



**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İLE
LİPAZ ENZİMİ ÜRETİMİ**

Yüksek Lisans Tezi

Esra ACU

Eskişehir 2019

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İLE LİPAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Esra ACU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kasım 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Esra ACU' nun "Laktik Asit Bakterileri İle Lipaz Enzimi Üretimi" başlıklı tezi 22/11/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Üye (Tez Danışmanı)

Üye

Üye

Unvanı Adı Soyadı

:Prof. Dr. Merih KIVANÇ

:Doç. Dr. Buket KUNDUHUĞLU

:Doktor Öğretim Üyesi Volkan KILIÇ

İmza



.....Enstitüsü Müdürü

ÖZET

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İLE LİPAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

Esra ACU

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi,

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kasım 2019

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Süt ve peynirden izole edilen 50 laktik asit bakterisi lipaz aktivitesi açısından taranmıştır. Yüksek lipaz aktivitesine sahip olan 11 izolat seçilmiştir. Seçilen 11 izolat 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. İzolatlardan 9 u *E. faecium* 2 si *E. durans* olarak tanımlanmıştır. Seçilen bu izolatlar ile optimum enzim üretim koşulları belirlenmiştir.

Seçilen bakteriler ile lipaz üretimi için optimum gelişme koşulları belirlenmiştir. Azot kaynağı olarak %5 pepton, karbon kaynağı olarak glikoz içeren pH'sı 6.5 olan besi ortamında 48 saat 120 rpm de, 40-60°C inkübasyondan sonra üretilen mikroorganizmalardan elde edilen ekstrasellüler enzimlerin aktivitesi maksimum olmuştur.

Optimum koşullarda üretilen ekstrasellüler enzim aktivitesine etki eden faktörler belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler enzim aktivitesi 30-45°C de, pH 9-10 arasında maksimum olmuştur. Lipaz enzimleri halofil özellik göstermiştir yüksek tuz konsantrasyonlarında yüksek aktivite gözlenmiştir. Ekstrasellüler enzimlerin sıcaklık direnci suşlara göre değişmiştir. Ekstrasellüler enzimlerin aktiviteleri 3,5 saat 45°C alkali ortamda (pH 8-11) inkübasyon sonrasında devam etmiştir. Enzim aktivitesine çeşitli katyonların ve yüzey aktif maddelerin etkisi farklılıklar göstermiştir.

Enterococcus spp. suşlarına ait kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler enzimlerin düşük sıcaklıkta ve yüksek sıcaklıkta aktivite göstermeleri, halofil özellikte olmaları nedeniyle gıda sektöründe özellikle et ve süt ürünleri gibi fermente ürünlerde aroma ve arzu edilen lezzetin kazandırılması amacıyla kullanılabilirliği ümit vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, Lipaz, Enzim aktivitesi

ABSTRACT

LIPASE ENZYME PRODUCTION WITH LACTIC ACID BACTERIA

Esra ACU

Department of Advanced Technologies

Program in Biotechnology

Eskisehir Technical University, Institute of Graduate Programs, November 2019

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Fifty lactic acid bacteria isolated from milk and cheese were screened for lipase activity. Eleven isolates with high lipase activity were selected. Those selected 11 isolates were identified by 16S rRNA sequence analysis. Nine of 11 isolates were identified as *E. faecium* and 2 as *E. durans*. Optimum enzyme production conditions were determined with those selected isolates.

Optimum growth conditions for lipase production were determined with selected bacteria. The activity of the extracellular enzymes was maximum that obtained from microorganisms after incubation at 40-60° C, 48 hour and 120 rpm in a medium containing 5% peptone as nitrogen source and pH 6.5 as carbon source.

Factors affecting extracellular enzyme activity that was produced under optimum conditions were determined. The partially purified extracellular enzyme activity was maximum at 30-45°C and pH 9-10. Lipase enzymes showed halophilic properties, high activity was observed at high salt concentrations. The resistance of the extracellular enzymes against temperature was changed according to the strains. The activity of extracellular enzymes was continued after incubation in 45°C alkaline medium (pH 8-11) for 3.5 hours. The effect of various cations and surfactants on enzyme activity showed differences. Olive waste may also be a suitable medium for lipase production. However, further studies are needed.

Partially purified extracellular enzymes of *Enterococcus* spp. strains were active in low temperature and high temperature and had halophilic properties. Because of those properties, they will be used in the food industry, especially in the fermented products such as meat and dairy products for the purpose of providing flavor, in the future.

Keywords: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, Lipase, Enzyme activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda tüm bilgi birikimi ile emeğini ve güler yüzlülüğünü esirgemeyen her zaman destekleyen, değerli hocam Prof. Dr. Merih Kıvanç'a,

Her zaman sabırla ve özveriyle çalışmalarımda yardım eden değerli hocam Doktor Öğretim Üyesi Volkan Kılıç'a;

Laboratuvar çalışmalarım sırasında destekleyen ve yardımcı olan biyoloji bölümündeki değerli hocalarıma ve sevgili arkadaşlarıma;

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.

ESRA ACU

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Esra ACU



İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GÖRSELLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri	2
1.2. Enzimlerin Genel Özellikleri	4
1.2.1. Mikrobiyal enzimler	4
1.3. Lipaz Enzimi ve Yapısı	6
1.3.1. Lipaz enziminin yapısı	8
1.3.2. Hayvansal lipazlar	9
1.3.3. Bitkisel lipazlar	10
1.3.4. Mikrobiyal lipazlar	10
1.3.4.1. Bakteriye lipazdaki çeşitlilik	12
1.3.4.2. Bakteriye lipaz üretimi	12
1.4. Lipazların Kullanım Alanları	13
1.4.1. Biyodizel üretiminde lipazlar	15
1.4.2. Deterjan endüstrisinde lipazlar	15
1.4.3. Gıda endüstrisinde lipazlar	16
1.4.4. Kâğıt endüstrisi	17
1.4.5. Yağ endüstrisi	17
1.4.6. Çevre kirliliğinin giderilmesinde lipazlar	17
1.4.7. Medikal uygulamalarla lipazlar	18

1.4.8. Kozmetik endüstrisinde lipazlar	18
1.4.9. Biyosensör olarak lipazlar	18
1.4.10. Bakteriyel lipaz üretiminde son gelişmeler	18
2. MATERYAL VE METOD	21
2.1. Materyal	21
2.1.1. Laktik asit bakteri izolatları	21
2.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri	21
2.1.2.1. MRS broth	21
2.1.2.2. M17 broth	21
2.1.2.3. MRS agar	21
2.1.2.4. M17 agar	21
2.1.2.5. Lipaz besiyeri 1(Tributrin agar)	22
2.1.2.6. Lipaz tayin ortamı	22
2.1.2.7. Mueller Hilton agar	23
2.1.2.8. Mueller Hilton broth	23
2.1.2.9. Todd-Hewitt agar	23
2.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	23
2.1.3.1. Enzim aktivite tayini için substrat	24
2.1.3.2. Farklı pH'larda tamponların hazırlanması	24
2.1.3.3. Farklı çözeltilerin hazırlanması	25
2.1.3.4. Coomassie Brilliant Blue G-250	25
2.2. Methodlar	25
2.2.1. Kültürlerin geliştirilmesi ve saflıkların kontrol edilmesi	25
2.2.1.1. Katalaz testi	25
2.2.1.2. Gram boyama	25
2.2.2. Lipaz üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi	26
2.2.2.1. Lipaz aktivitesi gösteren laktik asit bakteri izolatlarının seçimi	26
2.2.2.2. Laktik asit bakterilerinin lipaz besiyerindeki gelişmesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi	26
2.2.2.3. Seçilen laktik asit bakterilerinde lipaz üretimi	26

2.2.2.4. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi	27
2.2.2.5. Substrat sıcaklığının lipaz üretimine etkisinin belirlenmesi	28
2.2.2.6. Karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi	28
2.2.2.7. Azot kaynaklarının enzim üretimine etkisi	28
2.2.2.8. pH'nın enzim üretimine etkisi	28
2.2.2.9. Çalkalamanın enzim üretimine etkisi	29
2.2.2.10. Lipaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi	29
2.2.3. Lipaz üretiminde farklı substratların kullanılabilirliğinin belirlenmesi	29
2.2.4. p-Nitrofenol için standart eğrinin hazırlanması	30
2.2.5. Enzim üretimi	31
2.2.6. Enzimin kısmi saflaştırılması	31
2.2.7. Enzim aktivitesinin hesaplanması	31
2.2.8. Protein miktarının belirlenmesi	32
2.2.9. Elektroforez	33
2.2.9.1. Lipazın molekül ağırlığının belirlenmesi	33
2.2.10. Enzim aktivitesine etki eden faktörlerin belirlenmesi	35
2.2.10.1. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi ...	35
2.2.10.2. pH'ın enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi	35
2.2.10.3. Bazı çözeltilerin ve katyonların enzim aktivitesine etkisi	36
2.2.10.4. Enzim aktivitesine tuzun etkisinin belirlenmesi	36
2.2.11. Seçilen izolatların tanımlanması	36
2.2.12. Jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi	37
2.2.13. Antibiyotik hassasiyet testi	37
2.2.14. Hemolitik aktivite	37
3. BULGULAR	38
3.1. Test Bakterilerinin Seçimi	38
3.2. Laktik Asit Bakterilerinin Lipaz Üretimi Açısından Taranması	39
3.3. Seçilen İzolatların Tanımlanması	40

3.4. Lipaz Enzimi Üretimine Etki Eden Faktörler	41
3.4.1. Sıcaklığın etkisi	41
3.4.2. Substrat sıcaklığının etkisi	43
3.4.3. Fermantasyon süresinin etkisi	43
3.4.4. Çalkalamanın etkisi	44
3.4.5. Azot kaynaklarının etkisi	45
3.4.6. Karbon kaynaklarının etkisi	46
3.4.7. Ortam pH'ının etkisi	47
3.5. Zeytin ve Peynir Altı Suyunda Lipaz Üretimi	48
3.6. Lipaz Enziminin Protein Miktarları	48
3.7. Lipazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	49
3.8. İzolatların Antibiyotik Hassasiyeti ve Jelatinaz Aktivitesi	50
3.9. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi	51
3.9.1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi	51
3.9.2. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesi	55
3.9.3. Enzim aktivitesi üzerine katyon, deterjan ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi	59
3.9.4. Enzim aktivitesi tuzun etkisinin belirlenmesi	60
3.10. Zeytin Atığından <i>E. faecium</i> E68 ile Elde edilen Lipaz Enziminin Aktivitesi	62
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKÇA	76

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulamaları	5
Tablo 1.2. Lipaz enziminin katalize ettiği reaksiyonlar	7
Tablo 1.3. Farklı mikroorganizmalarda lipaz oluşumu	11
Tablo 1.4. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları	14
Tablo 3.1. İzolatların lipolitik aktivite sonucu oluşturduğu şeffaf bölge (zon) çapları (cm)	40
Tablo 3.2. Test bakterilerinin 16S rRNA gen bölgesine göre dizi analizi sonuçlarına göre tanımlanması	41
Tablo 3.3. İzolatların farklı sıcaklıklarda lipolitik aktivite sonucu oluşturduğu zon çapları (cm)	42
Tablo 3.4. Enterococcus spp. ait ekstrasellüler lipaz enzimlerinin kuru ağırlık ve protein miktarları	49
Tablo 3.5. Enterococci spp. antibiyotik hassasiyeti ve jelatinaz aktivite	50
Tablo 3.6. Çeşitli katyon ve yüzey aktif maddelerin lipaz aktivitesi üzerine etkisi ...	59
Tablo 3.7. Zeytin atığında (%10) E. faecium E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin farklı katyon ve sürfektanların enzim aktivitesine etkisi	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Lipazın hidrolitik ve sentetik etkisi	6
Şekil 1.2. Katalitik α / β hidrolaz katının sekonder yapı diyagramı	8
Şekil 1.3. Lipaz enziminin açık yapısı	9
Şekil 2.1. Nitrofenol standart eğrisi	30
Şekil 2.2. Protein standart grafiği	33
Şekil 3.1. Farklı sıcaklıklarda üretilen bakterilere ait lipaz enzimlerinin aktivitesi	42
Şekil 3.2. Test bakterileri tarafından üretilen lipaz enziminin aktivitesi üzerine substrat sıcaklığının etkisi	43
Şekil 3.3. Farklı fermantasyon süreleri uygulanarak üretilen bakterilere ait ekstrasellüler ve intrasellüler lipaz enzimlerinin aktivitesi	44
Şekil 3.4. Çalkalamalı ve statik olarak üretilen bakterilere ait lipaz enzimlerinin aktivitesi	45
Şekil 3.5. Farklı azot kaynaklarında geliştirilen Enterococcus spp. ait lipaz enzimlerinin aktivitesi	46
Şekil 3.6. Farklı karbon kaynaklarında geliştirilen Enterococcus spp. ait lipaz enzimlerinin aktivitesi	47
Şekil 3.7. Farklı pH'larda geliştirilen bakterilere ait lipaz enzimlerinin aktivitesi	47
Şekil 3.8. Farklı substratlarda geliştirilen kültürlerle ait lipaz enzimlerinin aktivitesi	48

Şekil 3.9. Kısmi olarak saflaştırılmış <i>Enterococcus</i> spp. İzolatlarına ait lipaz enzimlerinin SDS-PAGE analizi	49
Şekil 3.10. <i>Enterococcus</i> spp. lere ait ekstrasellüler lipaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	51
Şekil 3.11. <i>Enterococcus</i> spp. lere ait ekstrasellüler lipaz enziminin farklı sıcaklıklarda farklı bekleme sürelerine göre sıcaklık direnci	53
Şekil 3.12. <i>Enterococcus</i> spp. ait lipaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	55
Şekil 3.13. Lipaz aktivitesinin pH direnci	57
Şekil 3.14. Lipaz enziminin aktivitesi üzerine tuzun etkisi	60
Şekil 3.15. Zeytin atığında (%10) üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi	62
Şekil 3.16. Zeytin atığında (%10) <i>E. Faecium</i> E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enzim aktivitesinin sıcaklık direnci	63
Şekil 3.17. Zeytin atığında (%10) <i>E. faecium</i> E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi	63
Şekil 3.18. Zeytin atığında (%10) <i>E. faecium</i> E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin farklı pH da 45°C de bekleme süresi sonunda kalan enzim aktivitesi	64
Şekil 3.19. Zeytin atığında (%10) <i>E. faecium</i> E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin aktivitesine tuzun etkisi	65

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. Lipaz üretim ortamında gelişen kültürlerden elde edilen süpernatant	27
Görsel 2.2. Seri olarak hazırlanan p-nitrophenol-Tris HCl	30
Görsel 2.3. p-nitrophenol- Tris HCl ile hazırlanan 96'lık eliza petrisi	30
Görsel 2.4. Seçilen izolatların lipaz tayin ortamındaki gelişimleri	31
Görsel 3.1. Test bakterilerinin katalaz testi	38
Görsel 3.2. Test bakterilerinin mikroskopik görüntüsü	38
Görsel 3.3. Test bakterilerinden tributrin agarda oluşturduğu zonlar	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

[S]	: Substrat Konsantrasyonu
°C	: Santigrad derece
%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikro Molar
BSA	: Sığır Serum Albumini
Da	: Dalton
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
IU	: Uluslararası enzim Ünitesi
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
M	: Molar
nm	: Nanometre
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
sp.	: Tür
TEMED	: N,N,N',N' - Tetrametiletilendiamin
vd	: Ve diğerleri

1. GİRİŞ

Enzimler, çevre dostu olan protein yapılı biyokatalizörlerdir. Aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu kolaylaştırır ve denge reaksiyonlarının hızlı şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Katalizör olarak bazı kimyasallar görev yapmaktadır. Ancak, enzim kadar basit ve ucuz değildirler. Asitler ve bazlar gibi kimyasal katalizörler, yüksek sermaye yatırımlarına, özel ekipman ve kontrol sistemlerine yol açan yüksek sıcaklık, basınç, asidik veya alkali pH gerektirmektedirler (Aravindan vd., 2007). Ayrıca istenmeyen yan ürünler oluşturabilmektedir. Ürünün geri kazanımında da zorluklar yaşanabilmektedir. Bu nedenle araştırmacılar kimyasal katalizörlerin yerine kullanılabilecek, spesifik, biyolojik olarak parçalanabilen, geri kazanılması kolay ve yeniden kullanılabilir biyomoleküllere yönelmişlerdir. Bu biyolojik katalizörler hem hücre dışı hem de hücre içi enzimleri içerir (Karigar ve Rao, 2011). Endüstriyel öneme sahip önemli bir biyokatalizör, lipaz enzimidir. Lipaz enzimi kimyasallara göre reaksiyonda daha az yan ürün oluşturmaktadır (Ersoy ve Bayşu, 1981; Treichel vd., 2010; Arık, 2012; Balkan, 2013). Bu da enzimin biyoteknolojik amaçla özellikle de gıda, ilaç, deterjan, kozmetik, tekstil, kağıt, enerji ve biyoremediasyon gibi birçok endüstri alanında daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır (Treichel vd., 2010; Arık, 2012; Adrio ve Demain, 2014). Endüstride enzimlerin kullanılma oranı katalize edebileceği farklı dönüşümler nedeniyle giderek artmaktadır. Bu artış ile birlikte enzim üretimi ülkelerin ekonomilerindeki büyüklüğü ve gücü de göstermektedir (Sharma vd., 2011). Bu nedenle, şirketler enzimlerin ürün kalitesi, performansı ve yeniliklerin yapılması için araştırmaları artırarak öne çıkmaya çalışmaktadırlar (Adrio ve Demain, 2014). Sharma vd., (2011)'de endüstride kullanılan enzimlerin çoğunluğunu proteazlar oluştursa da lipazların da ileride en az proteazlar kadar önemli olacağını ileri sürmüşlerdir (Sharma vd., 2011). Lipaz enzimi, doğada yaygın olarak bulunan bir enzim çeşididir (Karlson, 1988; Sharma vd., 2011; Dinçer ve Kıvanç, 2018). Lipazlar, trigliseritleri serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolize eden hidrolaz enzim sınıfına aittir (Sharma Chander ve Kanwar Shamsheer, 2012). Ayrıca esterleştirme, trans-esterifikasyon, hidroliz, asidoliz ve aminoliz gibi farklı reaksiyonları yönetme yeteneğine de sahiptirler (Rajendran vd., 2009). Hidrolazlar, esteraz ve lipaz gibi iki ana sınıftan oluşmaktadır. Esterleri (EC 3.1.1.1) hidrolize eder ve genellikle kısa zincirli yağ asitleri ve lipazlardan oluşan (sadece 3.1.1.3) trigliseritler suda çözünmeyen substratlara karşı aktiftir ve uzun zincirli yağ asitlerini hidrolize ederler. Arayüzey etkisizleştirme özelliği sadece lipazlarla gözlenmiştir. Endüstride kullanılan

lipazların %3'ü alg, %11'i hayvan, %18'i bitki, %22'i fungi, %46'ı bakterilerden elde edilmektedir (Balkan, 2013). En çok mikrobiyal lipazların tercih edilme nedeni ise, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktif olmaları, geniş substrat spesifikliğinin olması, kolay özütlenme ve çok fazla üretim yapabilme kabiliyetleri, kullanım alanlarının fazla olması gibi özelliklerinin bulunmasıdır (Sharma vd., 2001; Gupta vd., 2004; Treichel vd., 2010; Arık, 2012). Ayrıca, bakteri lipazlarının endüstrideki spesifik uygulamaları için tasarlanması, yeni kaynakların tanımlanması ve geliştirilmesine olan ihtiyacı giderek artırmaktadır (Thomson vd., 1999; Ramyasree ve Dutta, 2013; Javed vd., 2018). Özellikle deterjan ve peynir endüstrisinde önemli bir yere sahip olan lipaz enzimi genellikle *Aspergillus oryzae* ile üretilmektedir.

Mikroorganizmalar, lipazları tek başına ya da esteraazlarla beraber üretmektedirler. Gliserol ester hidrolaz veya triaçilgliserol olarak bilinen lipazlar, mono, di, triaçil gliserollerin serbest yağ asitleri ve gliseridlerin hidrolizini katalize ederek, ester bağlarını parçalamaktadırlar (Karlson, 1988; Gupta vd., 2004; Sharma vd., 2011; Javed vd., 2018; Dinçer ve Kıvanç, 2018).

Güvenli bakteriler olarak kabul edilen laktik asit bakterilerinin lipaz ürettiği çeşitli araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Meyers vd., 1996; Yörük ve Güner, 2011). LAB'dan olan *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* da lipolitik ve esterolitik aktivite tespit edilmiştir (Erginkaya vd., 2007). Mazzucotelli vd., (2013)'nin yaptığı çalışmada, tarımsal atıklardan bakteri suşlarının izolasyonu ile hidrolitik bir enzim olan lipaz varlığı saptanmıştır. Burada en yüksek hidrolitik kapasiteyi gösteren suşlar arasında *Lactococcus* cinsleri bulunduğu bildirilmiştir (Mazzucotelli vd., 2013). Esteban-Torres vd., (2015)'in yaptığı çalışmada da *L. plantarum* Lp_3562 'de ilk halotolerant lipaz keşfedilmiştir.

Bu çalışmada daha önce peynirden izole edilen laktik asit bakterilerinde lipaz üretim yeteneklerinin taranması, lipaz üretimi için optimum koşulların araştırılması ve enzim aktivitesine etki eden faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri gram pozitif, katalaz negatif, basil ve kok şeklinde olabilen, sporu olmayan bakterilerdir. Ayrıca, Firmicutes filumuna ait Eubacteriales takımı ve Streptococcaceae ve Lactobacillaceae familyalarının üyelerindendir. *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* en önemli

cinsleridir. Laktik asit bakterileri anaerobik olsalarda aerobik koşullarda da gelişebilmektedirler (Salminen vd., 2004). Laktik asit bakterilerinde İlk sınıflandırmayı ise Orla-Jensen 1919 yılında *Thermobacterium*, *Streptobacterium* ve *Betabacterium* olarak üç taksonomiye ayırarak yapmışlardır (Yörük ve Güner, 2011).

Laktik asit bakterileri termofil veya mezofil olabilen, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilen asit veya alkali tolere edebilen özellik göstermektedirler. Genellikle pH 4-4,5’da gelişmelerde daha düşük veya 9,6 gibi daha yüksek pH da gelişebilmektedirler (Holt vd., 2000). Karbonhidrat metabolizmasına göre laktik asit bakterileri homofermantatif ve heterofermantatif olarak ayrılabilir. Fermentasyon sonucunda homofermantatiflerde oluşan ana ürün laktik asittir. Heterofermantatiflerde ise laktik asit yanında etanol ve asetik asit gibi bileşikler oluşur (Florou-Paneri vd., 2013). Bu bakteriler sitokromdan yoksundur ve elektron taşıma sistemleri bulunmadığından enerji üretimi substrat düzeyinde fosforilasyon ile sağlanmaktadır.

ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından güvenli bakteriler olarak kabul edilen laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde yoğurt, kefir, peynir tereyağı gibi fermente ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sağlıklı, kaliteli ve standart bir ürün elde edebilmek için, starter kültür olarak LAB’ın kullanılması aynı zamanda istenilmeyen mikroorganizmaların gelişmesini engellemektedir. LAB laktik asit üreterek gıdada bozulmaya sebep olacak mikroorganizmaları inhibe etmektedir. LAB, et ve süt ürünleri ile sebzelerin fermentasyonu ve gıda maddelerinin korunmasının yanı sıra insan sağlığına yararları bakımından da önem taşımaktadır (Yörük ve Güner; 2011; Cano-Garrido vd., 2015). Fermente süt ve et ürünlerinde organoleptik özelliklerinin geliştirilmesi için bazı laktik asit bakterileri ile *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* probiyotik ve starter kültür olarak kullanılmaktadır (Erginkaya vd., 2007). Ancak, gıdalardan izole edilen *Enterococcus* cinsi bazı bakteriler antibiyotiğe dirençli olmaktadır. Bu nedenle, bazı araştırmacılar gıda üretiminde GRAS kabul etmemektedir (Erginkaya vd., 2007). Gıda güvenliğini sağlamak için ise *Enterococcus* cinsi suşların antibiyotik dirençliliğı, direnç transferi ve virulans gibi özellikleri kontrol edilmelidir (Erginkaya vd., 2007). Ancak, bazı türleri patojen özellik gösterdiği için bazı hastalıklara sebep olmaktadır (Yörük ve Güner; 2011).

1.2. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Herhangi bir değişime uğramadan canlı sistemlerde oluşan kimyasal reaksiyonların hızlarını artırır. İlk kez 1700'lü yılların sonlarına doğru mide salgısıyla etin sindirilmesi ile ilgili çalışmalarda tanımlanmıştır. 1800'lü yılların başlarında çeşitli bitki özleri ve tükrükte nişastanın şekerleştiği gösterilmiştir. Frederick W. Küche bu molekülleri Yunanca da enzyμος kökünden gelen ve maya içinde anlamına gelen enzim olarak tanımlamıştır.

