de aktivite kaybı görülmemiştir. Aynı çalışmada Triton X-100, merkaptolanolde aktivite kaybı olurken Xg1 enziminde çok önemsiz kayıp gözlemlendi.

4.2 Sonuç

Ticari enzimlere, özellikle de mikrobiyal kaynaklı enzimlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Çünkü pek çok alanda kullanıma sahip olmaları söz konusudur. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar kimyasal metotlara göre daha ucuz ve daha basittir. Enzimler başta gıda, eczacılık, deterjan, tekstil ve kozmetik olmak üzere pek çok sanayi dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel enzim üretimi bu alanlar için önemli çapta yapılmaktadır. Sentez reaksiyonları genellikle yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücü bulunan ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, bu amaca hizmet etmek için kullanılacak bir enzim yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücü ortamlarında kararlı olması ve bu şartlarda katalitik fonksiyonunu yüksek oranda gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu tezde lipaz enzimini üreten bakterilerden *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşları incelenmiştir. Çalışma sonucunda *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 enzimi için 10-60°C aralığında kalan aktivitenin %80'nin üzerinde olduğu tespit edildi. Xg2 için de benzer sonuçlar tespit edildi. Ancak Xg2 enzimi 60°C'de yaklaşık kalan aktivite %50 olarak belirlendi .

Belli bir pH değerinde maksimum aktivite göstermesi sebebiyle lipazın birçok alanda katalizör olarak kullanılması mümkün olacaktır. Optimum pH değeri 8 olarak saptanmıştır. *Acinetobacter psychtolerans* Xg1 suşunun 24 saat süreyle üretilmesi sonucunda maksimum lipaz üretimini, *Acinetobacter psychtolerans* Xg2 suşunun 48 saat sonunda maksimum lipaz üretimini sağlaması nedeniyle çok zaman kaybı olmaksızın lipaz enziminin üretimini gerçekleştirilmesi mümkün olacaktır.

Aynı zamanda *Acinetobacter psychrotolerans* Xg1 ve Xg2 suşlarının sentezlediği lipaz enziminin organik çözücü ortamlarındaki kararlılığı ve metal iyonları ve çeşitli ajanlara karşı davranışı bu enzimin daha çok üretilip ve daha fazla oranda saflaştırılmasıyla farklı sanayi kollarında, farklı reaksiyonların katalizinde kullanımına olanak sağlayabilecek türden olabileceğini göstermektedir. Xg1 suşunun ürettiği lipaz FeCl₃ ve CuCl₂ metallerinin 10 mM'lık çözeltisi ile ZnCl₂'nin her iki konsantrasyonundaki çözeltileri enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Xg2 bakterilerinin ürettiği lipaz enzimi NiCl₂, CoCl₂, CdCl₂, CaCl₂, NaCl ve LiCl metallerinin 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının varlığında kontrol grubuna yakın değerlerde aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. NH₄Cl'n 5 mM ve 10 mM konsantrasyonları lipaz aktivitesini sırasıyla yaklaşık olarak %10 ve %2 oranında artırmıştır. Ayrıca CuCl₂'n 5 mM'lık konsantrasyonu % 40 oranında lipaz aktivitesini azalttığı, 10 mM'lık konsantrasyonu ve ZnCl₂'n her iki konsantrasyonu ise lipaz aktivitesini artırmıştır. *Acinetobacter psychrotolerans* türünün her iki suşu incelendiğinde EDTA ve SDS ajanlarının varlığında ürettikleri lipaz enziminin aktivitesinin çok azaldığı diğer ajanlardan etkilenmediği belirlendi. Her iki suşun çeşitli organik çözücülerin varlığında yüksek oranda kararlılığını koruduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

Akho, C.C. ve David, B. 2008. *Min. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (3rd Ed.), Casimir C., Francis & Taylor, NY.

Anonim, 1992. *Enzyme Nomenclature, Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB)*, California.

Arpigny, J.L. ve Jaeger, K.E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemistry Journal* 343: 177-183.

Aydoğmuş Öztürk, F., “*Pseudomonas*” Türlerinde Lipaz Üretimi ve Bazı Kültürel Parametrelerin Optimizasyonu”, Muğla Üniversitesi, Ocak 2006.

Bjokling, F., Godtfredsen, S.E. ve Kirk, O. 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnology* 9: 360–363.

Balashev, K., Jensen, T.R., Kjaer, K. ve Bjørnholm, T. 2001. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie* 83 (5):387–397.

Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C. ve Verger R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology* 133–153.

Bouvet, P.J.M. ve Gimont, P.A.D. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* spp. nov., *Acinetobacter johnsonii* spp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36:228–240.

Boran, R. 2008. *Pseudomonas spp.*'de lipaz enzimi üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Bouvet, P.J.M. ve Jeanjean, S.1989. Delineation of new proteolytic genomic species of the genus acinetobacter. *Research Journal of Microbiology* 140:291–299.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G. ve Ros, R.O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbiology Technology* 37: 648–654.
- Chaturvedi, M., Singh, M., Man, C.R. ve Pandey, S. 2010. Lipase Production from *Bacillus subtilis* MTCC 6808 by Solid State Fermentation Using Ground Nut Oil Cakes as Substrate. *Research Journal of Microbiology* 5: 725-730.
- Chen, L., Daniel, R.M. ve Coolbear, T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk powders. *International Dairy Journal* 13: 255-275.
- Chen, S, Qian, L. ve Shi, B. 2007. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochemistry* 42: 988–994.
- Dong, H., Gao, S., Han, S. ve Cao, S. 1999. Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and properties in non-aqueous media. *Biotechnology Applied Biochemistry* 30: 251-256.
- Dröge, M.J. 2004. Selection of novel lipases and esterases for enantioselective biocatalysis. Ridderprint BV (Ridderkerk, The Netherlands).
- Ertuğrul, S., Döñez, G. ve Takaç, S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials* 149 (3): 720-724.
- Feller, G., Thiry, M., Arpigny, J.L., Mergeay, M. ve Gerday, C. 1990. Lipases from Psychrotrophic Antarctic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 66: 239–244.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg N.R., ve Phillips G.B. (ed.), 1981. Manual of methods for general bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.

Gill J. ve Parish J.H. 1997. Minireview: Lipases-Enzymes at an Interface. *Biochemical Education* 25 (1) : 2–5.

Gill, S.C. ve von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182:319-26.

Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R., ve Freire, D.M.G. 1999. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry* 35: 85–90.

Gunstone, F.D. 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1535–1549.

Ghanem, E.H., Al-Sayeed, H.A. ve Saleh, K.M. 2000. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 16: 459– 464.

Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P. ve Davidson, S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Science progress* 79 (2): 119–157.

Gupta, R, Gupta, N. ve Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Biotechnology* 64: 763-781.

Gupta, N., Rathi, P., Singh, R., Goswami, V.K. ve Gupta, R. 2007. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. *Applied Microbiology Biotechnology* 67: 648–653.

Haba, E., Bresko, O., Ferrer, C., Marqués, A., Busquets, M., Manresa, A. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 40–44.

Haki, G.D., Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* 89: 17-34.

Han, S., Bac, J.H., Yoon, M.Y., Shin, P.K., Cheong, C.S., Sung, M., Hong, S., Chung, I.Y. and Han, Y.S. 2003. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* species SY-01. *Biochimie* 85:501–510.

Heler, L. (2006). US enzyme market poised for continued growth. <http://www.foodnavigator-usa.com/Suppliers2/US-enzyme-market-poised-for-continued-growth>. Web adresinden 05.06.2013 tarihinde edinilmiştir.

Hernaiz, M.J., Sanchez-Montero, J.M. ve Sinisterra, J.V. 1997. *Biotechnology and Bioengineering* 55: 252–60.