Enzimlerin yapısının bilinmesi kullanıldığı alanlarda büyük bir öneme sahiptir. Enzimler protein olduğundan, proteinlerin yapısını bilmek önem taşımaktadır (Treichel vd., 2010). Ferreira-Dias vd., (2013)'ün yaptığı çalışmada enzimlerin konformasyonunda hidrojen bağlarının oluşması için su kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Enzimler genellikle apo enzim adı verilen protein kısmı ve kofaktör kısmı olmak üzere 2 kısımdan meydana gelmişlerdir. Enzimlerin katalizlediği bileşiklere ise "substrat" adı verilmektedir. Enzimler üç boyutlu aktif bölgesine uygun olan substratlar ile tepkimeye girmektedirler (Akkaya ve Pazarlıoğlu, 2012).

Enzimlerin adlandırılması substratlarına ya da katalize ettikleri reaksiyona göre yapılmaktadır. Genel olarak enzimlerin etki ettikleri substratın sonuna -az eki getirilerek adlandırma yapılmaktadır. Lipaz enzimi ise, lipitlere etki ettiği için bu şekilde adlandırılmıştır (Çakar, 2016). 1981'de Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) enzimleri reaksiyon mekanizmalarına göre 6'a ayırmışlardır. Bunlar; oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır (Karlson, 1988).

Enzimler gıda, tıp, kozmetik, eczacılık, tekstil gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Enzimler mikroorganizmalardan, bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilmektedir. Günümüzde insanların doğaya yönelişi nedeni ile mikroorganizmalar gittikçe önem kazanmaya başlamıştır. Bu durum bilim insanlarının mikrobiyal biyoteknoloji alanında daha fazla çalışma yapmaya yönlendirmiştir.

1.2.1. Mikrobiyal enzimler

Endüstride geniş bir kullanım alanı olan enzimler çoğunlukla mikroorganizma kaynaklıdır. Bunların %75'i ise hidrolitik enzimlerden oluşmaktadır. Mikroorganizma kaynaklı enzimler, hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere göre katalitik aktiviteleri daha yüksek ve daha dayanıklıdır. Birçoğunun ekstrasellüler enzim olması ucuz ve

daha fazla üretim yapılabilmesini sağlar (Sharma vd., 2001; Kıran vd., 2006). Bu da mikroorganizma kaynaklı enzimlerin daha çok tercih edilmesine neden olmuştur (Kıran vd., 2006). Mikroorganizmalar arasında en fazla funguslardan ve bakterilerden enzim üretimi yapılmaktadır (Çakar, 2016).

Ticari önemi olan enzimlerin yaklaşık %75'i mikrobiyal kaynaklı ve hidrolazlar sınıfında bulunmaktadır (Bkz. Tablo 1.1). Hidrolaz substrat spesifitesi geniş olan bir enzim sınıfıdır. Peptidleri, amidleri, halojenürleri, esterleri ve trigliseritleri hidrolize etmektedirler. Hidrolazlar, lipazlar (EC 3.1.1.3, triağılglicerol hidrolazlar) ve esterazlar (EC 3.1.1.1, karboksilester hidrolazlar) gibi endüstride önemli yeri olan biyokatalizörlerdir. Ayrıca, lipolitik enzimler (lipazlar ve esterazlar), hem hidroliz hem de sentez reaksiyonlarını katalize etmektedirler (Sharma vd., 2001).

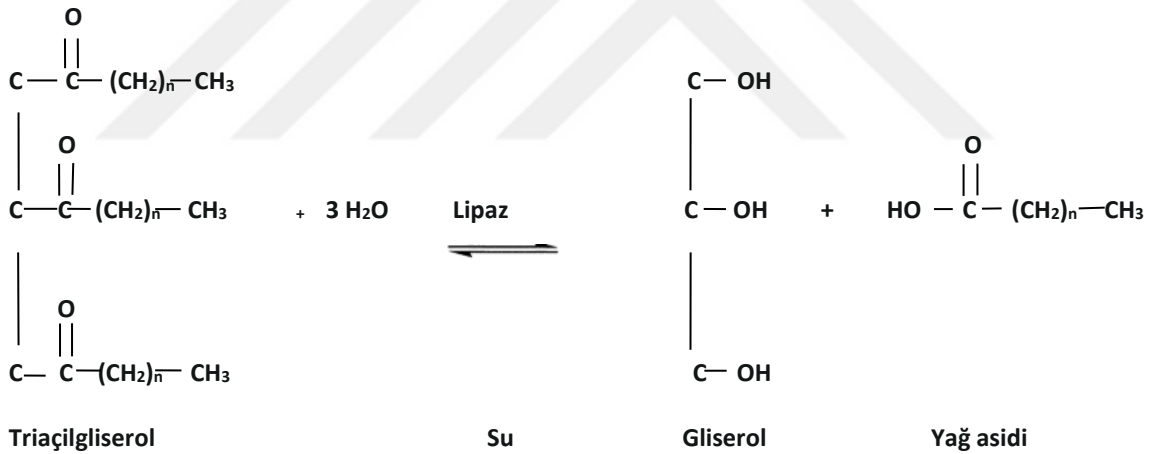
Tablo.1.1. Mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulamaları (Fernandes ve Carvalho, 2017)

Sınıfı	Enzimler	Uygulama
Hidrolazlar	Amilaz	Nişasta kaynaklı ürünlerin üretimi, ekmek ve meyve sularının işlenmesi
	Glukanaz	Tahıl hücre duvarlarının parçalanması ve bira üretimi
	Glukoamilaz	Nişastanın sakrifikasyonu ve şeker şuruplarının üretimi
	Glukozidaz (β glukozidaz)	β -glikozidik bağın hidrolizi ve şarap üretiminde aroma bileşiklerinin salınımı
	İnvertaz	Sukroz hidrolizi, invert şeker şurubu üretimi
	Laktaz	Laktoz hidrolizi (Laktoz içermeyen süt), peynir altı suyu hidrolizi, galaktooligosakkaritlerin sentezi
	Lipaz	Peynir aroması, hamur hazırlama için emülsifikasyon, hayvanlarda lipit sindirimine destek, aromatik moleküllerin sentezi
	Proteaz (örneğin, chymosin, papain)	Protein hidrolizi, süt pıhtılaşması, düşük alerjenik bebek maması, sindirimi artırma, süt ve peynirde lezzet artırmada, bira yapımında bulanıklığın önlenmesi
	Pektinaz	Viskozitenin azaltılması, meyve sularının artırılması

1.3. Lipaz Enzimi ve Yapısı

Lipazlar (triacilgliserol, açilhidrolazlar, E.C.3.1.1.3), yağların gliserol ve yağ asidine parçalanmasını sağlayan hidrolazlardır. Lipaz enzimi suyun varlığında veya organik çözücülerde farklı substratların hidrolizini ya da sentezini katalize eden önemli bir biyokatalizör ve hidrolazlar sınıfında bulunan bir serin hidrolazdır (Karlson, 1988; Gupta vd., 2004; Rahman ve Basri, 2006; Sharma vd., 2011; Sarmah vd., 2018). Lipazlar, esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, yan ürün oluşumunu önlemeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar (Sharma vd., 2001).

Lipaz enzimi vücutta mide, pankreas ve ince bağırsakta salgılanarak yağların hidrolizini sağlamaktadır. Safra kesesi de yağları ve lipitleri sindirmeye yardım etmektedir (Bkz.Şekil 1.1). Böylece, nötr yağ veya fosfolipitteki gliserolden yağ asidini parçalayan veya yağı serbest bırakan lipolitik enzimlerden biri oluşmaktadır (Ray, 2012).



Şekil 1.1. Lipazın hidrolitik ve sentetik etkisi [2] (Rahman ve Basri, 2006)

Lipazların ana kaynakları, yapısı, özellikleri, özgüllükleri ve arayüzey aktiviteleri önemlidir (Treichel vd., 2010). Geniş sıcaklık ve pH aralığındaki aktivitesi, geniş substrat spektrumunu kullanma yetenekleri, daha iyi stabilite, seçicilik, substrat spesifikliğı ve kemo, regio ve enantioselektiflik gibi özellikler gösteren bir enzimdir (Gupta vd., 2004; Rahman ve Basri, 2006; Sharma vd., 2011; Sarmah vd., 2018).

Lipazlar sulu çevrelerde triaçilgliserollerdeki karboksi ester yağları üzerine etki ederler. Yağ asidi ve gliserolü açığa çıkarırlar. Çok az su bulunduğunda esterifikasyona, alkolizise ve asidolizise yol açan reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptirler (Bkz. Tablo 1.2). En önemli özellikleri spesifik olmalarıdır. Enzimin spesifikliğı enzimin moleküler özelliğine ve substrata bağlı olarak değışir. Bu spesifiklik interesterifikasyonun kimyasal interspesifikasyondan ayrılmasını sağlar. Spesifitelerine göre lipazlar 3'e ayrılmaktadır.1) Spesifik olmayan lipazlar, 2) Stereospesifiteye sahip lipazlar (izomer seçicilik), 3) Yağ asiti spesifitesine sahip lipazlar (Pandey vd., 1999; Marangoni, 2002; Javed vd., 2018).

Tablo 1.2. Lipaz enziminin katalize ettiğı reaksiyonlar (Rahman ve Basri, 2006)

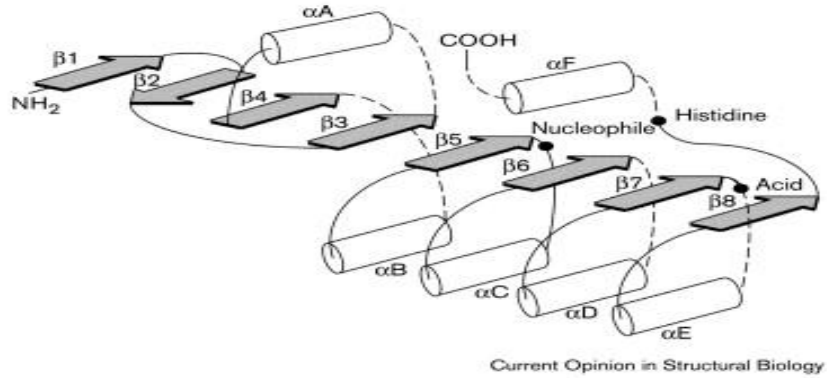
HİDROLİZ $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \text{H}_2\text{O}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{OH} \end{array} + \text{R}_2 - \text{OH}$
ESTER SENTEZİ $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{OH} \end{array} + \text{R}_2 - \text{OH}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \text{H}_2\text{O}$
TRANSESTERLESME Alkoliz $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \text{R}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_3 \end{array} + \text{R}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$
İnteresterifikasyon $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_3 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_4 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_3 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array}$
Asidoliz $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_3 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_3 - \text{C} - \text{O} - \text{R}_2 \end{array} + \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$

Spesifik olmayan lipazlar, trigliseriti serbest yağ asitlerine katalize eder ve ara ürün olarak mono ve di-gliseridleri olan gliserol ve yağ asidini substratın herhangi bir pozisyonundan çıkarır. Mono ve digliseritler, trigliseritlerden daha hızlı hidrolize edilir (Ribeiro vd., 2011; Kapoor ve Gupta, 2012). Bu lipazlar, yağ asitlerini trigliseritlerin 1 ve 3 pozisyonlarından serbest bırakır ve ikincil pozisyonlarda ester bağlarını hidrolize edemezler. Trigliseritlerin 1,3-spesifik lipazlar ile digliseritlerin hidrolizi mono gliseridlere göre çok daha hızlıdır (Ribeiro vd., 2011; Kapoor ve Gupta, 2012). Üçüncü

bir lipaz grubu, yağ asidi seçiciliği ve katalizörleri gösterir. C-9 ve C-10 arasında cis pozisyonunda çift bağlı uzun zincirli yağ asitlerine sahip esterlerin hidrolizini sağlarlar (Ribeiro vd., 2011; Kapoor ve Gupta, 2012).

1.3.1. Lipaz enziminin yapısı

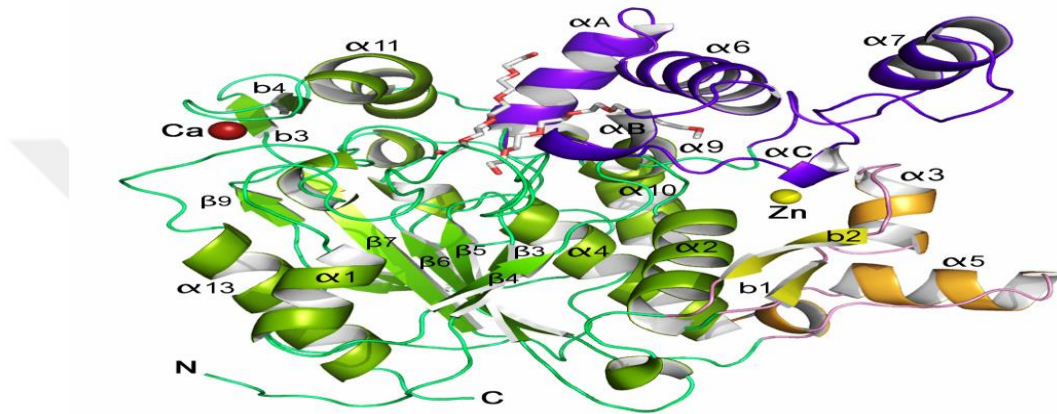
Lipazlar birbirine peptid bağları ile bağlanmış amino asitlerden oluşan kompleks proteinlerdir. Lipaz, Şekil 1.2' de gösterildiği gibi her iki tarafta α sarmalları (Nardini ve Dijkstra, 1999) ile çevrili merkezi, sekiz iplikçikli bir β tabaka içeren α/β hidrolaz katını içerir. Yaprak sayısı her organizmada farklıdır. Her bir α/β hidrolaz enzimi, nükleofilik Serine (Ser), Histidin (His) ve Aspartat (Asp) / Glutamat (Glu) içeren katalitik triad içerir; burada Serinin nükleofil, Histidin, bazik, aspartat veya glutamat, asidik özelliktedir. Serin korunmuş bir Gly-X-Ser-X-Gly pentapeptidinde bulunur. Pentapeptit ayrıca organizmadan organizmaya, bazı mikroorganizmalarda alanin ikame edilmiş glisini içerir. Nükleofilik serin bir β -bandı ile α -heliksinin arasında yer alırken histidin, aspartik asit ve glutamik asit ise serinin diğer yanlarında yer alır (Bkz.Şekil 1.2). Katalitik bölgeyi içeren amino asitler çoğu lipaz yapısında korunur (Zaidi vd., 1995).



Şekil 1.2. Katalitik α/β hidrolaz katının sekonder yapı diyagramı (α heliksler ve β iplikler sırasıyla beyaz silindirler ve gri oklarla gösterilmiştir. Katalitik triadın yeri siyah noktalar ile gösterilmiştir. Kesik çizgiler, olası yerleştirmelerin yerini göstermektedir.) (Nardini ve Dijkstra, 1999)

Serin amino asidinin katalitik aktivite ile yakın ilişkisi vardır. Heliks yapıdaki peptit kısımlar dış kısımda yer alır. Lipazlar C ve N olmak üzere 2 kısma ayrılmış 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). Lipazlar, bir veya iki α heliks içeren kapak benzeri yapıya ulaşır. Lipazın bu özelliği, yağ ve su arasındaki bir arayüzde olduğunda konformasyonel değişime yol açar (Jensen vd., 2002). Kapağın açık veya kapalı pozisyonu, enzimin sırasıyla aktif veya inaktif konformasyonunu belirler (Brocca vd., 2003). Enzimin açık formu, substrata bağlanma erişilebilirliğini verir (Bkz. Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Lipaz enziminin açık yapısı ((α / β) hidrolaz çekirdek, yeşil; kapak bölgesi (kalıntı 169-239), mor; ve Çinko iyonu ekstra etki alanı, sarı İkincil yapı elemanları etiketlenmiştir. Metal iyonları (Zn ++, sarı; Ca ++ koyu kırmızı) küreleri. Aktif bölgedeki iki Triton X-100 deterjan molekülü çubuk halindedir.) (Carrasco-Lopez vd., 2009)

1.3.2. Hayvansal lipazlar

Hayvansal lipazlar 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; doku lipazları, sindirim sistemi lipazları ve süt lipazlarıdır. Doku lipazları; lipoprotein lipazları, adipoz dokusu lipazları ve karaciğer lipazlarıdır. Sindirim sistemi lipazları ise pankreas lipazları ve ince bağırsak lipazlarından oluşmaktadırlar (Çakar, 2016). Genellikle daha fazla lipaz enzimi elde edilen pankreas tercih edilmektedir (Mukherjee ve Hills, 1994). Ancak, hücrenin veya hücre duvarının parçalanması için ekstra hücre parçalayıcılar gerekir. Bu zor işlemler yapılırken enzimin yapısı da zarar görebilmektedir (Taipa vd., 1992).

1.3.3. Bitkisel lipazlar

Bitkisel lipazlar, mikrobiyal lipazlardan sonra endüstride en fazla tercih edilen enzimler arasındadır (Çakar, 2016). Bitkilerin katman doku, kabuk ve köklerinde bulunurlar. Lipazlar en çok yağlı tohumlarda bulunurken, tahıl tanelerinde de bulunmaktadır (Mukherjee ve Hills, 1994). Yağ miktarı fazla olan zeytin, ayçiçeği, fındık ve kene otu tohumu (*Ricinus communis*), kolza tohumu (*Brassica napus*) gibi bitkilerde bulunmaktadır (Pandey vd., 1999; Arpigny ve Jaeger, 1999). Ayrıca, buğday, yulaf, mısır gibi bitkilerde de lipazlar üretilmektedir. Ancak, lipaz üretimi için bitkisel dokulardan hücre ya da hücre duvarını parçalama işlemi zordur. Bu işlemler enzimin yapısının bozulmasına da neden olabilmektedirler (Taipa vd., 1992).

1.3.4. Mikrobiyal lipazlar

Lipidleri yıkıma uğratan lipazlar, doğada yaygın olarak bitki, hayvan, bakteri, fungi ve mayalardan izole edilebilmektedir (Sharma vd., 2001; Treichel vd., 2010; Ray, 2012). Ancak, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktif oldukları için çok dayanıklı olmaları, geniş substrat spesifikliğinin olması, kolay özütleme ve çok fazla üretim yapabilme kabiliyetleri, kullanım alanlarının fazla olması gibi özellikleri nedeniyle ticari kullanımlarda en çok tercih edilen mikrobiyal lipazlar olmaktadır (Sharma vd., 2001; Gupta vd., 2004; Treichel vd., 2010; Arık, 2012). Bilinen en iyi lipaz üreticileri *Pseudomonas spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus faecalis* gibi bakteriler ve *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Aspergillus sp.* gibi funguslardır (Çakar, 2016). Örneğin, gıda işleme, organik sentez, deterjan formülasyonu ve yağ üretimi gibi endüstriyel uygulamalarda, geniş substrat spesifikliğinin olması sebebiyle mikrobiyal lipazlar kullanılmaktadır (Uppada vd., 2017). Mikrobiyal lipazlar endüstriyel düzeyde en çok üretilen enzimlerden biridir. (Gupta vd., 2004; Ray, 2012; Javed vd., 2018). Özellikle de bakteri lipazları ticari öneminden dolayı hakkında yapılan araştırma sayısını zamanla artırmaktadır (Treichel vd., 2010; Ray, 2012; Javed vd., 2018).

İmmobilize *Lactobacillus plantarum* tarafından elde edilen lipaz, sağlık alanında kullanılabilen, ette ve doğal aroma endüstrisinde sorun olan 2,3,4-hidroksibenzil asetat ve triazol ester gibi farklı kısa zincirli yağ asidi esterlerini sentezlemektedir. Ayrıca, 4-hidroksibenzil asetat kozmetik ürünlerde de kullanılabilir (Uppada vd., 2017).

Lopes vd., (2002) çalışmalarında ise *Lactobacillus plantarum* suşu (DSMZ 12028) ile hücre dışı lipaz karakterizasyonu ve saflaştırması yapılmıştır. Uppada vd., (2017) çalışmada immobilize *L. plantarum* tarafından lipaz elde edilmiştir (Bkz. Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Farklı mikroorganizmalarda lipaz oluşumu (Javed vd 2018)

Mikroorganizmalar	Kaynak
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	Khan vd., 1967
<i>Bacillus cereus</i>	Ananthi vd., 2013
<i>Bacillus licheniformis</i> VSG1	Sangeetha vd., 2010
<i>Bacillus smithii</i> BTMS 11	Ephraim vd., 2014
<i>Bacillus stearothermophilus</i> MTCC 37	Sabat vd., 2012
<i>Bacillus pumilus</i> RK-31	Kumar vd., 2012
<i>Candida Antarctica</i> ZJB09193	Liu vd., 2012
<i>Candida rugosa</i>	Pereira vd., 2002
<i>Enterococcus faecium</i> MTCC 5695	Ramakrishnan vd., 2013
<i>Enterococcus durans</i>	Ramakrishnan vd., 2012
	Salihu ve Alam, 2015
<i>Enterococcus faecium</i>	Ramakrishnan vd., 2016
<i>Lactobacillus brevis</i>	Chander vd., 1973
<i>Lactococcus lactis</i>	Uppada vd., 2012
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lopes vd., 1999
<i>Lactococcus chungangensis</i>	Konkit vd., 2016
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	El-Sawah vd., 1995
<i>Lactococcus heleveticus</i>	Rashmi ve Gayathri, 2014
<i>Staphylococcus sp</i>	Kumar vd., 2012a
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Sugihara vd., 1991
<i>Pediococcus acidilactici</i> MTCC 11361	Ramakrishnan vd., 2013
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Deive vd., 2003
<i>Aspergillus niger</i>	Falony vd., 2006
<i>Aspergillus awamori</i>	Basheer vd., 2011
<i>Aspergillus fumigatus</i> MTCC 9657	Rajan vd., 2011
<i>Fusarium solani</i> FS-1	Maia vd., 2001
<i>Bacidiobolus</i>	Okafor ve Gugnani, 1990
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Li vd., 2009

1.3.4.1. *Bakteriyel lipazdaki çeşitlilik*

Lipazlarda, aktif bölge serin kalıntısını saran Gly-X-Ser-X-Gly pentapeptit dizisi tek ortak olan bölümdür. Lipazlar hem biyokimyasal hem de moleküler olarak birbirinden farklı özellik göstermektedirler. Çalışmalarda, lipaz proteinlerinin dizilerindeki yakınlığa bakıldığında başka alt kümeler gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada alt kümeler, lipaz protein dizilerinin yakınlığı ve lipaz üreten bakteriler arasında önemli bir çeşitlilik olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çeşitlilik hakkındaki bilgi filogenetik analiz ve GxSxG motifi çevresindeki kalıntıların karşılaştırılması ile elde edilmektedir. Ancak, GxSxG motifi etrafındaki kalıntıların analizi farklı lipaz üreten bakterilerde çeşitlilik göstermektedir. Ayrıca, çalışmalar farklı bakteriyel lipazları dizilerinin karşılaştırılmasının değişken sonuçlarının olduğunu ortaya koymuştur. Aminoasit sekanslarına göre ise farklı bakteri lipazlarının yakınlığı hakkında fikir verdiği görülmektedir. Yukarıda verilen bilgiler, çeşitli grupların lipaz genlerini incelemek ve yeni tanımlanmış lipazların sınıflandırılmasında probe veya primerlerin tasarımı için kullanılabilir (Javed vd., 2018).

1.3.4.2. *Bakteriyel lipaz üretimi*

Bakteri lipazlarının, zor koşullardaki endüstriyel ortamlara dayanıklı olmaları lipazların üretimi ve karakterizasyonu için genellikle bakteri kaynaklarının kullanılmasını sağlamıştır. Bu nedenle, araştırmacılar, bakteri suşlarından en fazla lipaz üretmek için izolasyon, tarama ve optimizasyon konusunda çalışmaktadırlar. Yapılan bu çalışmalarla çok yönlü lipaz uygulamaları geliştirilmiştir (Javed vd., 2018). Özellikle de doğal enzimlerde yapılan optimizasyon maliyetin düşürülmesini de sağlamaktadır (Ferreira-Dias vd., 2013; Javed vd., 2018). Bu amaçla, *L. plantarum* suşu (DSMZ 12028)'nin optimizasyonu için Lopes vd., (2002) yaptığı çalışmada, Proteinaz K, NaCl, Ca⁺², EDTA, BSA, gliserol, Mn⁺² ve Mg⁺² kullanılmıştır. Çalışmada tripsinin, lipolitik aktiviteyi tamamen inhibe ettiği, yalnızca Mn²⁺ ve Mg²⁺'un lipazı uyardığı, protein içeriğini arttırarak enzimi stabilize etmek için kullanılan BSA ve EDTA ilave edildiğinde ise aktivitenin azaldığı diğer ilave edilenlerin de etkilemediği görülmüştür. Ayrıca, çalışmada Pepstatin A, PMSF ve EDTA gibi proteaz inhibitörleri varlığında *L. plantarumun* büyümesiyle yapılan in vivo deneylerde lipaz aktivitesinin azaldığı, bazı proteazların ise lipolitik aktivitenin korunmasını sağladığını belirtmişlerdir.

Optimizasyon çalışması için; pH, sıcaklık, çalkalama, karbon ve organik azot kaynakları, tuz konsantrasyonu ile bakteri büyümesini düzenleyerek, lipaz üretimi artırılabilir (Sharma, vd., 2001; Gupta vd., 2004). Esteban-Torres vd., (2015)'nın yaptığı çalışma ile laktik asit bakterisi olan *L. plantarum*'dan üretilen Lp_3562 lipazının %25 NaCl konsantrasyonunda stabil olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmaya göre, Lp_3562'nin gıda fermantasyon koşullarında yeterli aktiviteye sahip olacağı öngörülmektedir. Ayrıca, Ramyasree ve Dutta, (2013) çalışmasında enzim aktivitesindeki artış ile biyokütledeki kuru ağırlığın da arttığını göstermektedirler.

Hücre dışı enzimlerin ticari üretimi prensip olarak çok basittir, bu da bir mikroorganizmanın yetiştirilmesini ve daha sonra enzimin geri kazanılmasını içerir. Bu, ucuz bir ortamda büyüyen ve kısa sürede yüksek enzim verimi üreten bir organizmanın kullanılmasını gerektirir. Kabul edilebilir bir görünüme sahip ve güvenli bir şekilde kullanılabilecek stabil bir ürüne yol açan enzimin basit ve ucuz bir şekilde geri kazanılması da önemlidir. Bu hedefler, şekil değiştirme özelliklerinin ve işlem parametrelerinin birleştirilmiş optimizasyonu ile yerine getirilir. Özellikle uygun mutantların geliştirilmesiyle optimizasyonu, genellikle soruna ucuz ve kalıcı bir çözüm sunar.

Gıdalarda ve diğer biyoteknolojik sistemlerdeki mikrobiyal lipazların büyük başarısı, mikroorganizmaların geniş biyokimyasal çeşitliliğine, organizmaların genetik manipülasyonuna ve enzim üretimi ve saflaştırılması için geliştirilmiş tekniklere bağlanabilir.

Mikrobiyal enzimler ayrıca, enzim kullanım maliyeti, optimal koşullarda aktivite, enzimin güvenliği hayvan ve bitki lipazlarına göre saflık ve kararlılık gibi istenen özelliklere daha uygundur.

1.4. Lipazların Kullanım Alanları

Biyoteknoloji alanında da ticari olarak önemi giderek artan lipaz enziminin çevre dostu olması ve ürünlerin besinsel özellikleri nedeniyle kimyasal katalizörlere göre reaksiyonları katalize etmek için daha çok tercih edildiği görülmektedir (Ray, 2012; Ferreira-Dias vd., 2013). Özellikle gıda endüstrisinde, biyokatalizör olarak kullanılan lipazlar yağ asidi esterleri ve yağ asidi türevleri, aroma esterleri, antioksidanlar ve yapılı

lipidlerin üretimi için avantaj sağlamaktadır (Sharma vd., 2011). Kağıt hamuru, kağıt, lezzet, eczacılık, biyoyakıt, deri, kozmetik, deterjan ve kimya gibi farklı endüstrilerde de kullanılmaktadır (Bkz. Tablo 1.4) (Treichel vd., 2010; Ray, 2012; Javed vd., 2018).

Tablo 1.4. Mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları (Vulfson, 1994; Gül, 2013)

Endüstri	Etki	Ürün veya Uygulama
Süt ürünleri	Sütün hidrolizi, yağ, peynir olgunlaşması, tereyağının modifikasyonu	Peynir ve tereyağı aromasının geliştirilmesi
Et ve balık	Lezzet artırma	Et ve balık ürünlerinde yağın uzaklaştırılması
Unlu mamüller	Lezzet artırma	Raf ömrünün uzaması
İçecekler	Aroma geliştirme	Şarap ve benzeri alkollü içecekler
Soslar	Kalitenin artırılması	Mayonez vb. soslar
Sağlıklı gıdalar	Transesterifikasyon	Sağlıklı gıdalar
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon; hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol, mono ve digliseritler
Deterjanlar	Yağların hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin çıkarılması
Tarımsal kimyasallar	Esterifikasyon	Fenoksipropionat gibi herbisitler
Kimyasallar	Enantioselektiflik, sentez	Kiral yapı taşları, kimyasallar
Farmasötikler	Alkollerin hidrolizi	Herbisitlerin üretiminde kullanılan ara ürünlerin üretimi
Kozmetik	Esterifikasyon	Deri ve güneş kremleri, güneş yağları
Deri	Hidroliz	Deri ürünler
Kâğıt	Hidroliz	Kâğıt kalitesinin artırılması
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
Petrol Endüstrisi	Transesterifikasyon	Biyodizel üretimi
Kirlilik kontrolü	Hidroliz ve yağların transesterifikasyonu	Zararlı suşların uzaklaştırılması ve atık yağların hidrolizi

1.4.1. Biyodizel üretiminde lipazlar

Biyodizel, ithal fosil yakıtların maliyetini azaltan endüstriyel kalkınma ve ulaşım için çok önemli çevre dostu olan yenilenebilir enerji kaynağıdır (Boonmahome ve Mongkolthanaruk, 2013). Kimyasalların veya enzimin katalizlediği yağların transesterifikasyonu ile biyodizel üretilmektedir (Karmee vd., 2015; Çakar, 2016). Biyodizel üretiminde, kimyasal katalizör yerine, enzim katalizörlerinin kullanılması hem maliyetin düşürülmesini hemde çevre dostu bir ürün elde edilmesini sağlamaktadır (Ribeiro, vd., 2011). Boonmahome ve Mongkolthanaruk, (2013)'e göre de biyodizel üretiminde lipaz enzimi kullanılarak karakterize edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, biyodizelin maliyetini azaltmak için atık yemeklik yağ da kullanılmaktadır (Karmee vd., 2015).

Biyodizel üretiminde lipazların potansiyel kullanımı *Candida antartika* (Novozym 435) ve *Photobacterium lipolyticum* (M37) lipazları ile yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada ortaya konmuştur (Dalmaso vd., 2015). Araştırmacılar M37'nin biyodizel üretimi için en uygun tür olduğunu bildirmişlerdir. Biyodizel üretiminde *Proteus mirabilis*'in ürettiği metil esterin ümit verdiği rapor edilmiştir (Korman vd., 2013). Hurmadan biyodizel üretiminde *Ralstonia* sp.'den izole edilmiş ve saflaştırılmış lipaz CS274 başarı ile kullanılmıştır (Wang vd., 2014). Bu konudaki çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir.

1.4.2. Deterjan endüstrisinde lipazlar

Deterjanların kimyasal içerikleri çevre kirliliğine neden olmakta ve aynı zamanda canlılara da zarar vermektedir. Bu nedenle organik çözücülerde yüksek stabilite gösteren enzimler, zararlı bileşenlerin yerine kullanılarak çevreye verilecek zararı önlemektedir (Gupta vd., 2004; Javed vd., 2018). Ayrıca, düşük sıcaklıklarda çalışmaları nedeniyle enerji tasarrufu da sağlamaktadırlar (Hasan vd., 2006). Javed vd., (2018)'in araştırmasına göre, şirketlerin çoğu şu anda enzim bazlı deterjan üretmektedirler. Ayrıca, deterjanlarda enzimlerin bulunması, yağ artıklarının giderilmesi ve tıkanmış kanalizasyonların temizlenmesi gibi sorunları çözmek amacıyla ev tipi bulaşık makinelerine de lipaz enziminin eklenmesi endüstriyel enzim kullanımını daha da önemli hale getirmektedir (Ray, 2012; Adrio ve Demain, 2014). Su eklendiğinde kimyasal bağların parçalanmasını katalize eden lipazlar deterjanlara ilave edilmektedir (Sharma vd., 2001; Adrio ve

Demain, 2014). Lipaz içerikli deterjanlar, lipit moleküllerini kirli substratlardan parçalayarak, temizlenmiş kumaşın uzun ömürlü olmasını sağlamaktadır (Javed vd., 2018). Lipazlar, trigliseritleri mono-, digliseritler ile gliserol ve serbest yağ asitlerine dönüştürmektedir. Elde edilen ürünler yağa göre daha kolay suda çözünerek uzaklaştırılmaktadır (Hasan vd., 2006). Deterjanlarda kullanılan ilk ticari lipaz, *Thermomyces lanuginosus*'tan izole edilmiştir (Sharma vd., 2001). *Staphylococcus arlettae*'dan izole edilen lipaz JPBW-1'in yağ lekelerini giderdiği belirtilerek çamaşır deterjanı formülasyonlarında bir katkı maddesi olabileceği bildirilmiştir (Chauhan vd., 2013). Benzer şekilde *Staphylococcus* sp. tarafından üretilen alkali lipaz ESW iyonik olmayan ve anyonik yüzey aktif cisimlere karşı aşırı stabilite gösterdiği için deterjan formülasyonlarında kullanılabileceği belirtilmiştir (Cherif vd., 2011). Ramakrishnan vd., (2016)'e göre laktik asit bakterisi *Enterococcus faecium* MTCC5695 (MTCC5695)'in lipazı alkalın olduğu için deterjan endüstrisinde kullanılabilmektedir.

1.4.3. Gıda endüstrisinde lipazlar

Mikroorganizma kaynaklı hidrolitik enzim olan lipazlar, gıda, süt ürünleri, alkollü içecekler, sütlü çikolata gibi ürünlerdeki hidrolitik uygulama ile lezzetin artırılmasını sağlayarak diyet gıda üretimi, et teknolojisi ve sosislerin işlenmesi gibi gıda endüstrilerinde ticari olarak büyük bir öneme sahiptir (Treichel vd., 2010). Ayrıca, et, meyveler, sebzeler gibi gıdalarda lezzet artırıcı olarakta kullanılmaktadır (Çakar, 2016).

Gıda üretiminde LAB'nin lipolitik aktivitesi ile ilgili geniş araştırmalar yapılmıştır. Gıda endüstrisi gibi çeşitli uygulamalarda da önemli bir yeri olan lipazlar, çeşitli reaksiyonlar göstermektedir. Lipazlar hücre üzerinde veya hücrelerin tümünde ortaya çıkan, LAB'nin lipolitik aktivitesi pastırmanın tat ve dokusunu etkileyebilmektedir. Burada lipolitik aktivite sorunlarını çözerek lipolitik olarak değerlendirilmiştir. Tespit edilen lipolitik aktiviteler, gıda endüstrisinde yeni gelişmeler ve avantajlar yaratabilir. Araştırmalarda pastırmadan izole edilen LAB'nin lipolitik aktivitelerini tespit ederek bunların endüstride kullanılabileceğini öngörmüştür. Laktik asit bakteri lipazları gıdalarda özellikle de et ürünlerinde lezzet artırmaya katkıda bulunabilmektedir. Bu nedenle gıda üretiminde LAB'nin lipolitik aktivitesi ile ilgili daha çok araştırma yapılmıştır (Dinçer ve Kıvanç, 2018). Lopes vd., (2002) fermente sosisten izole edilmiş laktobasillerdeki lipaz aktivitesini tespit etmiştir.

Gıda sınıfı bir mikroorganizmadan gelen *Lactobacillus* lipazının özellikleri, gıda endüstrisinde lipaz kullanımında bazı gelişmeler ve avantajlar sağlayabileceği için çok büyük bir önem taşıyabilir (Lopes vd., 2002).

1.4.4. Kağıt endüstrisi

Kağıt hamuru ve kağıt yapımı için, trigliseritler ve mumlar sorun oluşturmaktadır. Kağıt yapımında, bu maddelerin kağıt hamurundan uzaklaştırılması için lipazlar kullanılmaktadır (Arpigny ve Jaeger, 1999; Sharma vd., 2001).

1.4.5. Yağ endüstrisi

Lipazlar doğada düşük su seviyesinde esterifikasyon reaksiyonunu katalize ederek ester bağlarını parçalamaktadır. Yağ kimya endüstrisinde hidroliz, esterifikasyon, asidoliz, alkoliz ve aminoliz sırasında sıcaklığın stabil olması için lipazlar kullanılmaktadır.

Lipaz enzimi kullanılarak yapılarındaki farklılık nedeniyle daha az değeri olan yağlar daha değerli ve istenilen özelliklere sahip ürünlere dönüştürülmektedir (Castro vd., 2004; Ray, 2012). Ayrıca, hidroliz yaparak toplu yağ asidi üretiminden dolayı endüstride büyük bir önemi de bulunmaktadır (Ray, 2012).

1.4.6. Çevre kirliliğinin giderilmesinde lipazlar

Yağ dökülmelerinde, yağla kirlenmiş suların biyolojik olarak temizlenmesinde *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Carica papaya*'nın lipazı potansiyel bir kaynaktır. Yağ dökülmelerinde, yağlarda ve yağla kirlenmiş su kütlelerinin temizlenmesinde katkısı olan ve bu sayede biyolojik su temizlemesine yardımcı olan, yağın kirlenmesini önleyen lipaz için potansiyel kaynakları olduğu bilinmektedir (Banat, 1995). Lipazlar ayrıca farklı endüstriyel ve belediye atıklarının biyolojik olarak giderilmesinde de kullanılmaktadır (Shafqat vd., 2015).

1.4.7. Medikal uygulamalarda lipazlar

Lipaz, bir yağ-su arayüzünde trigliseritlerin tersinir hidrolizini katalize ederek, gliserol ve yağ asitlerine dönüştürmektedir (Rahman ve Basri, 2006; Javed vd., 2018). Bu özelliğinden dolayı biyoteknolojide biyokatalizör olarak kullanılan lipazlar vücutta yakılan yağ dokusunu azaltarak sentezlenen yağ miktarını da kontrol etmektedir. Yağ metabolizmasının başlıca enzimi olan lipaz sindirime yardımcı olarak kullanılmaktadır. Kolesterol düşürücü ilaçlar gibi birçok ilaç içeriğinde de lipaz enzimi bulunmaktadır (Çakar, 2016).

1.4.8. Kozmetik endüstrisinde lipazlar

Sabunlar, el ve yüz kremleri, şampuanlar ve parfüm içerikleri gibi kozmetik ürünlerde yağların uzaklaştırılması amacıyla lipazlar kullanılmaktadır (Çakar, 2016). Ayrıca, kozmetik endüstrisinin önemli bileşeni olan sürfektanların üretimi içinde lipazlar kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999). *Candida cylindracea*, *Rhizomucor meihei*, *Candida antarctica*'dan türetilen lipazlar, saç ürünlerinde ve yağ önleyici kremler gibi kişisel bakım ürünlerinde kullanılmaktadır (Gurung vd., 2013).

1.4.9. Biyosensör olarak lipazlar

Candida rugosa'nın lipazı kullanılarak geliştirilen potansiyometrik biyosensörler, tarımda metil-parathion ve tributyrin gibi organofosforlu pestisitlerin belirlenmesinde kullanılmıştır (Kynclova vd., 1995). Fungi lipazı ile hazırlanan probalar, trigliseritlerin tesbitinde (Imamura vd., 1989), kan kolesterolünü ve trigliseritleri biyo-algılamada kullanılmaktadır (Fukumoto vd., 1963).

1.4.10. Bakteriyel lipaz üretiminde son gelişmeler

Endüstride maliyeti az, basit ve kısa zamanda üretim yapılması için üretim süreçlerinin geliştirilmesi yeni lipazların geliştirilmesine sebep olmaktadır (Gupta vd., 2004; Sarmah vd., 2018). Ayrıca, lipaz talebinin artması, yeni lipazların araştırılmasına neden olmaktadır (Gupta vd., 2004). Enzimlerin, artan aktivite, üretkenlik, ısıl kararlılık, tekrar kullanılabilirlik, enantiyoselektif, organik çözücülere karşı tolerans, vb. gibi gelişmiş özellikleri bulunan endüstriyel lipaz isteklerini karşılayacak şekilde tasarlanması için genetik ve biyoteknolojik araçlarının kullanılması gerekmektedir. Lipazlar çeşitli

alanlarda kullanılabilmektedir. Endüstriyel kullanımları için miktar ve nitelik olarak lipazların mühendisliğine ihtiyaç bulunmaktadır (Sarmah vd., 2018). Günümüzde, lipaz üreten mikroorganizmalar çok iyi sonuçlar vermesine rağmen yeterli olamamaktadırlar (Treichel vd., 2010). Varolan teknik uygulamalar lipazların özelliklerini geliştirerek, yeni uygulama alanları için özel üretilmiş yeni enzimlerin ortaya çıkmasına yardımcı olmaktadır (Gupta vd., 2004). Yeni özelliklere sahip enzimlerin belirli bir uygulama için üretilmesini sağlayan mühendislik lipazları da günümüzde öne çıkmakta ve zamanla daha da çok kullanılacağı öngörülmektedir (Treichel vd., 2010).

Lipazların özellikleri, protein mühendisliği ve genetik mühendisliği ile geliştirilerek uygulama alanlarını ve koşullarını genişletmektedir. Enzimin gıda işleme teknolojisinde etkili ve verimli bir biyokatalizör olarak kullanılmasında enzimlerin immobilizasyonundaki yenilikler çok önemli hale gelmektedir (Ray, 2012).

Bakteriyel lipazlarda yapılan mühendislik çalışmaları için en uygun koşullar bakteri türü ve büyüme koşulları ile ilişkili olmaktadır. Yüzey hidrofobikliği, enzim aktivitesi, organik çözücülerde ve yüksek sıcaklıkta stabilite, proteolitik direnç ve substrat toleransı mühendislik çalışmalarında geliştirilen bakteriyel lipazların özelliklerini oluşturmaktadır. Son yıllarda bakteriyel lipazlarla ilgili yoğun olarak çalışılmaktadır. Ancak, saflaştırma, katalitik karakterizasyon ve lipazların daha geniş uygulamaları hakkında ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (Javed vd., 2018).

Kimyasal katalizörlerin yerini alacak, uygulama koşulları altında stabil olan lipazların gelecekte tasarlanacağı düşünülmektedir (Ramyasree ve Dutta, 2013; Javed vd., 2018). Enzimlerin özellikle hareket edebilecekleri substrat aralığına göre dirençli, çok yönlü ve katalize ettikleri reaksiyonlar için yüksek bir spesifikliğe sahip olmaları istenmektedir. Ayrıca, mikrobiyal lipazların üretiminde genetik ve çevresel manipülasyon kolaylığı; katalitik aktivitelerle değiştirilmiş enzim üretimi için çok faydalı olmaktadır (Javed vd., 2018). Bu konuda çok fazla araştırma yapılması lipaz teknolojisinin daha da gelişeceğini ortaya koymaktadır (Ray, 2012).

Yeni biyokatalizörleri geliştirmek zor ve karışık olmaktadır. Enzimlerin işlevlerinin istenilen özellikte olması için enzimler iki şekilde modifiye edilebilmektedir. Bunlar, biyokatalizörlerin rasyonel yeniden tasarımı ve rastgele üretilen kütüphanelerde istenen fonksiyonu arayan birleştirici methodlardır (Adrio ve Demain, 2014).

Yapı ve fonksiyon ile modern genetik mühendislik yöntem bilgilerinin birlikte kullanılması, yeni uygulamaların bulunması ve endüstriyel gereksinimlerin karşılanması için umut vericidir. Klonlanan ve biyokimyasal olarak karakterize edilen yeni mikrobiyal lipazlar artmaktadır. Rasyonel protein mühendisliği, mutajenez ve yönlendirilmiş evrim yoluyla, enzim istenen özelliklere göre geliştirilip, değiştirilebilmektedir. Metagenomik DNA'nın doğrudan klonlanması yoluyla yeni sıralı ve doğal olması, bulunamamış mikrobiyal konsorsiyumların taranmasına ve tanımlanmasında yararlı olmaktadır. Yine de daha hızlı ve yüksek verimli tarama sistemlerinin geliştirilmesi bu tekniklerin başarısı için gerekli olmaktadır (Gupta vd., 2004).

Genom avcılığı ve veri madenciliği ile yeni enzimler bulunabilmektedir. Moleküler yaklaşım ile yeni ve gelişmiş lipazların, metagenomik yaklaşımla yönlendirilmiş evrim ve komünitenin keşfedilmesine yöneltilmektedir (Gupta vd., 2004; Adrio ve Demain, 2014). Yönlendirilmiş evrim, elektrosprey iyonizasyon kütleleri spektrometresine (ESI-MS) dayanan ultra yüksek verimli tarama sistemi ve faz görüntüleme teknikleri ile tasarlanan lipazlar da geliştirilebilecektir (Ray, 2012).

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Laktik asit bakteri izolatları

Çalışmada, Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında daha önceki çalışmalarda çeşitli süt örneklerinden izole edilmiş toplam 50 laktik asit bakteri izolatı alınmıştır. Daha sonra bu izolatlar MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) broth ve M17 broth'a ekilerek 37°C'de 24 saat %10 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler M17 agara ekilerek 24-48 saat 37°C'de %10 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiş ve oluşan kolonilerin özellikleri incelenerek saflıkları kontrol edilmiştir. Saf kültürler %25'lik gliserolde -86°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

2.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri

2.1.2.1. *MRS broth*

MRS broth (Merck VM815661 748) 52,2 g tartılarak 1000 ml distile su ile çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.2. *M17 broth*

M17 broth (Merck) 42.5 g, tartılarak 1000 ml distile su ile çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.3. *MRS agar*

MRS agar (Merck VM840060 833) 68,2 g tartılarak 1000 ml distile su ile çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.4. *M17 agar*

M17 broth (Merck VM118029 029) 42,5 g, agar (Merck) 15 g tartılarak 1000 ml distile su ile çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.5. *Lipaz besiyeri 1 (Tributrin agar)*

Meat extract	2 g (Difco)
Trypton	10 g (Difco)
Yeast Extract	4 g (Difco)
KH ₂ PO ₄	6 g (Merck)
MgSO ₄ x H ₂ O	0.25 g (Merck)
MnSO ₄ x 4H ₂ O	0.05 g (Merck),
Agar	13 g (Merck)
Distile su	1000 ml

Yukarıda verilen bileşenler tartılmış ve hacim 1000 ml distile su ile tamamlanarak karışması için vortekslenmiştir. HCl ile pH 6.5 'a ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 ml distile su ile 0.0005 g Rhodamine B karışımı hazırlanmıştır. Steril besiyerine 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edilen 5 ml Rhodamine B karışımı ve 1 ml tributrin ilave edilmiştir.

Lipaz besiyeri 1 tributrin yerine Tween 80 veya zeytinyağı konularak diğer bileşenleri aynı olacak şekilde de hazırlanmıştır.

2.1.2.6. *Lipaz tayin ortamı*

%3	Yeast extract
%3	Sukroz
0.1 g/l	CaSO ₄
0.5 g/l	KH ₂ PO ₄
0.1 g/l	MgSO ₄ x 7H ₂ O
%1	Tributrin
1 L	Distile su

Yukarıda verilen bileşenlerin karışması için vortekslenip, pH'ı 6.5'a ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 250 ml'lik erlen de 50 ml olacak şekilde dağıtılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanıp steril hale getirilmiştir.

Lipaz tayin ortamında aşağıdaki gibi bazı değişiklikler yapılarak da lipaz tayin ortamı hazırlanmıştır.

-Sukroz yerine %3 glikoz veya %3 laktoz konulmuştur.

-Yeast ekstrakt ve sukroz yerine %5 ve %10 zeytin atığı veya %50 ve %100 peynir altı suyu konulmuştur.

-Yeast ekstrakt oranları %2 ve %5 olarak değiştirilerek hazırlanmıştır.

-Besiyerine %2, %5 oranlarında pepton ve ayrı olarak %2, %5 oranında amonyum sülfat ilave edilmiştir.

-Ayrıca pH'ı 5.5, 7.5 olacak şekilde de hazırlanmıştır.

2.1.2.7. *Mueller Hilton agar*

Mueller-Hilton agar (CM0337 OXOID) 38 g tartılarak 1000 ml distile su ile çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.8. *Mueller Hilton broth*

Mueller-Hilton broth (M391 HIMEDIA) 21 g tartılarak 1000 ml distile su ile çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.9. *Todd-Hewitt agar*

Et ekstraktı (450g yağsız et)	10.0 g
Trypton	20.0 g
Glikoz	2.0 g
Sodyum bikarbonat	2.0 g
Sodyum Klorür	2.0 g
Disodyum fosfat	0.4 g

Yukarıda verilen bileşenler vortekslenip, pH'ı 7.8'e ayarlanmıştır. 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerine 30 g/l jelatin ilave edilmiştir.

2.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Gliserol %20 ve %80 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Tributrin

50 mM Tris-HCl: 0,606 g Tris-HCl 60 ml distile su ile karıştırılıp hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlanmıştır. pH 7 ve pH 9'a ayarlanarak kullanılmıştır.

Tris-HCl, p-nitrophenol çözeltisi: 0,4 mg p-nitrophenol ile 10 ml Tris-HCl (50 mM pH 7) vortekslenerek karıştırılmıştır.

2.1.3.1. Enzim aktivite tayini için substrat

1.Çözelti: 400 µl Triton X, 0.1 g gum arabik ve pH'ı 7 olan 100 ml Tris-HCl ile 100 °C'de 7 dk ısıtılarak karıştırılmıştır. Ayrıca Tris HCl yerine farklı pH'lardaki tamponlar kullanılarak da hazırlanmıştır.