Hong, M. ve Chang, M. 1988. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 *Biotechnology Letters* 20:1027–1029.

Hun, C.J., Rahman, R.N., Salleh, A.B. ve Basri, M. 2003. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal* 15:147–151.

In-Hye, P., Kim, S.H., Lee, Y.S., Lee, S.C., Zhou, Y., Kim, C.M., Ahn, S.C., ve Choi, Y.L. 2009. Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Cold-Adapted Lipase Produced by *Acinetobacter baumannii* BD5, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (2): 128–135.

Jacks, T.J. ve Kircher, H.W. 1967. Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. *Analytical Biochemistry* 21: 279-284.

Jaeger, K.E. ve Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH*, 16: 396–403.

Jaeger, K. ve Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 390–397.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M. ve Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 29-63.

Jagtap, S., Gore, S., Yavankar, S., Pardesi, K. ve Chopade, B. 2000. Optimization of medium for lipase production by *Acinetobacter haemolyticus* from healthy human skin. *Indian Journal of Experimental Biology* 48:936-41.

Jinwal, U.K., Roy, U., Chowdhury, A.R., Bhaduri, A.P. ve Roy, P.K. 2003. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from a Newly Isolate *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and Chemoselective Hydrolysis of Fatty Acid Ester. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11: 1041–1046.

Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., ve Iefuji, H., 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry* 36: 317–324.

Kanwar, L., Gogoi, B.K. ve Goswami, P. 2002. Production of a *Pseudomonas* lipase in *n*-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology* 84: 207–211.

Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Beh, B.K. ve Lai, O.M. 2011. Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. In submerged and solid-state fermentations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011:702179.

Kim, H.E. ve Park, K.R. 2002. Purification and characterization of an esterase from *Acinetobacter lwoffii* I6C-1. *Current Microbiology* 4 (6): 401-5.

Kirk, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme application. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 345-351.

Kok, R.G. ve Thor, J.J. 2006. Characterization of the extracellular lipase. LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular Microbiology* 15: 803-818.

Kok, R.G., Van Thor, J.J., Nugteren-Roodzant, I.M., Brouwer, M.B.W., Egmond, M.R., Nudel, C.B., Vosman, B., Hellingwerf, K.J. 1995. Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular Microbiology* 15: 803–818.

Kouker, G., ve Jaeger, K.E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 211–213.

Kugiyama, W., Otani, Y., Hashimoto, Y., ve Tagagi, Y. 1980. Molecular cloning and nucleotide sequence of lipase gene. 14: 18 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 5: 190.

Kuo, T., 2002. Lipid Biotechnology. New York, 357p.

Klibanov, A.M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* 409: 241–246.

Kasana, R.C., Kaur, B., Yadav, S.K., Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. 2008. CR9 and characterization of its alkaline lipase. *Journal of Basic Microbiology* 48: 207–212.

Kugiyama, W., Otani, Y., Hashimoto, Y., ve Tagagi, Y. 1980. Molecular cloning and nucleotide sequence of lipase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 14: 185–190.

Kulkarni, N. 2002. Studies on lipase enzyme from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. Doktora Tezi. Chemical engineering Division National Chemical Laboratory India.

Kiran,G.S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, R., Arunkumar, M., Thangavelu, T. ve Natarajaseenivasan, K. 2008. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas sp.* (MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering* DOI 10.1007/s00449-007-0186-0. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 (5): 483-92.

Lanser, A.C., Manthey, L.K. ve Hou, C.T. 2002. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein. *Current Microbiology* 44: 336-340.

Li, H. ve Zhang, X. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus sp.* TW1. *Protein Expression and Purification* 42: 153-159.

Litthauer, D, Skem, E. ve Philips, A. 2002. Pseudomonas luteola lipase: A member of the 320 residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 209-215.

Mahler, G.F., Kok, R.G., Cordenons, A., Hellingwerf, K.J. ve Nudel, B.C. 2000. Effects of carbon sources on extracellular lipase production and lipA transcription in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24: 25-30.