2.Çözelti (substrat): 30 mg p-NPP, 10 ml isopropil (2-propanol) ile çözülmüştür.

2.1.3.2. Farklı pH'larda tamponların hazırlanması

50 mM sodyum fosfat buffer çözeltisi: 0.2651 g monosodyum fosfat, 0,8253 g disodyum fosfat ve 100 ml distile su karıştırılarak pH'ı 6, 7, 8 olacak şekilde HCl ile ayarlanarak ilgili deneylerde kullanılmıştır.

pH 3 için hazırlanan tampon çözelti (100 mM): Sodyum citrat dihidrat (0.136 g) ve citric acid (0.872 g) 80 ml distile su ile sırasıyla karıştırılarak pH 3'e ayarlanmış ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

pH 5 için hazırlanan tampon çözelti (100 mM): Sodyum asetat (0.552 g) ve acetic acid (0.196 g) verilen değerlerin yarısı kullanılarak 80 ml distile su ile karıştırılmış ve pH 5'e ayarlanarak balon jode 100 ml'ye tamamlanmıştır.

pH 11 için hazırlanan tampon çözelti (100 mM): Glisin (3.753 g) ve NaOH (2 g) tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak pH'ı 10 ve 11'e HCl kullanılarak ayarlanmıştır.

2.1.3.3. Farklı çözeltilerin hazırlanması

MnCl₂, CuCl₂, MgCl₂, KCl, NiCl₂, CaCl₂, HgCl₂, ZnCl₂, Ürea, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltilerini (10 Mm) hazırlamak için hepsinin molekül ağırlığı mg olarak tartılıp 100 ml distile su ile tamamlanmıştır.

Tuz Solüsyonları: %1, %5, %15, %20, %25 oranında NaCl tartılarak 10 ml distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.3.4. Coomassie Brilliant Blue G-250:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 %95'lik 50 ml etil alkolde çözülerek 100 ml %85'lik fosforik asitle karıştırılmıştır. Son hacim saf su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Boya filtre kağıdından süzildükten sonra kullanılmıştır.

2.2. Metodlar

2.2.1. Kültürlerin geliştirilmesi ve saflıklarının kontrol edilmesi

Stoktan çıkarılan kültürler M17 brot't'a ekilerek 37°C'de 24 saat %10 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler M17 agara ekilerek 24-48 saat 37°C'de %10 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir. Oluşan kolonilerin özellikleri incelenmiş ve katalaz testi yapılmıştır. Katalaz negatif kültürler gram boyama ile mikroskop altında incelenmiştir.

2.2.1.1. Katalaz testi

Onsekiz yirmidört saatlik taze kültürler üzerine %3 H₂O₂ damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığı gözlenmiştir. Gaz çıkışı olmayan izolatlar katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.1.2. Gram boyama

M17 agarda gelişen kültürlerden gram boyama yapıp mikroskop altında incelenmiştir. Preparat hazırlanarak, kristal viyole 1 dakika bekletilip yıkanmıştır. Daha sonra 1 dakika lügol ile muamele edilip yıkanmıştır. Ardından %96'lık etil alkol ile 2-3 kez yıkandıktan sonra preparat su ile yıkanmış ve safranin ile 45 sn boyanıp su ile yıkanarak, preparat kurutulmuştur. İmmersiyon yağı kullanılarak objektifte incelenmiştir. Mor renk gram pozitif, pembe-kırmızı renk gram negatif olarak değerlendirilmiştir.

Saf olmayan kültürler tekrar ekilerek saf kültür elde edilmiştir. Gram pozitif katalaz negatif suşlar çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2.2. Lipaz üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi

2.2.2.1. Lipaz aktivitesi gösteren laktik asit bakteri izolatlarının seçimi

Laktik asit bakteri izolatların arasında lipaz aktivitesi gösteren izolatları seçmek için tributrin içeren Lipaz besiyeri 1'e kültürler vortekslendikten sonra 50 µl ekim yapılmış ve 48 saat 37°C'de %10 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Aynı şekilde zeytinyağı ve Tween 80 içeren lipaz besiyeri 1'e ekim yaparak, aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan şeffaf bölge (zon) cetvel yardımıyla ölçülmüştür (Ko vd., 2005). Bütün çalışmalar 2 paralel olarak yürütülmüştür.

2.2.2.2. Laktik asit bakterilerinin lipaz besiyerindeki gelişmesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Sıcaklığın etkisi katı ve sıvı besiyerinde belirlenmiştir.

Katı besiyerinde; Seçilen laktik asit bakterileri 37°C'de 24 saat %10 CO₂ koşullarında inkübe edilerek geliştirilmiştir. Lipaz 1 katı besiyerine 5 µl kültürlerden ekim yapılmıştır. Plaklar 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C sıcaklıklarda 48 saat inkübe edilerek bakterilerin gelişme durumu incelenmiştir. Agar üzerinde koloninin gelişme durumu ve oluşan şeffaf bölge kontrol edilerek değerlendirilmiştir. Bütün çalışmalar 2 paralel olarak uygulanmıştır.

Sıvı besiyerinde; daha sonra seçilen laktik asit bakterileri 37°C'de 24 saat %10 CO₂ koşullarında inkübe edildikten sonra 600 nm'de OD.1'e ayarlanıp deney tüplerinde bulunan 10 ml'lik lipaz tayin ortamına 2 paralel ekim yapılmıştır. Deney tüpleri 4°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C sıcaklıklarda 48 saat inkübe edilerek lipaz aktivitesine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır (Bharathi vd., 2018).

2.2.2.3. Seçilen laktik asit bakterilerinde lipaz üretimi

Tributrin içeren lipaz besiyeri 1'de en iyi aktivite gösteren 11 bakteri seçilmiştir. Seçilen bakteriler M17 agar da 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edildikten sonra tek koloni olarak M17 broth'a ekilmişlerdir. M17 broth'da gelişen kültürler 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kültürler, spektrofotometrede 600 nm de OD 1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra 10ml olarak tüplere dağıtılan lipaz tayin ortamına %1 oranında kültürlerden ekim yapılmıştır. 37°C'de 48 saat %10 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra kültürler 4°C 9000 rpm de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant pelletten ayrılarak steril falkona aktarılmış ve lipaz aktivitesi belirlenmiştir (Bkz. Görsel 2.1). Pellet ise steril falkonda -20°C’de dondurucuda saklanmıştır. Bütün çalışmalar çift paralel olarak yapılmıştır.



Görsel 2.1. Lipaz üretim ortamında gelişen kültürlerden elde edilen süpernatant

2.2.2.4. Lipaz aktivitesinin belirlenmesi

Lipaz aktivitesi ekstrasellüler enzimler ve intrasellüler enzimlerde belirlenmiştir.

Ekstrasellüler enzim aktivitesinin belirlenmesi: Lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. p-nitrofenilpalmitat (p-NPP) substrat olarak kullanılmıştır. Lipaz aktivitesini belirlemek için 96 kuyucuklu eliza petrisine 50 mM Tris-HCl içinde hazırlanan %0,4 tritonX-100 ve %0,1 gum arabik içeren (pH 7) çözeltiden 135 µl, 10 ml izopropil ile hazırlanan 30 mg p-NPP ile hazırlanan çözeltiden 15 µl konulmuştur. Plaklar oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra her kuyucuğa hazırlanan süpernatantlardan 50 µl ilave edilmiştir. Hazırlanan eliza petrileri 37°C’de %10 CO₂ koşullarında 1 saat bekletildikten sonra renkteki değişim spektrofotometrede 405 nm’de okunmuştur (Arora, 2013).

İntrasellüler (peletteki) Enzim Aktivitesi: Süpernatanttan ayrılan pelet 4 ml 50 mM Tris HCl tamponunda (pH 7) süspanse edildikten sonra buz içine yerleştirilmiş ve 30 W’da 1dakika sonikasyon uygulanmıştır. Daha sonra 4°C 9000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Pelet ayrılarak süpernatanttaki intrasellüler enzim aktivitesi belirlenmiştir (Meyers vd., 1996).

2.2.2.5. Substrat sıcaklığının lipaz üretimine etkisinin belirlenmesi

Enzim üretimini belirlemek için 96 kuyucuklu Eliza petrisine 50 mM Tris-HCl içinde hazırlanan %0,4 tritonX-100 ve %0,1 gum arabik içeren (pH 7) çözeltiden 135 µl, 10 ml izopropil ile 30 mg p-NPP ile hazırlanan çözeltiden 15 µl konulmuştur. Hazırlanan Eliza petrileri 4°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C sıcaklıklarda 10 dk bekletildikten sonra her kuyucuğa hazırlanan süpernatantlardan 50 µl ilave edilmiş ve belirlenen sıcaklıklarda 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 405 nm’de değerlendirilmiştir. Bütün okumalar 4 paralel olacak şekilde yapılmıştır.

2.2.2.6. Karbon kaynaklarının enzim üretimine etkisi

Lipaz aktivite tayin ortamına karbon kaynağı olarak, sukroz yerine %3 glikoz ve %3 laktoz kullanılmıştır. Üretilen lipaz enziminin aktivitesi belirlenerek en etkili karbon kaynağı belirlenmiştir. Test bakterileri 2.2.2.3’te verilen yönteme göre sadece besiyerindeki sukroz yerine glikoz ve laktoz kullanılarak geliştirilmiş ve 2.2.2.4’te verilen yönteme göre de enzimin aktivitesi belirlenmiştir.

2.2.2.7. Azot kaynaklarının enzim üretimine etkisi

Lipaz aktivite tayin ortamına azot kaynağı olarak %2 ve %5 oranlarında pepton, amonyum sülfat ve yeast ekstrakt kullanılarak üretilen enzimin aktivitesine etkisi belirlenmiştir. Test bakterileri 2.2.2.3’te verilen yönteme göre besiyerine azot kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda pepton, amonyum sülfat ve yeast ekstrakt ilave edilip geliştirilmiştir. 2.2.2.4’te verilen yönteme göre de enzimin aktivitesi belirlenmiştir.

2.2.2.8. pH’nın enzim üretimine etkisi

Lipaz aktivitesine pH’ın etkisini belirlemek için lipaz tayin ortamının pH’ı 5.5, 6.5, 7,5’e ayarlanmıştır. Test bakterileri 2.2.2.3’te verilen yönteme göre farklı pH’lardaki lipaz tayin ortamında geliştirilmiştir. 2.2.2.4’te verilen yönteme göre de enzimin aktivitesi belirlenmiştir.

2.2.2.9. *Çalkalamanın enzim üretimine etkisi*

Lipaz aktivitesine çalkalamanın etkisini belirlemek için test bakterileri 2.2.2.3'te verilen yönteme göre statik ve 120 rpm çalkalamalı etüvde geliştirilmiştir. 2.2.2.4'te verilen yönteme göre de enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Deneyler çift paralel olarak yürütülmüştür.

2.2.2.10. *Lipaz üretimine inkübasyon süresinin etkisi*

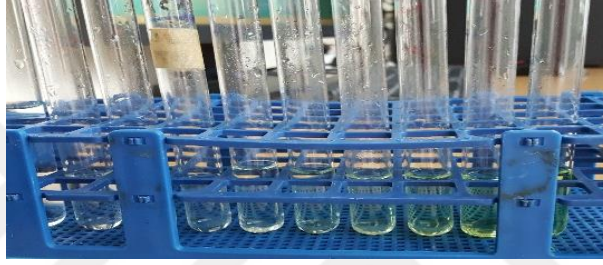
Lipaz aktivitesine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için test bakterileri 2.2.2.3'te verilen yönteme göre 24 saat, 48 saat, 72 saat inkübe edilmiştir. 2.2.2.4'te verilen yönteme göre de enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Deneyler çift paralel olarak yürütülmüştür.

2.2.3. *Lipaz üretiminde farklı substratların kullanılabilirliğinin belirlenmesi*

Peynir altı suyu %50 ve %100, zeytin atığı ise öğütüldükten sonra %5 ve %10 olacak şekilde kullanılarak üretilen enzimin aktivitesine etkisi belirlenmiştir. Test bakterileri 2.2.2.3'te verilen yönteme göre besiyerine yeast ekstrakt ve sukroz kullanılmadan peynir altı suyu veya zeytin atığı ilave edilerek geliştirilmiştir. 2.2.2.4'te verilen yönteme göre de enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Deneyler çift paralel olarak yürütülmüştür.

2.2.4. p-Nitrofenol için standart eğrinin hazırlanması

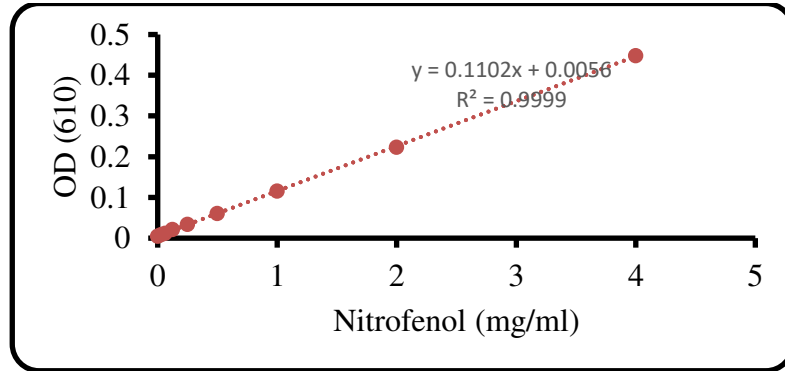
p-Nitrofenilpalmitat ile hidrolize olması sonucunda p-nitrofenol oluşmaktadır. Meydana gelen nitrofenolü belirlemek için 0,4 mg p-nitrofenol, 10 ml 50 mM'lık Tris HCl ile tüp içerisinde vortekslenmiştir. Buradan bir seri farklı miktarlarda p-nitrofenol içeren tüpler hazırlanmıştır (Bkz. Görsel 2.2). Seri olarak hazırlanan p-Nitrofenol-Tris HCl çözeltisi 96 kuyucuklu eliza petrisine konmuştur (Bkz. Görsel 2.3). Oluşan nitrofenol miktarı spektrofotometrede 410 nm'de tespit edilerek nitrofenol standart eğrisi belirlenmiştir (Bkz. Şekil 2.1).



Görsel 2.2. Seri olarak hazırlanan p-Nitrofenol-Tris HCl



Görsel 2.3. p-Nitrofenol-Tris HCl ile hazırlanan 96'lık eliza petrisi



Şekil 2.1. Nitrofenol standart eğrisi

2.2.5. Enzim üretimi

Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar dikkate alınarak enzim üretimi için 500 ml'lik lipaz tayin ortamı hazırlanmıştır. Lipaz tayin ortamında azot kaynağı olarak %5 pepton, karbon kaynağı olarak %3 glikoz konulmuş ve diğer bileşenler sabit kalmıştır. Lipaz ortamı pH'ı ise 6.5-7 arasında ayarlanmıştır. %10 CO₂ koşullarında 37°C'lik çalkalamalı etüvde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 9000 rpm 4°C'de 30 dk santrifüj yapılmıştır. Elde edilen filtrata soğutulmuş aseton 1:5 oranında olacak şekilde karıştırılarak 24 saat 4°C de bekletilmiş ve 9000 rpm, 4°C'de 15 dk santrifüj yapılmıştır (Bkz. Görsel 2.4).



Görsel 2.4. Seçilen izolatların lipaz tayin ortamındaki gelişimleri

2.2.6. Enzimin kısmi saflaştırılması

Diyaliz tüpüne (Sigma PURX12015) enzimden 3 ml konulmuştur. Tris HCl tamponu içine diyaliz tüpü yerleştirilmiştir. 24 saatte bir Tris HCl tamponu değiştirilmiştir. 48 saat sonunda ise kısmi olarak saflaşan enzim deneylerde kullanılmıştır.

2.2.7. Enzim aktivitesinin hesaplanması

İzolatların lipaz aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak p-Nitrofenilpalmitat (p-NPP, sigma) kullanılmıştır. p-Nitrofenilpalmitat'ın enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan p-Nitrofenol spektrofotometrede 405 nm'de tespit edilmiştir.

Lipaz ünitesi (U) birim zamanda (dakika) 1 µmol p-Nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Hesaplamalar standard p-Nitrofenol eğrisi kullanılarak yapılmıştır.

İlk önce ekstinksiyon katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

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

ϵ : Molar ekstinksiyon katsayısı (M-cm-1)

d: Işık yolu

y1: Absorbansın ilk değeri

y2: Absorbansın son değeri

x1: p-nitrofenol konsantrasyonunun ilk değeri

x2: p-nitrofenol konsantrasyonunun ilk değeri

Molar ekstinsiyon katsayısının değeri absorbansı veren maddenin değişimi ve absorbansı arasındaki sabit oranın ifade şeklidir (Telefoncu, 1993).

Molar ekstinsiyon katsayısı hesaplandıktan sonra lipaz aktivitesi (U/ml) aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$A \text{ (U/ml)} = \text{mmol/min/ml} = \Delta A \cdot V_T / \epsilon \cdot d \cdot V_E$$

ΔA : Dakikadaki absorbans değişimi

V_T : Toplam reaksiyon hacmi

ϵ : Ekstinksiyon katsayısı

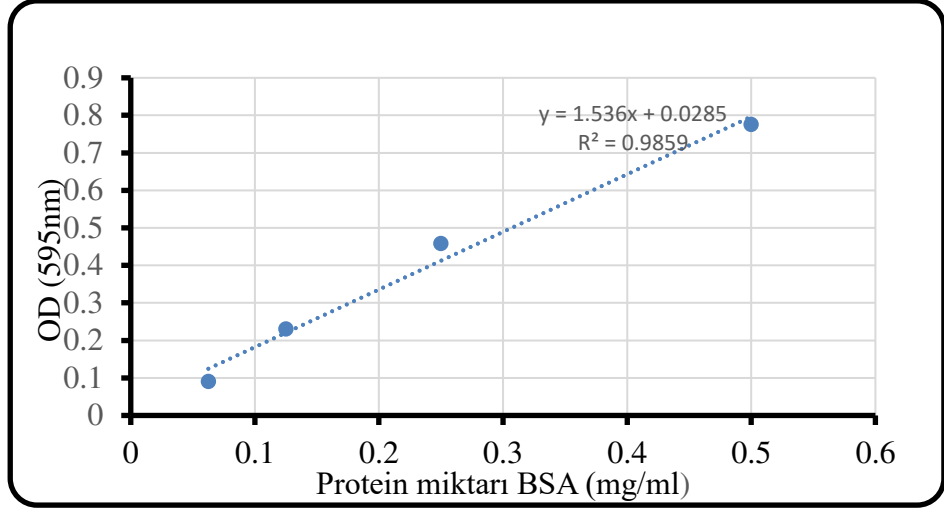
d: Işık yolu (cm)

V_E : Örnek hacmi

2.2.8. Protein miktarının belirlenmesi

Lipaz enziminin protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının, proteinin asidik ve bazik grupları ile reaksiyona girerek renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası negatif yüklü olup rengi kırmızıdır. Proteindeki pozitif yüklü gruplarla birleşince mavi oluşmaktadır. Reaksiyondan sonra renk oluşmaktadır. Oluşan renk 590 nm’de spektrofotometrede değerlendirilerek belirlenmiştir.

Enzimin protein miktarını bulmak için öncelikle standart bir grafik hazırlanmıştır. Sığır serum albümin (BSA) protein standartı olarak kullanılmıştır. BSA’nın 1 mg/ml’lik standart çözeltisi hazırlanarak buradan ultra saf su ile bir seri seyreltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan kuyucuklara 20 μ l aktarılmıştır. Köre ise 20 μ l distile su konulmuştur. Bütün kuyucuklara Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasından 200 μ l ilave edilerek karıştırılmış ve 5 dakika sonra 595 nm dalga boyunda köre karşı okutularak standart grafik çizilmiştir (Bkz. Şekil 2.2). Bu grafikten yararlanarak protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 2.2. Protein standart grafiği

2.2.9. Elektroforez

2.2.9.1. Lipazın molekül ağırlığının belirlenmesi

Enzimin molekül ağırlığı Laemmli yöntemine (1970)'e göre SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile belirlendi. SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

%30'luk akrilamid/N,N'metilenbisakrilamid karışımı: 30 g akrilamid ve 0,8 g N,N'metilenbisakrilamid 100 ml distile su ile çözülmüştür. Işık görmeyecek şekilde 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Ayırma Tamponu: 1,5 M Tris-HCl hazırlanıp HCl ile pH'ı 8.8'e ayarlanmıştır.

Yoğunlaştırma Tamponu: 0,5 M Tris-HCl hazırlanıp HCl ile pH'ı 6.8'e ayarlanmıştır.

Amonyum persülfat: %10'luk amonyum persülfat distile su ile taze hazırlanmıştır.

Sodyum dodesil sülfat (SDS): %10'luk SDS distile su ile çözülerek hazırlanmıştır.

Coomassie Blue G-250 Çözeltisi:

Coomassie Blue	100 mg
Metanol (%50)	200 ml
Asetik asit (%10)	35 ml

Yukarıda verilen değerlere göre metanol (%50) de Coomassie Blue çözülerek, asetik asit (%10) eklenmiştir. Tamamı 500 ml olacak şekilde distile su ile hazırlanmıştır.

SDS-PAGE Ayırma Jeli Oranları (10 ml için):

H ₂ O	3,3 ml
%30 akrilamid karışımı	4 ml
1,5M Tris (PH8.8)	2,5 ml
%10 SDS	0,1 ml
%10 Amonyum persülfat	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Yukarıda verilen oranlara göre hazırlanmıştır.

SDS-PAGE İçin Yükleme Jeli Oranları (2 ml için):

H ₂ O	1,4 ml
%30 akrilamid karışımı	0,33 ml
1.0 M Tris (PH6.8)	0,25 ml
%10 SDS	0,02 ml
%10 Amonyum persülfat	0,02 ml
TEMED	0,002 ml

Yukarıda verilen oranlara göre hazırlanmıştır.

5X Elektroforez Tampon:

Tris-Base	9 g
Glycin	43,2 g
SDS	3 g
Distile su	600 ml

Yukarıdaki malzemeler tartılıp 600 ml distile suda çözüldükten sonra pH'ı 8.3'e ayarlanmıştır. Kullanırken 1:5 oranında distile su ile 1X elektroforez tampon yapılmıştır. Jel Hazırlanışı:

Yukarıda verilen oranlara göre %12'lik SDS-PAGE ayırma jeli, SDS-PAGE yükleme jeli ve 5X elektroforez tampon hazırlanmıştır. Öncelikle, SDS-PAGE ayırma jeli hazırlanıp mini elektroforez (Bio-Rad, Mini PROTEAN) camları arasına konularak düzgün olabilmesi için üzerine distile su ile tamamlanmıştır. 37 °C'lik etüvde 15 dk bekletilip kurutulmuştur. Sonra ise SDS-PAGE yükleme jeli konularak tarak yerleştirilmiştir. 37 °C'lik etüvde 15 dk bekletilmiştir.

Örneklerin Hazırlanması ve Jele Konulması:

Tarak jele zarar vermeden çıkarılmıştır. Protein yükleme boyasıyla boyanan örnekler 20 µl olarak kuyucuklara konulmuştur. Jel tankın içine yerleştirilerek üzerine 1X elektroforez tampon konulmuştur. Güç kaynağı (BIO-RAD) ile 100 V verilerek protein ayırma işlemi yapılmıştır.

Jelin Boyanması:

Jel cam plaklardan ayrılarak Coomassie Blue G-250 çözeltisinde 30 dk 20 rpm'de çalkalanarak boyandı. Boyanan jel distile su ile yıkanarak fazla boya yok edildi ve bantlar ortaya çıktı.

2.2.10. Enzim aktivitesine etki eden faktörlerin belirlenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan lipaz enzimlerinin aktivitesi üzerine sıcaklığın, pH'ın, çeşitli katyon, sürfektan ve çözeltilerin etkisi belirlenmiştir.

2.2.10.1. Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Sıcaklığın lipaz enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için enzim 50 mM sodyum fosfat tampon (pH 7) içinde 5 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 55 °C ve 65°C'de 1 saat süre ile inkübe edildikten sonra 2.2.2.4'te verilen yönteme göre muamele edilmiş ve enzim aktivitesi 405 nm'de spektrofotometrede belirlenmiştir.

Sıcaklık stabilitesi belirlemek için lipaz 50 mM sodyum fosfat tampon (pH 7) içinde konularak 5 °C, 20 °C, 30 °C, 45 °C ve 55°C'de 5 dk, 1 s, 4 s, 24 s ve 48 s süre ile inkübe edildikten sonra 2.2.2.4'e göre yapıp kalan aktivite 405nm de spektrofotometrede belirlenmiştir (Esteban-Torres vd., 2015).