Malcata, F.X. ve Hill, C.G. 1991. Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butter oil. *Biotechnology Bioengineering* 38: 853-868.

Malcata, F., Hill, C. ve Amundson, C. 1992. Hydrolysis of butter oil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part III. Multiresponse kinetic studies. *Biotechnology Bioengineering* 39: 1002-1012.

Martínez, A. ve Soberón-Chávez, G. 2001. Characterization of the lipA gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. *Applied Microbiology Biotechnology* 56: 731-5.

Maurich, V., Moneghini, M., Zacchigna, M., Pitotti, A. ve Lencioni, E. 1991. Highperformance liquid chromatographic assay of pancreatic lipase activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 9: 427-431.

Mitsuhashi, K., Yamashita, M., Hwan, Y.S., Ihara, F., Nihira, T. ve Yamada, Y. 1999. Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acinetobacter nov. sp.* Strain M109. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63: 1959–1964.

Mukherjee, K.D. ve Hills, M.J. 1994. in Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application (Woolley, P. and Petersen, S. B., eds), pp. 49–75, *Cambridge University Press*, Cambridge.

Ng, I.S., Tsai, S.W. ve Chen, S.J. 1999. Purification and characterization of extracellular lipase from *Acinetobacter radioresistens* CMC-2. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 30: 355–362.

Ogino, H., Yasui, K., Shiotani, T., Ishihara, T. ve Ishikawa, H. 1995. “Organic solvent-tolerant bacterium which secretes an organic solvent- stable proteolytic enzyme,” *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4258–4262.

Patkar, S. ve Björkling, F. 1994. Lipase inhibitors. In Lipases: their structure, biochemistry and application (Woolley, P. and Petersen, S.B., Eds.). *Cambridge University Press.*, pp. 207–224. Cambridge.

Paiva AL, Balcao VM ve Malcata FX. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases”. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 187-204.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N. ve Soccol, U.T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29: 119–131.

Pratuangdejkul, J. ve Dharmsthiti, S. 2000. Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Research in Microbiology* 155: 95–100.

Rajmohan, S., Dodd, C.E. ve Waites, W.M., 2002. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology* 93: 205-213.

Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H. ve Imanaka, T.. 2001. Low temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. Strain KB700A. *Applied Environmental Microbiology* 67: 4064–4069.

Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R.K. ve Gupta, R. 2000. A hyper-thermostable, alkaline from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters* 22: 495–498.

Rathi, P., Saxena, R.K. ve Gupta, R. 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepaia* for detergent formulation. *Process Biochemistry* 37: 187–192.

Rosenau, F. ve Jaeger, K.E. 2000. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation o gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* 82: 1023-1032.

Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A. ve Giri, B. 2003. Purification and characterisation of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry* 39: 239–247.

Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627-662.

Sayari, A., Frikha, F., Miled, N., Mtibaa, H., Ali ,Y.B., Verger, R. ve Gargouri, Y. 2005. N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. *FEBS Letters* 579: 976–982.

Schmidt-Dannert C. 1999. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7: 2123–2130.

Singh, S. ve Banerjee UC. 2007. Purification and characterization of trans-3-(4 methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry* 42: 1063–1068.

Smibert, R.M, ve Krieg N.R. 1981. General characterization, p. 409–443.

Smibert, R.M. ve Krieg, N.R. 1994. Phenotypic characteristics. In *Methods for General and Molecular Biology*, pp. 607–654. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: *American Society for American Society for Microbiology*.

Snellman, E.A., Sullivan, E.R. ve Colwell, R.R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *European Journal of Biochemistry* 269:5771–5779.

Snellman, E.A., Colwell, R.R. 2008. Transesterification activity of a novel lipase from *Acinetobacter venetianus* RAG-1, *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 621–625.