2.2.10.2. pH'ın enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi

pH'ın lipaz enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için pH 3-11 arasında hazırlanan tamponlarda enzimler bekletilerek pH'ın lipaz aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir. pH 3-5 için asetik asit-sodyum asetat tampon, pH 6 için sodyum fosfat tampon, pH 7-8 için Tris-HCl tampon, pH 9 için glisin-NaOH tampon kullanılmıştır. 2.2.2.4'te verilen yönteme göre farklı pH'lardaki enzim aktivitesi 405 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

Enzimin pH direncini belirlemek için ependorflara farklı pH'lardaki tamponlardan 200 µl konulmuştur. Üzerine ise 200 µl enzim ilave edilerek 45 °C'de 2 ve 3.5 saat inkübe edilmiştir. Yukarıda verilen prosedüre (2.2.2.4) uyularak eliza petrilere ependorftaki karışımdan 100 µl ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 405 nm'de okutularak kalan aktivite belirlenmiştir.

2.2.10.3. Bazı çözeltilerin ve katyonların enzim aktivitesine etkisi

Bazı katyon, sürfektan ve çözeltilerin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için MnCl₂, CuCl₂, MgCl₂, KCl, NiCl₂, CaCl₂, HgCl₂, ZnCl₂'ün son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde ilave edip 2.2.2.4.'te verilen yönteme göre muamele edilmiş ve enzim aktivitesi 405 nm'de spektrofotometrede belirlenmiştir. Üre, EDTA, SDS, tween 20, tween 80, triton X-100'ün enzim aktivitesine etkisi ortama 1 µl ilave edilerek belirlenmiştir.

2.2.10.4. Enzim aktivitesine tuzun etkisinin belirlenmesi

Sodyum klorürün (NaCl) etkisini belirlemek için %0, %1, %5, %10, %15, %20, %25 (w/v) konsantrasyonlarında NaCl tampona ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 2.2.2.4.'te verilen yönteme göre muamele edilmiş ve enzim aktivitesi 405 nm'de spektrofotometrede belirlenmiştir. (Esteban-Torres vd., 2015).

2.2.11. Seçilen izolatların tanımlanması

İzolatların tanımlanması 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' evrensel primerleri kullanılarak 16S rRNA gen bölgesine göre dizi analizi BM Laboratuvar Sistemleri'ne yaptırılmıştır. Elde edilen dizi bilgileri BioEdit 7.0.5.3 dizi hizalama ve editleme programında düzenlenmiş ve birleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen dizi bilgileri National Center for Biotechnology (NCBI) web sitesinde bulunan GenBank veritabanındaki diğer 16S rRNA dizileriyle Blast programı kullanılarak karşılaştırılmış ve izolatlar tür düzeyinde yüzde benzerlik oranıyla tanımlanmıştır.

2.2.12. Jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi

Enterococcus spp. M17 broth'a 37°C de 24 saat süre geliştirilmiştir. Bu kültürler Todd-Hewitt agara ekilerek 37°C'de 24 saat geliştirildikten sonra 4°C de 5 saat tutularak jelatin kolonilerin etrafındaki zon kontrol edilerek değerlendirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001).

2.2.13. Antibiyotik hassasiyet testi

Ampisilin (AM 10 µg/disk BBL), Vankomisin (VA 30 µg/disk BBL), Ciprofloksasin (5 µg/disk, Bioanalyse) antibiyotik diskleri kullanılarak disk difüzyon testi ile antibiyotiklere hassasiyetleri belirlenmiştir. Test bakterileri MacFarland 0.5'e göre bulanıklılığı ayarlanarak Müller Hilton agar üzerine 100 µl aktararak yayılmıştır. Üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 24 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve bu süre sonunda oluşan zon ölçülerek değerlendirilmiştir (Wayne, 2010).

2.2.14. Hemolitik aktivite

Enterococcus suşlarının kanlı agara ekimi yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakterilerin hemoliz durumları değerlendirilmiştir.

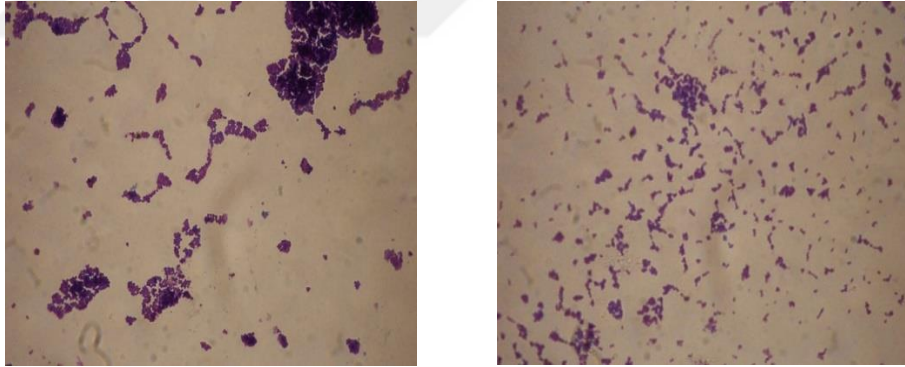
3. BULGULAR

3.1. Test Bakterilerinin Seçimi

Çalışmada kullanılan süt ürünlerinden izole edilmiş 50 izolat stoktan çıkarılarak aktifleştirildikten sonra uygun katı besi ortamına ekilerek saflığı koloni görüntülerinden teyit edildikten sonra gram boyama ve katalaz testi yapılarak izolatların saflığı kontrol edilmiştir. Gram pozitif ve katalaz negatif izolatlar çalışmalarda kullanılmıştır (Bkz. Görsel 3.1 ve Görsel 3.2.).



Görsel 3.1. *Test bakterilerinin katalaz testi*



Görsel 3.2. *Test bakterilerinin mikroskopik görüntüsü*

Tablo 3.1. İzolatların lipolitik aktivite sonucu oluşturduğu şeffaf bölge (zon) çapları (cm)

İzolat No	Zon Çapı (cm)	Koloni Çapı (cm)	İzolat No	Zon Çapı (cm)	Koloni Çapı (cm)
İM3	1.1	0.9	M7	1.1	0.8
D18Y	1.3	1.0	M49	1.2	0.9
E12061	1.2	0.8	M66	1.1	0.9
İM7	1.4	1.0	D17Y2	1.2	0.9
A42	1.4	1.0	D22	1.2	0.9
İM4	1.2	1.0	M13	1.2	0.9
İM8	1.0	0.8	M7	1.1	0.8
E121K2	1.2	1.0	A105Y2	1.2	0.9
E121K1	1.3	1.0	İ13LP	1.3	0.9
E11411	1.0	0.8	İ6NNLP	1.3	0.9
İM13Y	1.3	0.9	D17Y2	1.2	0.9
G20	1.3	1.0	İ72	1.2	0.8
G41	1.2	0.8	M43Y	1.3	0.9
İ9NNLP	1.1	0.8	M22	1.1	0.8
M1	1.5	1.2	E1141	1.3	0.8
İ18	1.4	1.1	M38	1.3	0.9
İ71	1.4	1.0	D262	1.2	1.0
D24Y	1.4	1.1	D29	1.2	0.7
M32	1.3	1.1	D22	1.4	0.8
D262	1.6	1.3	A4	1.5	1.0
D17Y1	1.3	1.1	M48	1.3	0.8
E66	1.5	1.1	E68	1.5	0.9
E114	1.6	1.2	M93	1.4	0.9
İ16	1.2	0.9	İ10	1.4	0.7
İM6	1.2	0.9	İM8	1.5	0.9

3.3. Seçilen İzolatların Tanımlanması

İ10, İM8, E114, M48, E66, A4, M93, E68, D22, D29, E1141 numaralı izolatlarda elde edilen şeffaf bölge çapları daha yüksek olduğu için lipaz üretiminde bu izolatlar kullanılmak üzere seçilmiştir. 16S rRNA gen bölgesine göre dizi analizi sonuçlarına göre test bakterilerini hepsi *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır (Bkz. Tablo 3.2). E1141 ve E114 izolatları *E. durans* olarak diğer izolatlar ise *E. faecium* olarak belirlenmiştir. GenBank veritabanındaki diğer 16S rRNA dizileriyle benzerlik oranı yüzde 99'un

üstünde olmuştur. Tablo 3.2.'da lipaz üretimi yüksek olan test bakterilerinin tanımlamaları, erişim numaraları ve benzerlik yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 3.2. Test bakterilerinin 16S rRNA gen bölgesine göre dizi analizi sonuçlarına göre tanımlanması

Kod no	Tanımlama	Benzerlik yüzdesi	Erişim No
E1141	<i>Enterococcus durans</i>	99.58%	MF582823.1
İM8	<i>Enterococcus faecium</i>	99.16%	MH111587.1
E114	<i>Enterococcus durans</i>	99.29%	MF582969.1
M48	<i>Enterococcus faecium</i>	99.65%	MG911720.1
E66	<i>Enterococcus faecium</i>	98.64%	MH368248.1
A4	<i>Enterococcus faecium</i>	99.58%	MH249092.1
M93	<i>Enterococcus faecium</i>	99.51%	MH249092.1
E68	<i>Enterococcus faecium</i>	99.79%	CP040706.1
D22	<i>Enterococcus faecium</i>	99.54%	MH701941.1
D29	<i>Enterococcus faecium</i>	99.44%	MG911720.1

3.4. Lipaz Enzimi Üretimine Etki Eden Faktörler

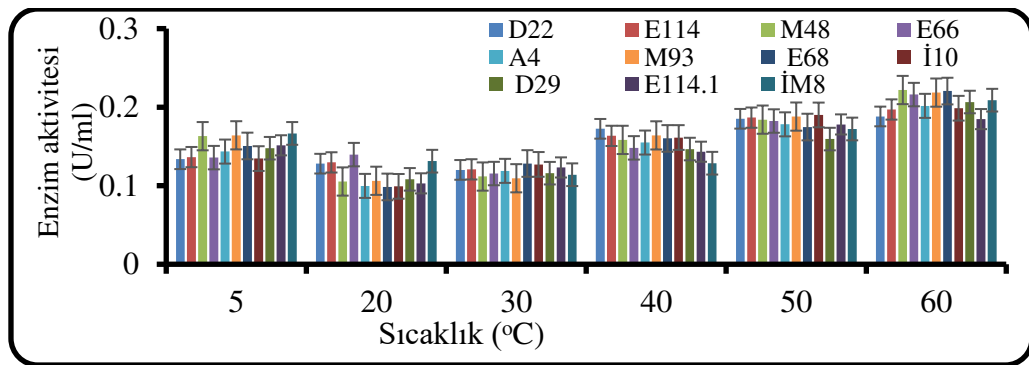
3.4.1. Sıcaklığın etkisi

Yüksek lipaz aktivitesi gösteren 11 laktik asit bakterisi M17 agar besiyerinde iyi gelişme gösterdiğinden bakteriler bu ortamda geliştirilmiştir. İzolatların tributrin agarda (Lipaz besiyeri 1) 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C sıcaklıklarda lipaz aktivitesi bakterilerin gelişme durumu incelenerek değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 3.3). Bütün sıcaklıklarda bakteriler gayet iyi gelişmiştir. Şeffaf bölge çapları da birbirine yakın olarak bulunmuştur.

Tablo 3.3. İzolatların farklı sıcaklıklarda lipolitik aktivite sonucu oluşturduğu zon çapları (cm)

	4°C		20°C		25°C		30°C		35°C		40°C		45°C		50°C	
İzolat	Zon Çapı	Koloni Çapı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Zon Çapı	Koloni Çapı	Zon Çapı	Koloni Çapı
D22	2,0	0,8	2,0	0,6	2,2	0,7	2,0	0,6	2	0,7	1,7	0,5	1,5	0,4	1,7	0,5
E1142	1,9	0,6	1,8	0,5	1,9	0,5	2,0	0,5	1,8	0,5	1,7	0,5	2,1	0,5	1,6	0,5
M48	1,8	0,5	1,8	0,5	2,0	0,6	2,1	0,6	1,8	0,5	1,6	0,5	1,8	0,4	1,8	0,4
E66	2,2	0,6	2,0	0,5	1,9	0,5	1,9	0,6	1,8	0,5	1,7	0,5	1,6	0,4	1,6	0,4
A4	2,0	0,7	2,1	0,6	1,9	0,5	2,1	0,6	2,0	0,5	2,0	0,5	1,7	0,5	1,8	0,6
M93	2,0	0,7	2,0	0,7	2,0	0,6	2,1	0,6	1,8	0,5	2,0	0,6	2,1	0,6	1,7	0,6
E68	1,8	0,5	1,9	0,6	1,8	0,6	1,9	0,5	1,8	0,5	1,9	0,5	2,1	0,5	1,5	0,6
İ10	1,9	0,5	2,1	0,6	1,8	0,5	1,8	0,5	1,8	0,5	2,0	0,5	2,0	0,5	1,9	0,5
D29	1,9	0,5	1,9	0,5	1,9	0,5	2,0	0,5	1,8	0,5	1,8	0,5	1,8	0,5	1,7	0,5
E1141	1,3	0,5	1,8	0,5	1,8	0,5	2,0	0,5	1,8	0,5	1,9	0,5	1,9	0,5	1,8	0,5
İM8	2,0	0,5	1,8	0,5	1,6	0,5	1,9	0,5	1,8	0,4	1,9	0,5	1,9	0,4	1,6	0,5

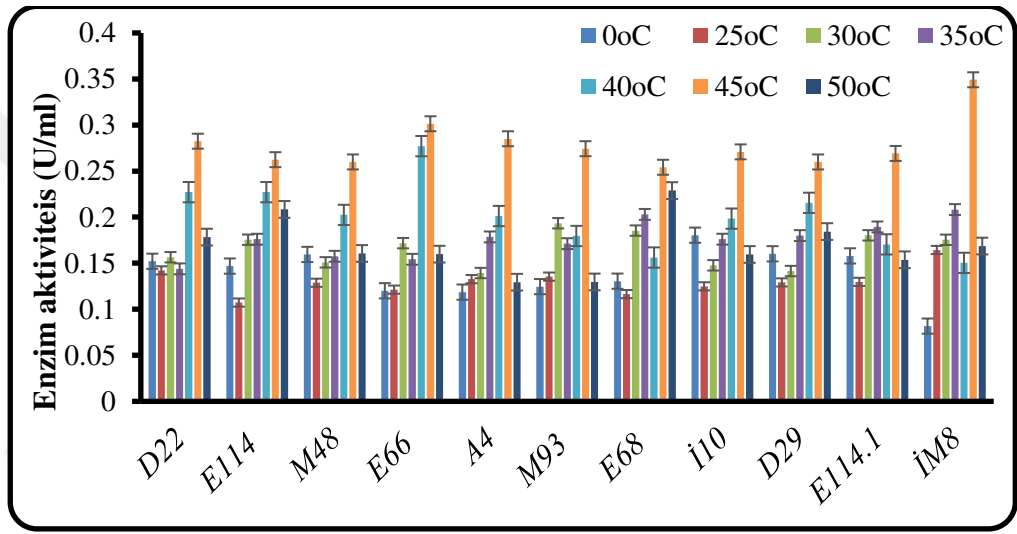
Sıvı ortamda ise sıcaklık ile enzim üretimi artmıştır. Üretilen enzimlerin aktivitesi 40°C’den sonra artmıştır. 45-60°C de gelişen kültürlerden elde edilen enzimlerin aktivitesi daha yüksek olmuştur (Bkz. Şekil 3.1). Test bakterilerine göre farklılıklar görülmekle birlikte bütün test bakterilerinde yüksek sıcaklıkta üretilen lipazın aktivitesi artmıştır.



Şekil 3.1. Farklı sıcaklıklarda üretilen bakterilere ait lipaz enzimlerinin aktivitesi

3.4.2. Substrat sıcaklığının etkisi

Substrat sıcaklığı lipaz aktivitesini etkilemiştir (Bkz. Şekil 2.2). Substrat sıcaklığı 40-45°C olduğunda en yüksek en yüksek lipaz aktivitesi gerçekleşmiştir. Elde edilen lipaz aktivitesi bakterilere göre değişmiştir. En yüksek lipaz aktivitesi 45°C substrat sıcaklığında *E. faecium* İM8 izolatında olmuştur. Bunu *E. faecium* E66, *E. faecium* D22 ve *E. faecium* A4 izolatları takip etmiştir (Bkz. Şekil 3.2).



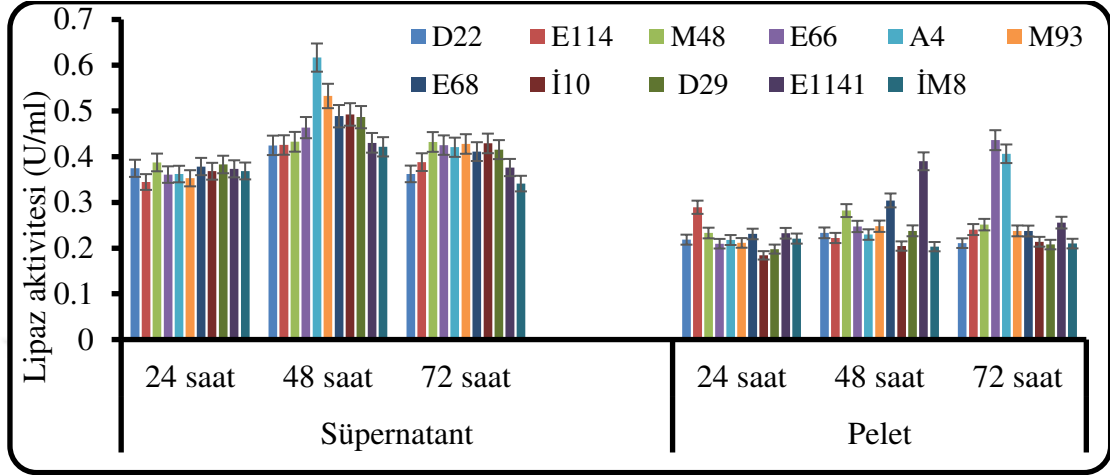
Şekil 3.2. Test bakterileri tarafından üretilen lipaz enziminin aktivitesi üzerine substrat sıcaklığının etkisi

3.4.3. Fermantasyon süresinin etkisi

Bütün test bakterileri için optimum fermantasyon süresi ekstrasellüler lipaz için 48 saat olarak belirlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi 48 saat inkübe edilen örneklerde elde edilmiştir. En yüksek aktivite *E. faecium* A4 de elde edilmiştir. Bunu *E. faecium* M93 takip etmiştir.

Peletlerdeki intrasellüler enzim aktivitesi bakıldığında ise en yüksek aktivite genellikle 48 saatlik fermantasyondan sonra elde edilmiştir. Ancak *E. faecium* E66 ve *E. faecium* A4 izolatlarında 72 saatlik inkübasyondan sonra elde edilmiştir (Bkz. Şekil 3.3).

Ekstrasellüler enzim aktivitesi peletlerdeki enzim aktivitesinden daha yüksek olarak belirlenmiştir. *E1141*, *E. faecium* E66 ve *E. faecium* A4 ait peletlerdeki lipaz aktiviteleri yüksek olarak saptanmıştır. *E. faecium* E66 ve *E. faecium* A4 ait peletlerdeki enzim aktivitesi 72 saat inkübe edilen örneklerde yüksek olmuştur.

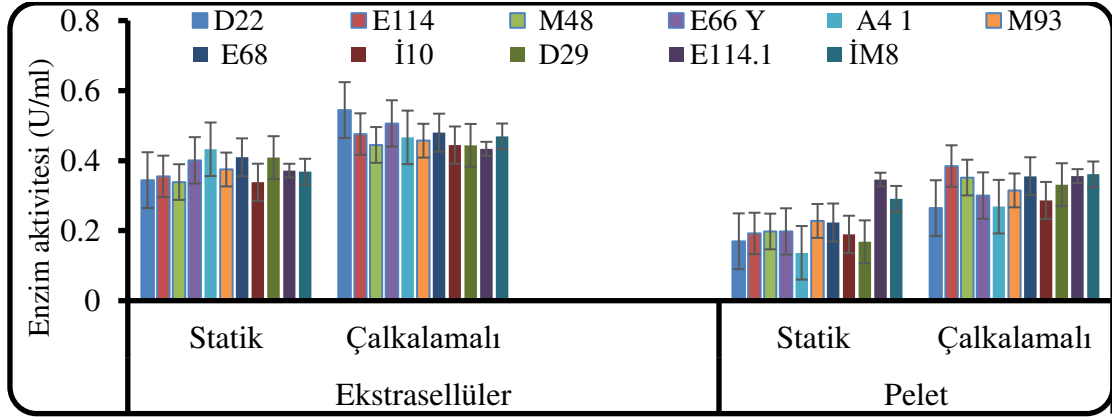


Şekil 3.3. Farklı fermantasyon süreleri uygulanarak üretilen bakterilere ait ekstrasellüler ve intrasellüler lipaz enzimlerinin aktivitesi

3.4.4. Çalkalamanın etkisi

Çalkalamalı (120 rpm) ve statik kültür olarak üretilen *Enterococci* spp. den elde edilen lipaz enzimlerinin aktivitesi suşlara göre değişmiştir. Çalkalamalı olarak üretilen bakterilerden elde edilen enzim aktivitesi statik olarak üretilenlerdeki enzimin aktivitesinden yüksek olmuştur.

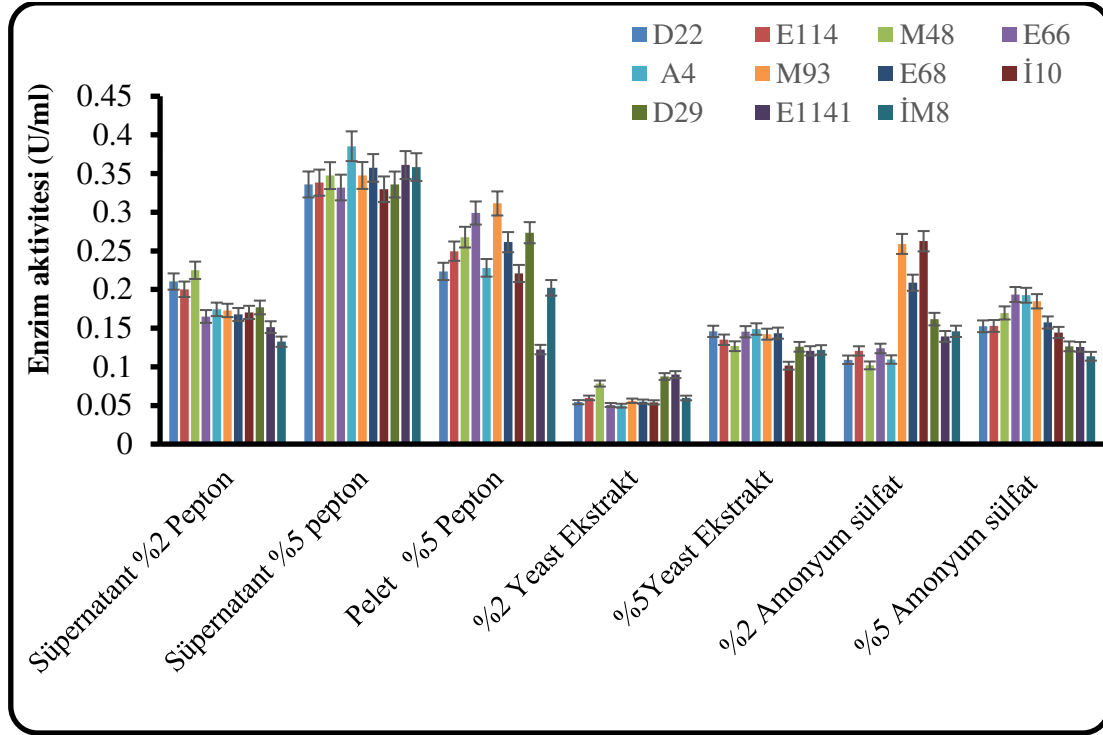
Bu etki test bakterilerine göre değişmiştir (Bkz. Şekil 2.4.). En yüksek aktivite *E. faecium* D22 'de elde edilmiştir. Bunu *E. faecium* E66 takip etmiştir. Peletten elde edilen intrasellüler enzimlerinde aktivitesi olduğu görülmüştür. İntrasellüler enzimlerde de çalkalamalı olarak üretilen enzim aktivitesi daha yüksek olmuştur. Ancak ekstrasellüler enzimlerin aktivitesi daha yüksek olmuştur (Bkz. Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Çalkalamalı ve statik olarak üretilen bakterilere ait lipaz enzimlerinin aktivitesi

3.4.5. Azot kaynaklarının etkisi

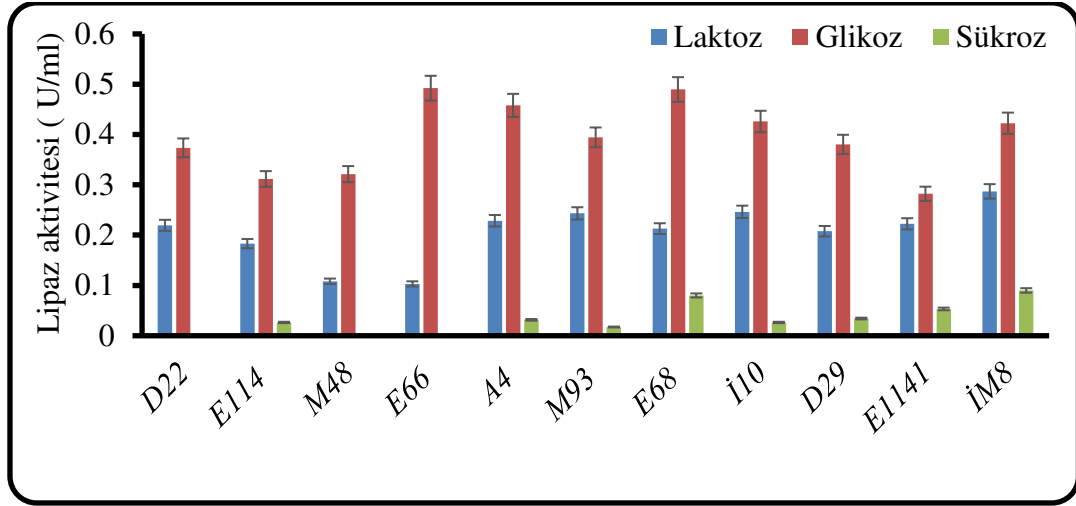
Farklı azot kaynaklarında geliştirilen test bakterilerinden elde edilen lipaz enziminin aktivitesi değişmiştir. En etkili azot kaynağı %5 pepton olarak saptanmıştır. Yeast ekstraktın ve amonyum sülfatın fazla bir etkisi olmamıştır. Besiyerine %5 pepton ilavesi ile elde edilen ekstrasellüler enzimin aktivitesinde artış olmuştur. Bu kültürlerin peletlerinde elde edilen enzimlerinde aktivitesi de yüksek olarak saptanmıştır. Yeast ekstrakt ve amonyum sülfatın geliştirilen bakterilerden elde edilen enzimlerin aktivitesi bakterilere göre değişmiştir (Bkz. Şekil 3.5). Ancak aktivitesi ekstrasellüler enzimlerin aktivitesinden düşük olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Farklı azot kaynaklarında geliştirilen *Enterococcus* spp. ait lipaz enzimlerinin aktivitesi

3.4.6. Karbon kaynaklarının etkisi

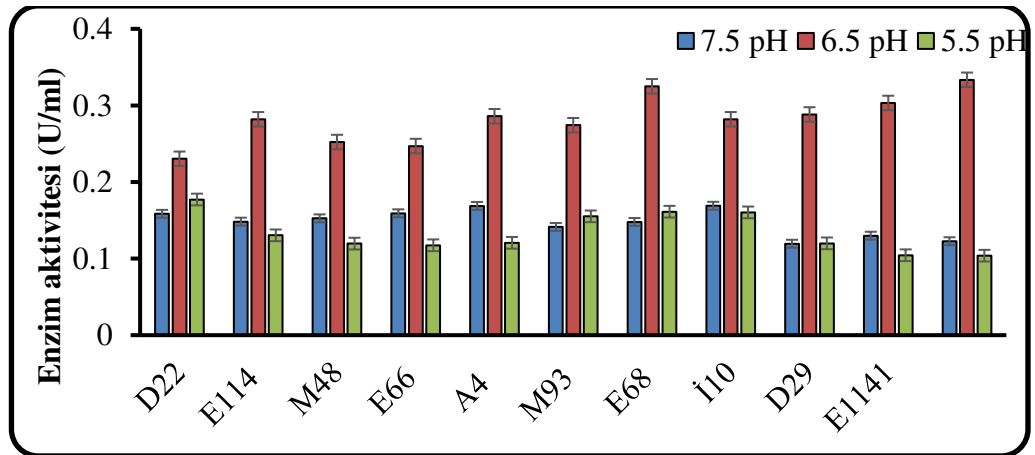
Karbon kaynağı olarak besiyerine %3 oranında laktoz, glikoz ve sükroz ilave edilmiştir. Bu karbon kaynaklarında üretilen bakterilere ait enzimlerin aktivitelerine bakıldığında en yüksek aktivite glikoz kullanıldığında elde edilmiştir (Bkz. Şekil 3.6). İzolatlar arasında karbon kaynaklarının etkisi farklı olmuştur. *E. faecium* E66 ve *E. faecium* E68 izolatları glikoz ortamında yüksek oranda 4-nitrofenol oluşturmuştur. Sükroz ise en etkisiz karbonhidrat olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Farklı karbon kaynaklarında geliştirilen *Enterococcus* spp. ait lipaz enzimlerinin aktivitesi

3.4.7. Ortam pH'ının etkisi

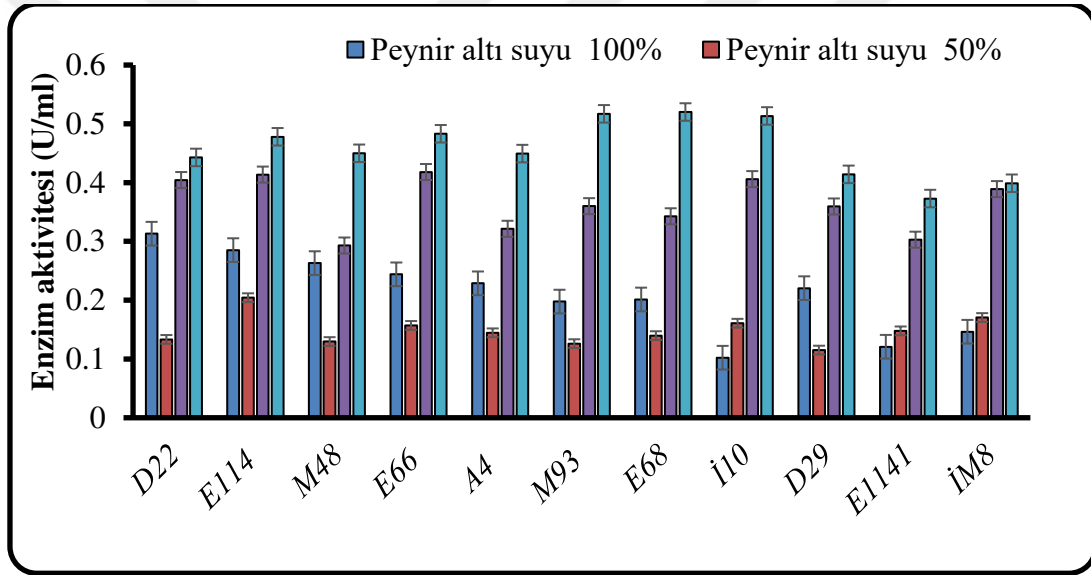
Farklı pH 5.5, 6.5 ve 7.5'larda geliştirilen *Enterococcus* spp. ait lipaz enziminin aktivitesi test bakterilerine göre değişmiştir. pH 6.5'te test bakterilerine göre değişmekle beraber bütün bakterilerden elde edilen enzimlerde en yüksek aktivite sağlanmıştır. En yüksek enzim aktivitesi pH 6.5 *E. faecium* E68 izolatı ile *E. faecium* İM8 izolatında olmuştur (Bkz. Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Farklı pH'larda geliştirilen bakterilere ait lipaz enzimlerinin aktivitesi

3.5. Zeytin ve Peynir Altı Suyunda Lipaz Üretimi

Lipaz enzimi üretiminde peynir altı suyu ve zeytin atığının kullanılabilirliğini belirlemek için peynir altı suyu %100, %50, zeytin atığı ise %5 ve %1 olacak şekilde ortama ilave edilmiştir. Peynir altı suyu ve zeytin artıklarında geliştirilen bakterilere ait lipaz enziminin aktivitesi belirlenmiştir. Zeytin atığında geliştirilen bakterilere ait enzimin aktivitesi daha yüksek olarak saptanmıştır. Zeytin atığı lipaz üretimi için uygun bir ortam olarak gözlenmiştir. %1 zeytin atığı kullanılarak hazırlanan lipaz tayin ortamından elde edilen ekstrasellüler enzimin aktivitesi en yüksek olarak saptanmıştır (Bkz. Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Farklı substratlarda geliştirilen kültürlerle ait lipaz enzimlerin aktivitesi

3.6. Lipaz Enziminin Protein Miktarları

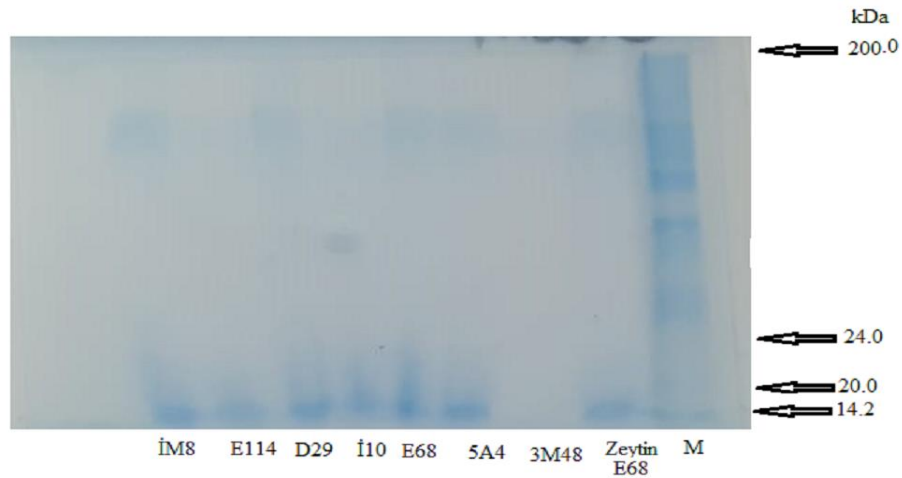
Seçilen *Enterococcus spp.* ait kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler lipaz enziminin kuru ağırlığı ve protein miktarı verilmiştir (Bkz. Tablo 3.4). Ekstrasellüler enzimlerdeki protein miktarları suşlara göre değişmiştir. Protein ağırlıkları 0.131 mg/ml ile 0.511 mg/ml arasında değişmiştir. Zeytin atığı kullanılarak üretilen enzimde ise 0.691 mg/ml olarak bulunmuştur. *E. faecium* M48'de en yüksek *E. faecium* D22 ise en düşük protein ağırlığı elde edilmiştir.

Tablo 3.4. *Enterococcus spp.* ait ekstrasellüler lipaz enzimlerinin kuru ağırlık ve protein miktarları

Bakterilerin kodları	Protein Miktarı (BSA mg/ml)	Kuru ağırlık (mg/ml)	Yaş ağırlık (mg/ml)
D22	0.131	0.720	1.187
E114	0.247	0.300	0.477
M48	0.511	0.526	1.203
E66	0.286	0.460	1.118
A4	0.329	0.520	1.164
M93	0.277	0.456	1.139
E68	0.315	0.396	1.078
İ10	0.206	0.849	1.147
D29	0.355	0.295	0.774
E1141	0.275	0.444	1.040
İM8	0.391	0.622	1.163
Zeytin atığında E68	0.691	0.360	1.133

3.7. Lipazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Enzimin görüntülenmesini ve molekül ağırlığını saptamak için, SDS-PAGE yapıldı. Proteinlerin her birinin hareket ettiği mesafeye karşı markerın (M) moleküler ağırlığının logaritması alınarak kalibrasyon eğrisi çizilerek moleküler ağırlığı belirlendi. *Enterococcus spp.* izolatlarının SDS-PAGE analizi sonucu lipaz enzimlerinin moleküler ağırlığı yaklaşık 19-20 kDa civarında belirlenmiştir (Bkz. Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Kısmi olarak saflaştırılmış *Enterococcus spp.* İzolatlarına ait lipaz enzimlerinin SDS-PAGE analizi. M.marker

3.8. İzolatların Antibiyotik Hassasiyeti ve Jelatinaz Aktivitesi

Test bakterileri ampisiline, gentamisine bütün *Enterococcus spp.* izolatları dirençli iken ciprofloksasin ve vankomisine ise *M93* ve *E68* hariç diğer izolatlar dirençli olarak bulunmuştur. Jelatinaz ve hemoliz aktivitesi ise bütün test bakterilerinde negatif olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 3.5).

Tablo 3.5. *Enterococci spp. antibiyotik hassasiyeti ve jelatinaz aktivitesi*

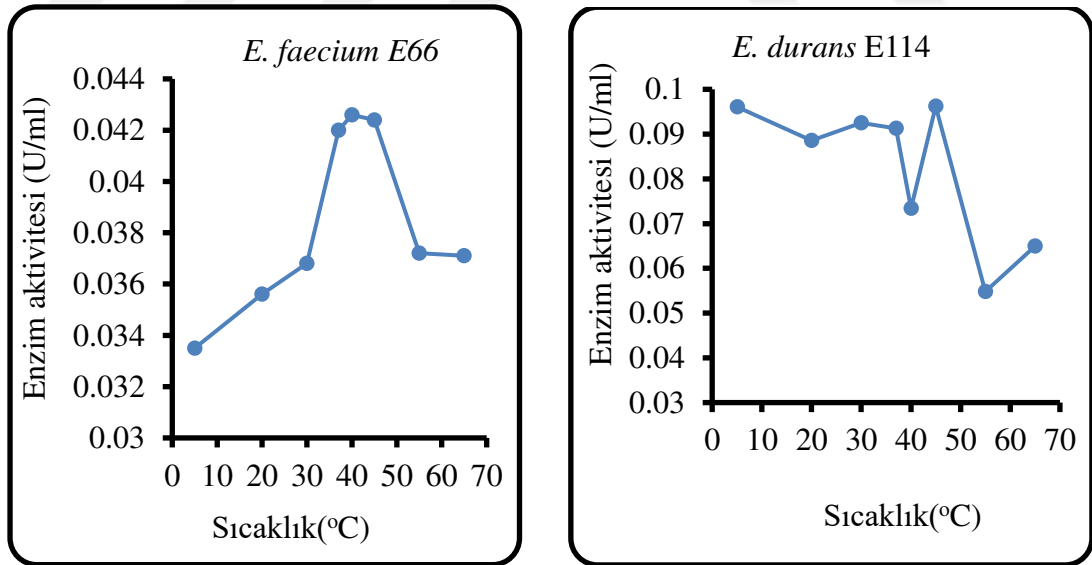
+Bakterileri kodları	Antibiyotik hassasiyeti				Jelatinaz aktivitesi	Hemoliz
	Ampicillin	Gentamisin	Ciprofloksasin	Vankomisin		
<i>D22</i>	R.	R.	R	R	-	-
<i>E114</i>	R	R	R	R	-	-
<i>M48</i>	R	R	R	R	-	-
<i>E66</i>	R	R	R	R	-	-
<i>A4</i>	R	R	R	R	-	-
<i>M93</i>	R	R	S	S	-	-
<i>E68</i>	R	R	R	S	-	-
<i>İ10</i>	R	R	R	R	-	-
<i>D29</i>	R	R	R	R	-	-
<i>E1141</i>	R	R	R	R	-	-
<i>İM8</i>	R	R	R	R	-	-

3.9. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi

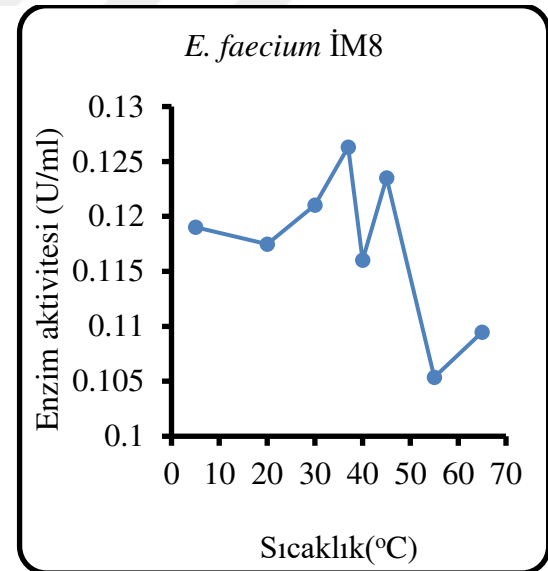
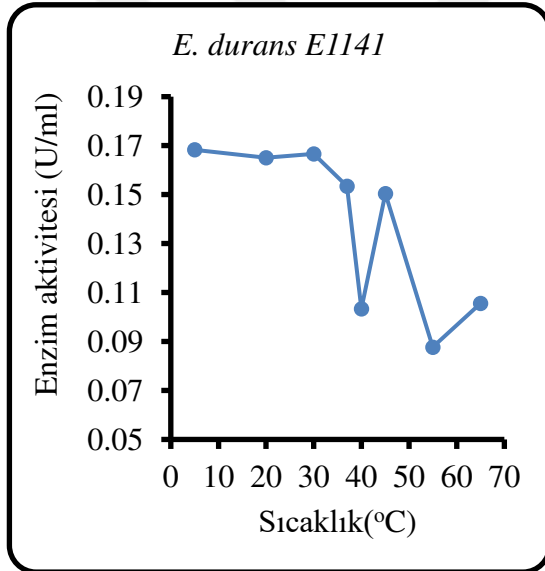
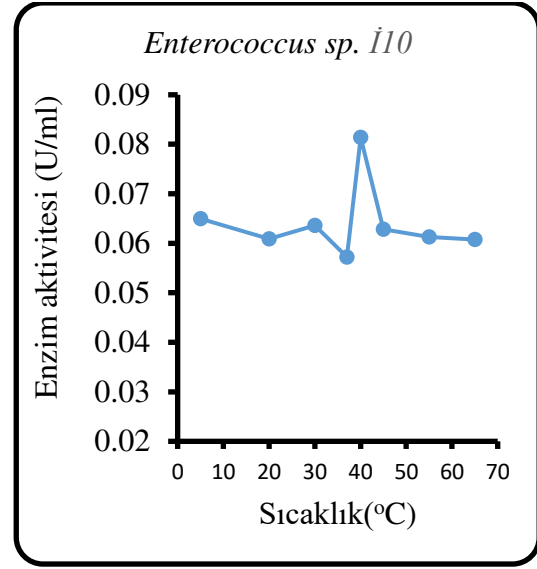
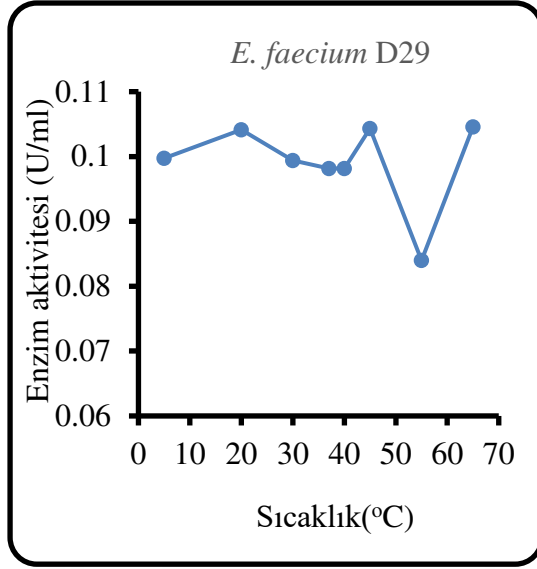
Enzim aktivitesine etki eden sıcaklık, pH, çeşitli katyon ve sürfektanların etkisi belirlenmiştir.

3.9.1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi bakterilere göre değişmiştir. *E. faecium* E66, *E. durans* E114'den elde edilen kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler enzim 40-45°C'de maksimum aktivite gösterirken *E. faecium* D22 ve *E. faecium* M48'e ait kısmi saflaştırılmış enzimin en yüksek aktivitesi 30°C'de elde edilmiştir. *E. faecium* A4 ve *E. faecium* M93 izolatlarına ait ekstrasellüler lipaz enzimi ise 40°C'de en yüksek aktivitesini göstermiştir (Bkz. Şekil 3.10). *E. durans* E114, *E. faecium* D22, *E. faecium* M93, *E. faecium* E68 ve *E. durans* E1141'e ait ekstrasellüler enzimlerin aktivitesi 45°C'den daha yüksek sıcaklıklarda azalırken diğer bakterilere ait ekstrasellüler enzimlerin aktivitesi 50°C'den sonra biraz düşse 55-65°C stabil kalmıştır (Bkz. Şekil 3.10).



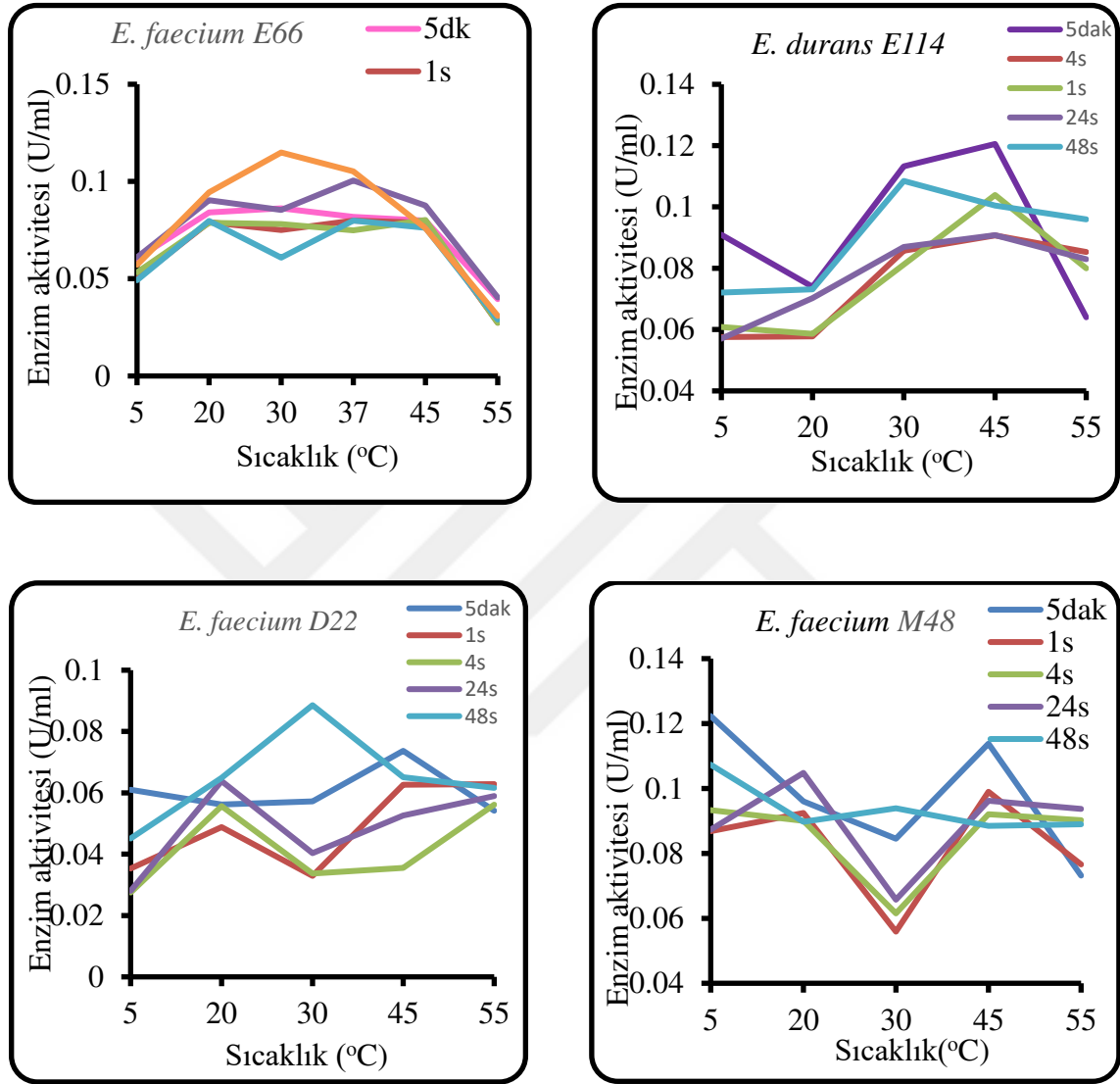
Şekil 3.10. *Enteroccus spp.* lere ait ekstrasellüler lipaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



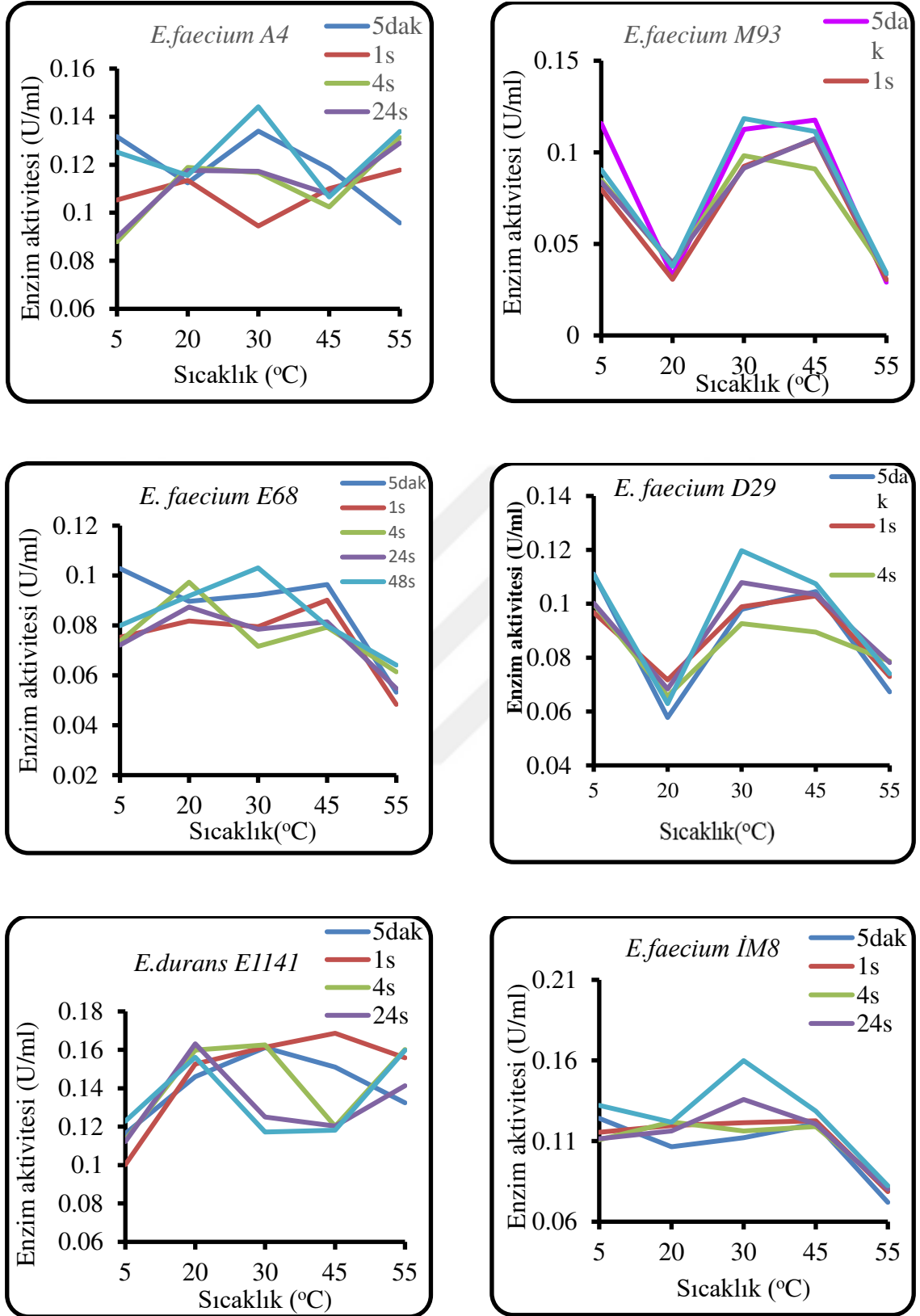
Şekil 3.10. (Devam) *Enterococcus spp.* lere ait ekstrasellüler lipaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Farklı sıcaklıklarda 5dk, 1s, 4s, 24 ve 48s bekletilen ekstrasellüler lipaz enzimlerinin sıcaklık direnci farklı olmuştur. *E. faecium* E66, *E. faecium* M93, *E. faecium* D29 ve *E. faecium* İM8 ‘a ait ekstrasellüler lipaz enziminin aktivitesi farklı sıcaklıklarda düşsede stabil kalmıştır. En düşük aktivite ise 20°C’de saptanmıştır. Elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimin sıcaklık direncine bakıldığında 55°C’de bekleme sürelerinin hepsinde *E. faecium* E66 ait ekstrasellüler enzimin aktivitesi düşmüştür. *E. faecium* D22

ve *E. durans* E1141 'a ait kısmi saflaştırılmış lipaz enzimlerinin aktivitesi 20°C ve 55°C'de aynı kalmıştır (Bkz. Şekil 3.11).