Son, S.H. ve Park, K.R.2004. Purification and characterization of the lipase from sp. B2 isolated from oil-contaminated soil. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 40: 320–327.

Syed, M.N., Iqbal, S., Bano ,S., Abdul Basit Khan, A.B., Ali-ul-Qader, S. ve Azhar, A. 2010. Purification and characterization of 60 kD lipase linked with chaperonin from *Pseudomonas aeruginosa* BN-1. *African Journal of Biotechnology* 9: 7724-7732.

Sztajer, H. ve Maliszewska, I. 1989. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters* 11: 895–8.

Şişik, D. 2003. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis*, Polihidroksibutirat Parçalama Yeteneğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R. ve Cabral, J.M.S. 1992. Purification of lipases. *Journal of Biotechnology* 26: 111–142.

Tsai, S.H., Liu, C.P., ve Yang, S.S. 2007. Microbial conversion of food wastes for biofertilizer production with thermophilic lipolytic microbes. *Renewable Energy* 32: 904–915.

Telefoncu, A. 1993. *Besin Kimyası*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No: 149. İzmir, 172s.

Telefoncu, A,1996. Protein Saflaştırma ve Karakterizasyonu, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme İzmir-Türkiye, 272s.

Tjernberg, I. ve Ursing, J. 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 97: 595–605

Van Beilen, J.B. ve Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 338-344.

Von Tigerstrom, R.G. ve Stelmaschuk, S. 1989. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes . *Canadian Journal of Microbiology* 35: 511-514.

Wang, H., Zhong, S., Ma, H., Zhang, J. ve Wei Qi, W. 2012. Screening And Characterization Of A Novel Alkaline Lipase From *Acinetobacter calcoaceticus* 1-7 Isolated From Bohai Bay In China For Detergent Formulation. *Brazilian Journal Of Microbiology* 2012: 148-156.

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

Wang, H.K., Shao, J., Wei, Y.J., Zhang, J. ve Qi, W.A. 2011. Novel Low-Temperature Alkaline Lipase from *Acinetobacter johnsonii* LP28 Suitable for Detergent Formulation. *Food Technology and Biotechnology* 49:96-102.

Wang, Q., Hou, Y., Ding, Y. ve Yan, P. 2012. Purification and biochemical characterization of a cold-active lipase from Antarctic sea ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. NJ 70. *Molecular Biology Reports* 39: 9233-9238.

Winkler, U.K. ve Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 138(3): 663-670.

Wiseman, A. 1995. Introduction to principles. In: Wiseman A, editor. Handbook of enzyme biotechnology (3rd ed.), pp. 3-8, Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd, Padstow, Cornwall, UK.

Yang, D. S. ve Rhee, J. S. 1992. Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent. *Biotechnology Bioengineering* 40: 748-752.

Yoon, M.Y, Shin, P.K., Han, Y.S., Lee, S.H., Park, J.K. ve Cheong, C.S. 2004. Isolation of an *Acinetobacter junii* SY-01 strain producing an extracellular lipase enantioselectively hydrolyzing itraconazole precursor and some properties of the lipase. *Journal of Microbiology and Biotechnolog* 97: 104-114.

Zaidi, A., J. Gainer, L. ve Carta, G. 1995. Fatty acids esterification using Nylon-immobilized lipase. *Biotechnology Bioengineering* 48: 601-605.

ÖZGEÇMİŞ

1974 Giresun / Görele’de doğdu. 1985 tarihinde Gölyaka İlkokulunu, 1988 tarihinde Ünye Fevzi Çakmak Ortaokulunu, 1991 tarihinde Ünye Lisesini bitirip Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliğini kazandı. 1995 yılında mezun oldu. Aynı yıl Yozgat/Boğazlıyan İmam Hatip Lisesine Biyoloji öğretmeni olarak atandı. Bir yıl sonra Trabzon Affan Kitapçioğlu Lisesine tayin oldu. 1997 yılından beri de Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesinde çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk annesidir.