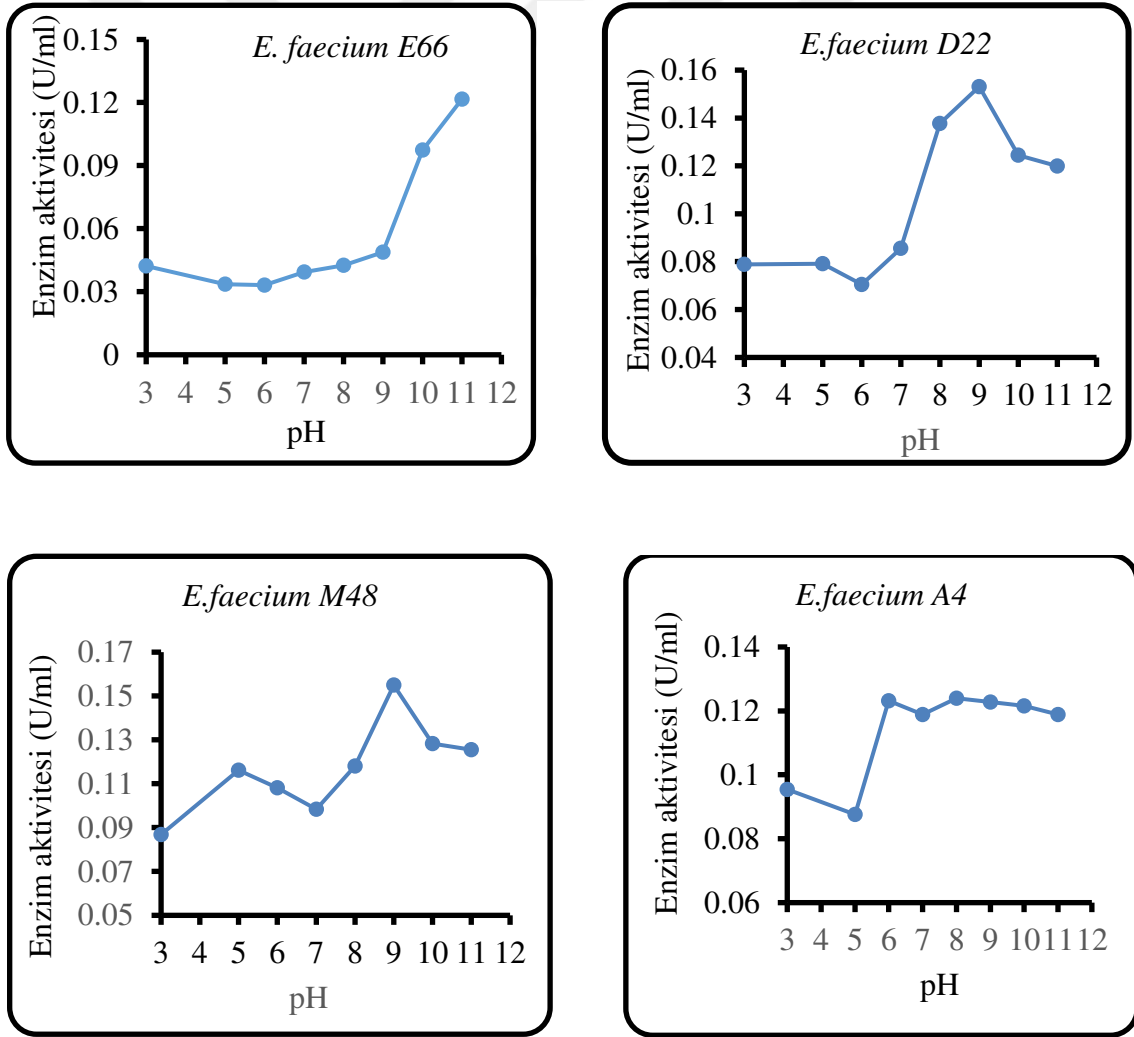
Şekil 3.11. *Enterococcus* spp. lere ait ekstrasellüler lipaz enziminin farklı sıcaklıklarda farklı bekleme sürelerine göre sıcaklık direnci



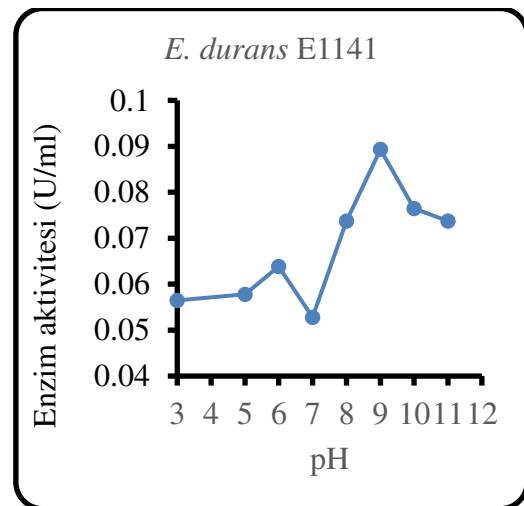
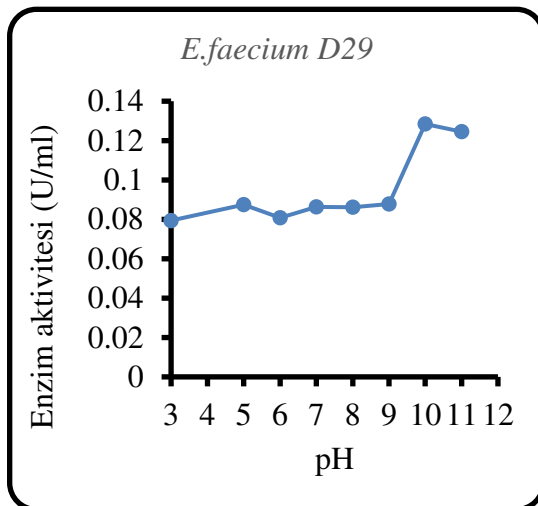
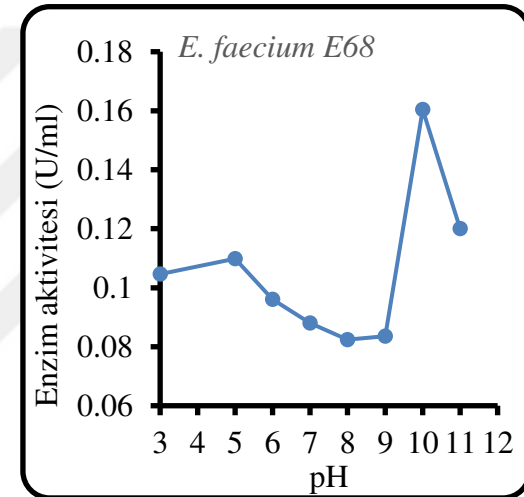
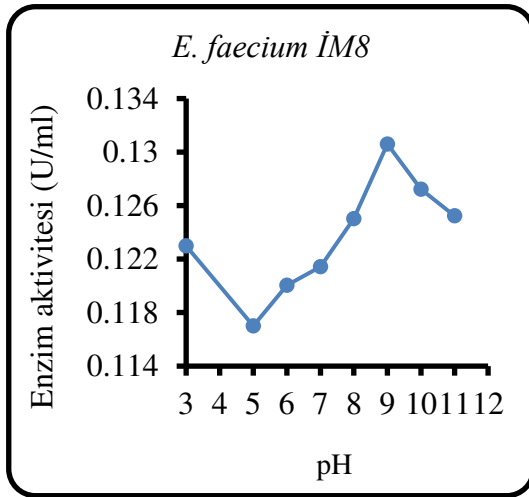
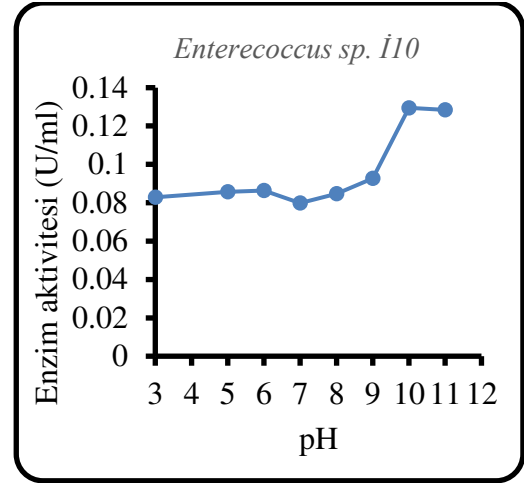
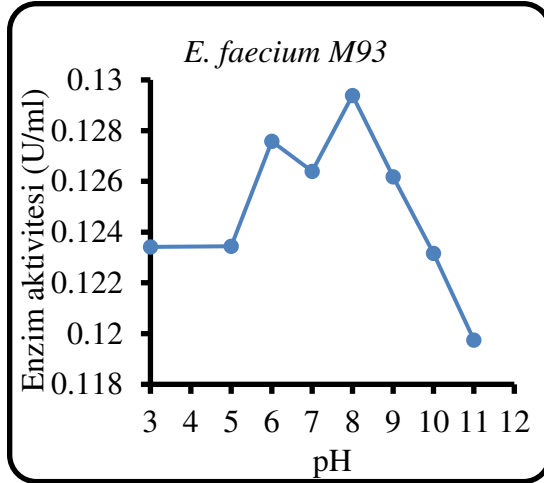
Şekil 3.11. (Devam) *Enterococcus* spp. lere ait ekstrasellüler lipaz enziminin farklı sıcaklıklarda farklı bekleme sürelerine göre sıcaklık direnci

3.9.2. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesi

Farklı tamponlar kullanılarak hazırlanan *Enterococcus* spp. ait ekstrasellüler lipaz enzim aktiviteyi asidik ve nötr pH'da düşükken pH alkaliye doğru çıktıkça enzimlerin aktiviteyi artışı saptanmıştır. Bu durum bakteriler arasında farklılık göstermiştir. *E. faecium* E66 ait ekstrasellüler enzim en yüksek aktivitesini pH 11 gösterirken, *E. durans* E114, *E. faecium* D22, *E. faecium* M48 izolatlarına ait enzim pH 9'da en yüksek aktiviteyi göstermiştir. *E. faecium* M93 izolatına ait enzim ise pH 8'de en yüksek aktivite göstermiştir. Bu değerden sonra pH'nın yükselmesi ile enzim aktivitesini kaybetmektedir. *E. faecium* A4'de ise pH 6.5'dan sonra enzim aktivitesinde bir kayıp gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 3.12).

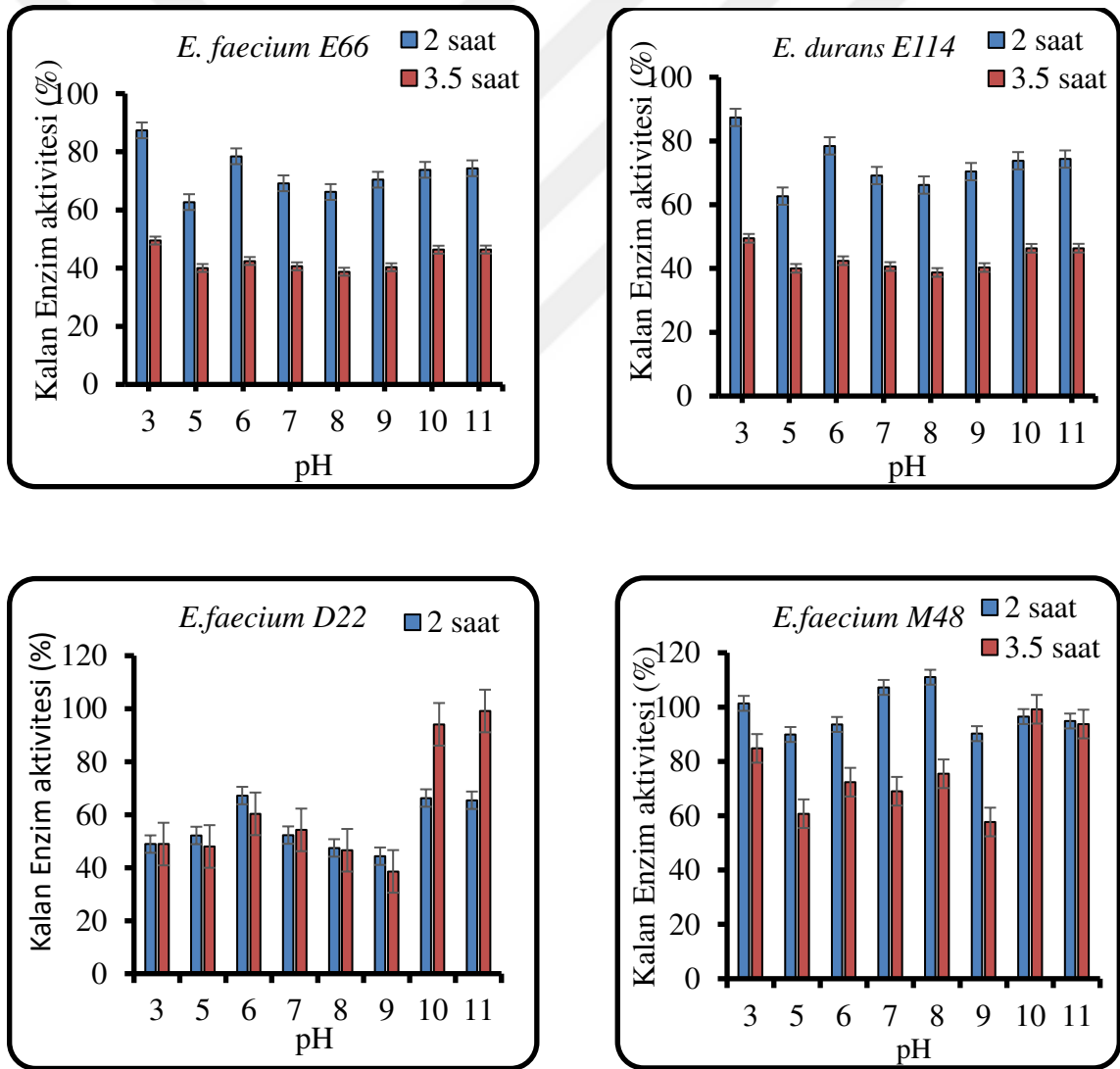


Şekil 3.12. *Enterococcus* spp. ait lipaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

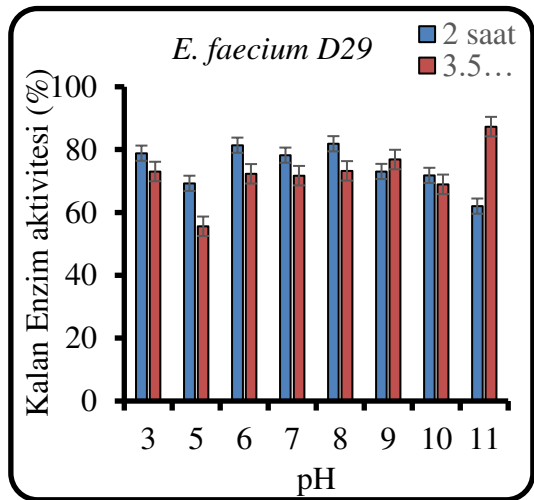
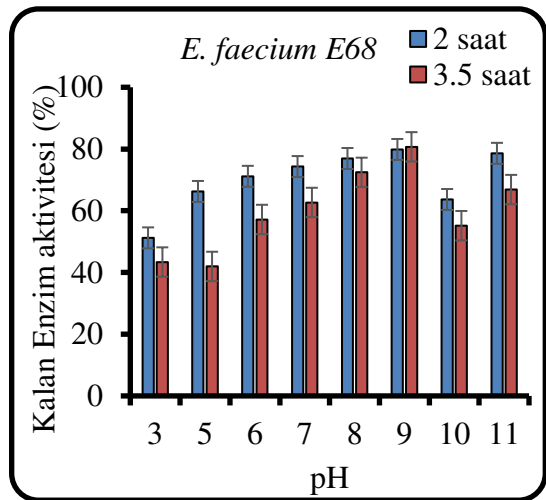
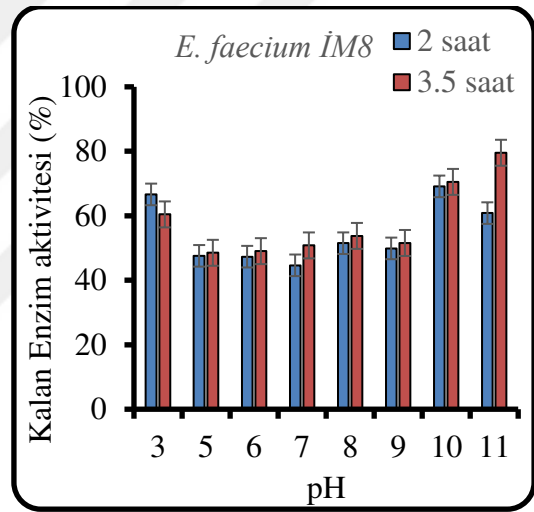
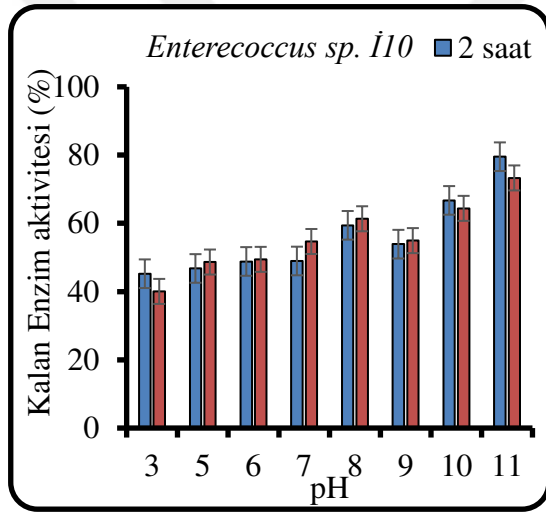
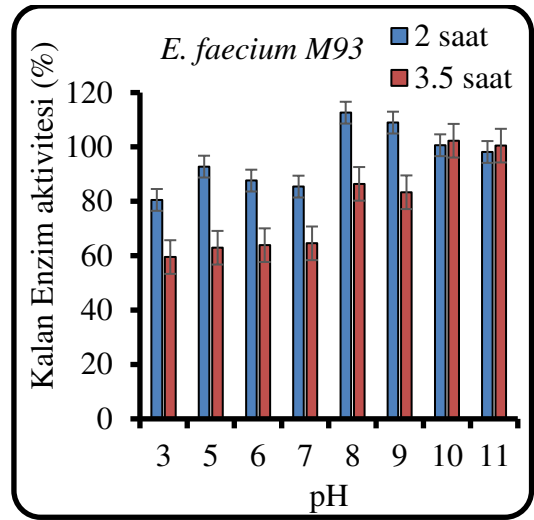
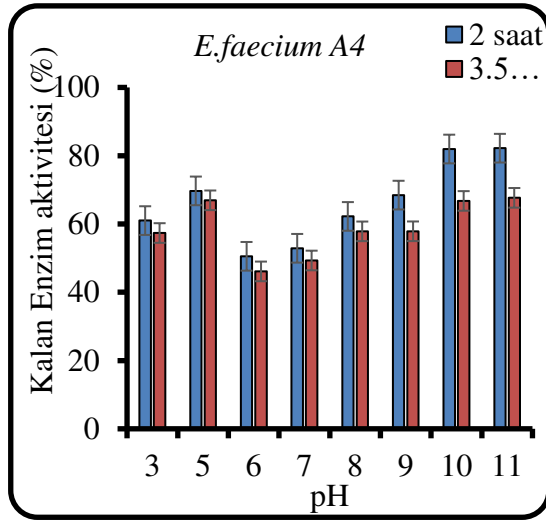


Şekil 3.12. (Devam) *Enterococcus* spp. ait lipaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Enterococcus spp. 'den elde edilen ekstrasellüler enzimler kırkbeş derecede 2 saat ve 3,5 saat bekletilerek enzimlerin pH direnci belirlenmiştir. Farklı pH'larda 2 ve 3,5 saat bekleme süresinde enzimde önemli aktivite kaybı gözlenmiştir. Aktivite kaybı genellikle 3,5 saat bekleme süresinde daha fazla olmuştur. *E. faecium* D22 ait ekstrasellüler lipaz enziminde düşük pH larda aktivite kaybı %60 civarında olurken alkali pH'da bu oran %20-%40 arasında değişmiştir. İzolatlara göre değişmekle beraber alkali pH'da bekleme sürelerinde daha düşük aktivite kaybı olmuştur (Bkz. Şekil 3.13). *E. faecium* M93 ve *E. faecium* M48 ait ekstrasellüler enzimde pH 8, pH 9 ve pH 7-8 de iki saat bekleme süresinde aktivitede artış gözlenmiştir.



Şekil 3.13. Lipaz aktivitesinin pH direnci



Şekil 3.13. (Devam) Lipaz aktivitesinin pH direnci

3.9.3. Enzim aktivitesi üzerine katyon, deterjan ve yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi

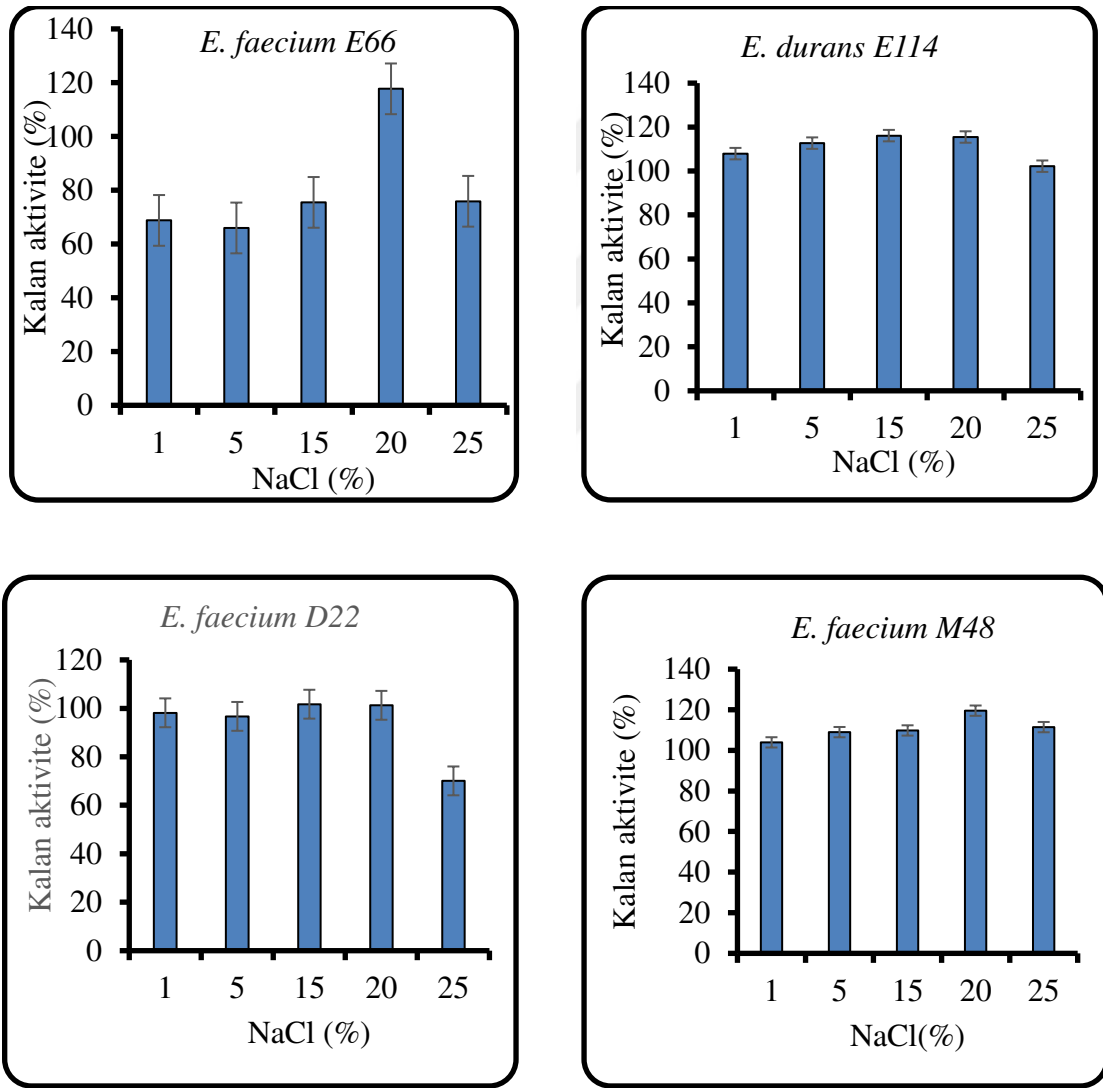
Yüzde 1 olarak ilave edilen CaCl_2 , MnCl_2 , NiCl_2 , KCl , ZnCl_2 , MgCl_2 gibi katyonların farklı izolatlardan elde edilen enzimlerin aktivitesi üzerine etkisi farklı olmuştur. Sadece HgCl_2 enzim aktivitelerinin hepsini inhibe etmiştir. CaCl_2 ve CuCl_2 E66 ait lipazda aktivite artmasına neden olurken diğer katyonlar aktivite de düşmeye neden olmuşlardır. EDTA ve üre gibi maddeler de aktiviteyi artırmıştır. Yüzey aktif maddelerden tritonX-100 ve tween 20 aktivitede düşmeye neden olmuştur. E114'de enzim aktivitesinde artış görülmüştür. Deterjanlardan ise tween 20 enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. *E. durans* E114 ait lipaz da ise tween 20 ve HgCl_2 hariç test edilen katyonlar, çözültüler ve yüzey aktif maddeler enzim aktivitesinde değişen oranlarda artmaya neden olmuştur (Bkz. Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Çeşitli katyon ve yüzey aktif maddelerin lipaz aktivitesi üzerine etkisi

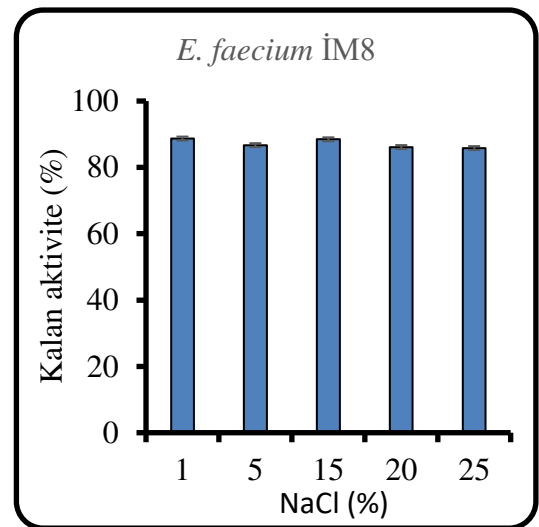
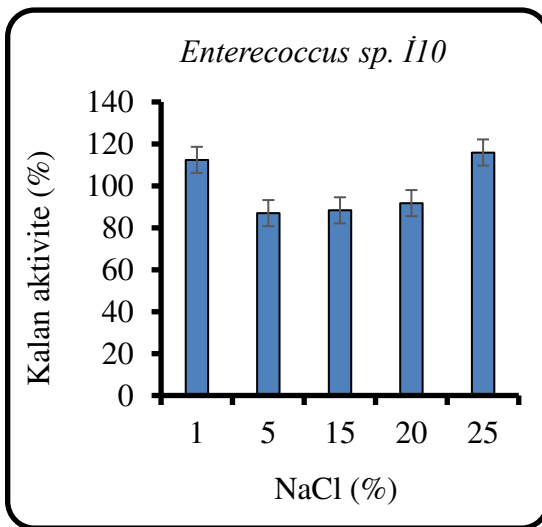
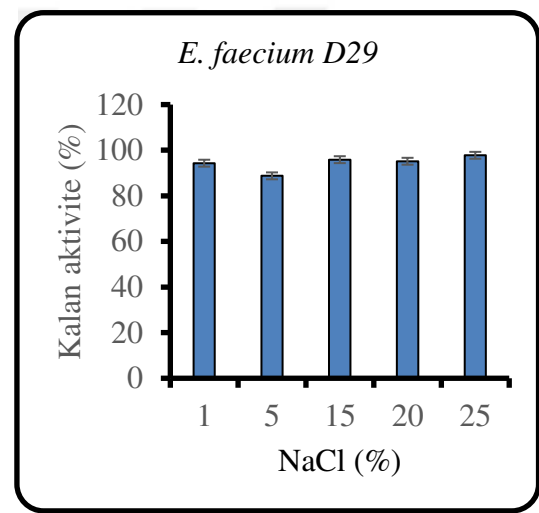
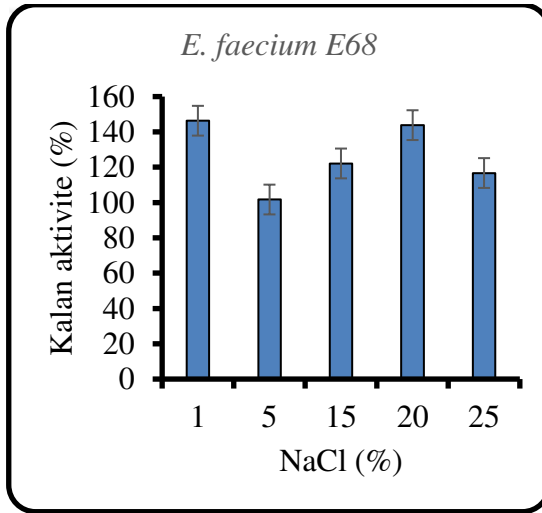
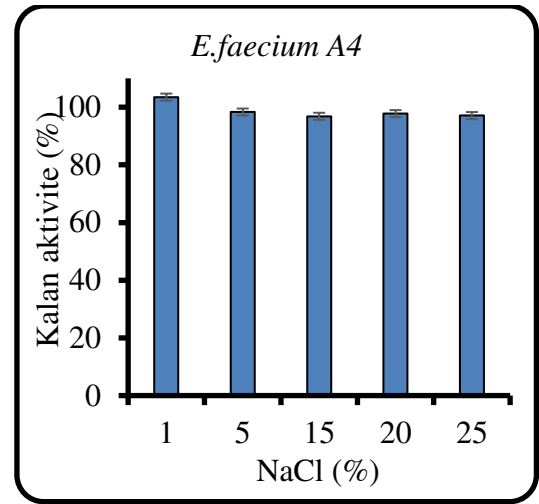
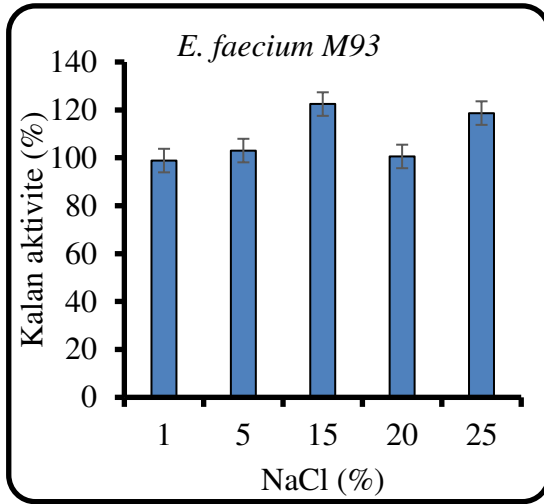
Uygulama	Kalan aktivite (%)										
	E66	E114	D22	M48	M93	A4	E68	İ10	D29	İM8	E114
											1
Kontrol	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100	100	100	100	100	100
EDTA	114.6	105.4	92.0	99.7	92.6	102.6	101.4	97.1	89.2	83.5	99.9
Üre	142.2	107.1	99.6	99.4	109.3	102.1	128.7	89.9	93.6	86.0	101.1
HgCl_2	44.7	45.7	37.6	28.5	36.6	46.5	41.7	46.8	39.5	25.6	42.6
CaCl_2	115.2	109.9	87.0	94.4	101.8	99.8	104.7	93.5	93.2	85.9	98.1
MnCl_2	88.1	120.5	94.3	95.9	108.5	97.4	112.8	95.1	92.2	83.4	97.6
CuCl_2	116.7	119.0	98.4	89.7	95.1	104.9	133.9	102.3	96.5	86.3	97.9
NiCl_2	93.5	103.1	94.5	93.5	99.7	104.2	110.0	97.8	90.5	86.1	99.5
KCl	70.9	106.2	99.0	101.9	98.9	104.3	130.8	104.1	90.9	77.7	98.5
ZnCl_2	63.7	108.0	104.0	109.3	107.2	100.7	105.2	101.9	86.2	80.2	97.4
MgCl_2	63.3	119.7	100.2	104.9	92.4	98.0	150.9	95.3	94.7	73.0	97.7
SDS	94.5	90.9	81.7	75.0	83.6	84.7	87.3	85.9	76.4	72.1	81.7
TritonX-100	63.3	102.4	59.3	104.0	100.1	95.1	81.5	89.6	87.0	78.2	98.8
Tween20	56.9	94.0	83.4	95.3	103.1	90.4	104.6	97.3	90.1	86.6	100.5
Tween80	101.3	104.6	97.1	109.8	94.5	95.7	105.4	86.3	96.3	90.0	99.6

3.9.4. Enzim aktivitesi tuzun etkisinin belirlenmesi

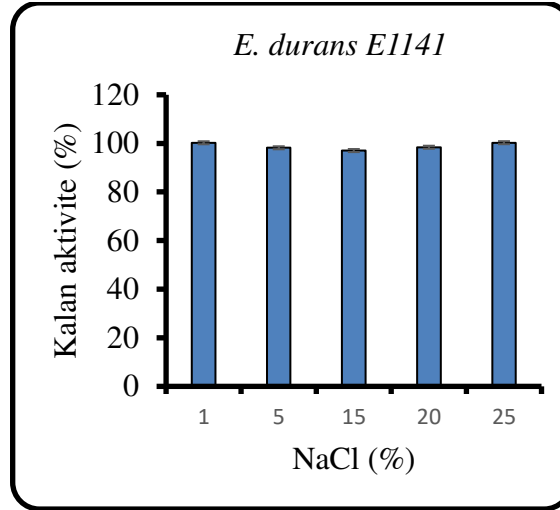
Tuzun etkisi lipaz enzimleri üzerine farklı olmuştur. Enterokoklar ile üretilen lipaz enziminin tuza dirençli olduğu görülmüştür. *E. faecium* E66, *E. faecium* M48'a ait ekstrasellüler enzim halofilik özelliktedir. %20 tuz içeren ortamda en yüksek aktiviteyi göstermiştir. *E. durans* E114 tarafından üretilen enzimin de tuz içeren ortamda yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür. Test bakterilerinin çoğu tuza dirençlidir (Bkz. Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Lipaz enziminin aktivitesi üzerine tuzun etkisi



Şekil 3.14. (Devam) Lipaz enziminin aktivitesi üzerine tuzun etkisi

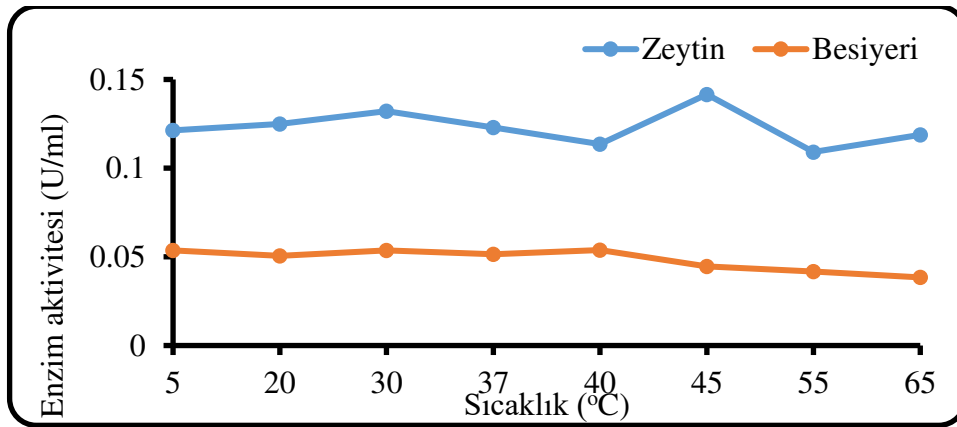


Şekil 3.14. (Devam) Lipaz enziminin aktivitesi üzerine tuzun etkisi

3.10. Zeytin Atığından *E. faecium* E68 ile Elde edilen Lipaz Enziminin Aktivitesi

Zeytin atığı %10 oranında kullanılarak hazırlanan ortamda *E. faecium* E68 ile lipaz enzimi üretilerek elde edilen ekstrasellüler enzim kısmi olarak saflaştırılmıştır. Sıcaklık, pH, çeşitli katyon ve sürfektanların enzim aktivitesine etkisi belirlenmiştir.

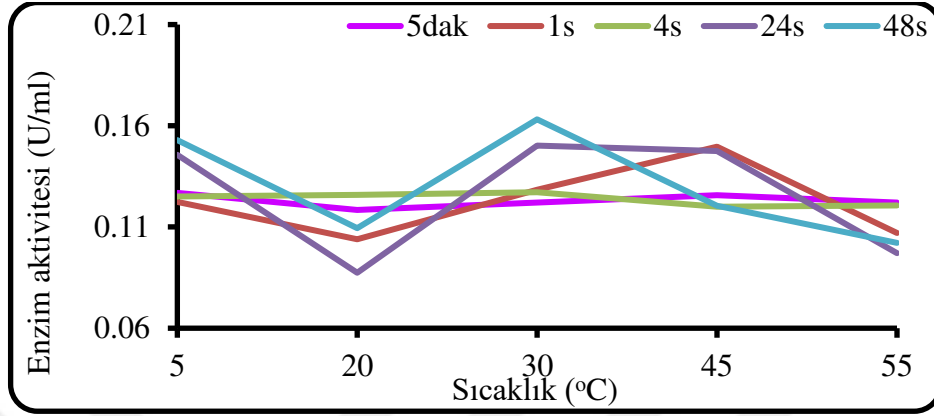
Zeytin atığında *E. faecium* E68 ile elde edilen kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler enzim aktivitesi en yüksek 45°C’de olmuştur (Bkz. Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Zeytin atığında (%10) üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

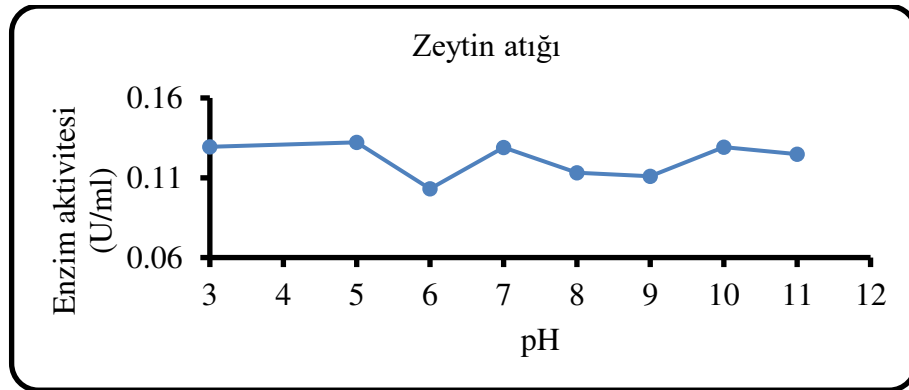
Sıcaklık direnci zamana bağlı olarak değişmiştir. 55-65°C enzim aktivitesi optimum aktivitenin altında olsada stabilitesini korumuştur. Kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler

enzimin aktivitesi 20°C de düşmüştür. Ancak 5°C daha yüksek bir enzim aktivitesi gözlenmiştir. Zamanla aktivitede önemli bir değişme gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Zeytin atığında (%10) *E. faecium* E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enzim aktivitesinin sıcaklık direnci

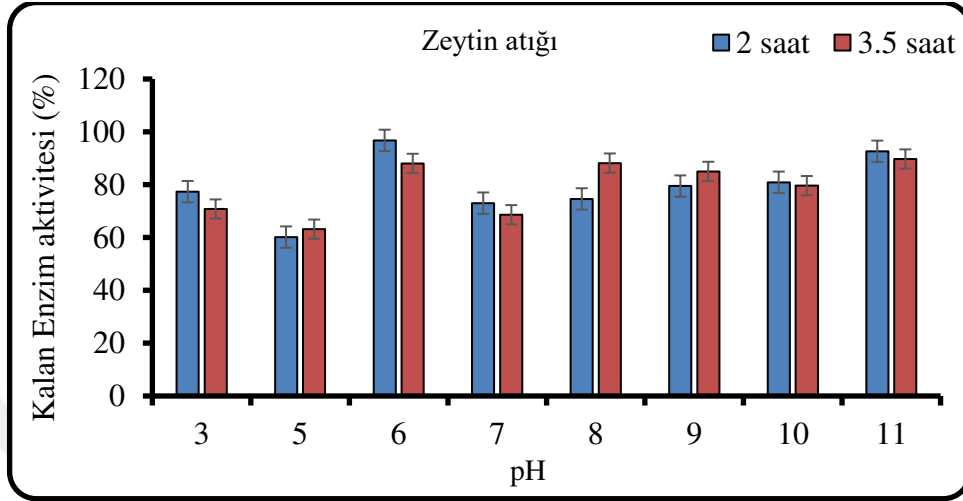
Zeytin atığında üretilen ve kısmi saflaştırılan lipaz enziminin en yüksek aktivitesi pH 7 ve pH 10'da elde edilmiştir (Bkz. Şekil 3.17). En düşük aktivite pH 6'da elde edilirken pH 3'te de enzim daha yüksek aktiviteye sahiptir.



Şekil 3.17. Zeytin atığında (%10) *E. faecium* E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi

Lipaz enziminin pH direncine baktığımızda farklı pH larda 2 saat 45°C de bekletme süresi sonunda enzim aktivitesinde düşme meydana gelmiştir. pH 10 ve 11 de enzim

aktivitesindeki azalma daha düşük olmuştur (%9 ve %21). En fazla düşme pH 5'te olmuştur (%40 ve %37) (Bkz. Şekil 3.18).



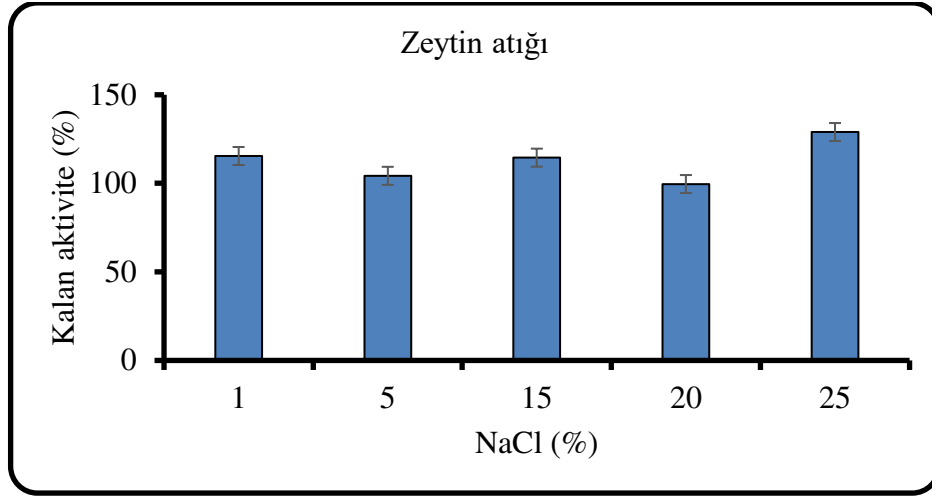
Şekil 3.18. Zeytin atığında (%10) *E. faecium* E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin farklı pH'larda 45°C'de bekleme süresi sonunda kalan enzim aktivitesi

Zeytin atığı kullanılarak elde edilen enzimin aktivitesini katyonlardan Mg^{+2} artırırken diğer katyonlar azalmaya neden olmuştur. Yüzey aktif maddelerden ise SDS, Triton-X 100 ve Tween 80'nin enzim aktivitesini artırdığı gözlenmiştir (Bkz. Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. Zeytin atığında (%10) *E. faecium* E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin farklı katyon ve sürfektanların enzim aktivitesine etkisi

Kalan aktivite (%)													
EDTA	Üre	HgCl2	CaCl2	MnCl2	CuCl2	NiCl2	KCl	ZnCl2	MgCl2	SDS	TritonX-100	Tween20	Tween80
108.4	92.8	48.9	79.3	88.2	85.8	86.1	90.9	89.2	123.3	91.2	120.5	93.5	128.5

Zeytin atığı kullanılarak elde edilen enzimin tuz direnci yüksektir. Tuz konsantrasyonlarından enzim aktivitesi etkilenmemiştir. Hatta enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir (Bkz. Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Zeytin atığında (%10) *E. faecium* E68 ile üretilen kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin aktivitesine tuzun etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada, Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında daha önceki çalışmalarda çeşitli peynir örneklerinden izole edilmiş %20'lik gliserol içerisinde -86°C'de saklanan toplam 50 laktik asit bakterisi lipaz üretimi açısından incelenmiştir.

Lipaz üretimi, açısından taranan 50 izolatın en iyi lipaz aktivitesi gösteren 11 izolat en yüksek lipaz aktivitesi göstermiştir. Bu izolatların yapılan tanımlamasında 8'inin *E. faecium* 2'sinin ise *E. durans* olduğu belirlenmiştir. *Enterococcus spp.* fakültatif anaerobik, katalaz negatif gram-pozitif kok şeklindeki bakterilerdir. Mikroskop altında ayrı ayrı, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde görülürler. *Enterococcus spp.* 10-45°C arasındaki sıcaklıklarda, %6.5 NaCl içeren ortamlarda ve pH 9.6'da gelişmektedir (Franz vd., 2003). *E. faecium*, bağırsak yolunda, ağız boşluğu ve gastrointestinal sistemde bulunurlar. *Enterococcus spp.* lipolitik ve esterolitik aktiviteye sahip olup, uçucu aromatik bileşikler sentezleme özelliğine sahip olduğu için gıdalarda starter kültür olarak kullanılmaktadır (Giraffa, 2003). *Enterococcus spp.* peynirlerin olgunlaştırılmasında (Franz vd., 2003), lipolitik ve proteolitik aktivitesi nedeniyle sucuk aromasının oluşmasına (Hugas vd., 2003) katkıda bulunduğu için geniş çapta kullanılmaktadır. Peynir ve sucuk gibi ürünlerin organoleptik özelliklerini geliştirirler (Franz vd., 2003). Bu özellikleri nedeniyle biyoteknoloji endüstrisinde büyük öneme sahip bakterilerdir.

Lipaz üreten bakteriler arasında *L. plantarum* (Carrasco-Lopez vd., 2009), *Bacillus sp.* (Lee vd., 2015), *Achromobacter sp.* (Toshifumi vd., 2001), *Alcaligenes sp.* (Masahiro vd., 2009), *Staphylococcus sp.* (Xie vd., 2012) ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Ancak mikrobiyal kaynaklar arasında, sadece birkaç bakteri lipazı incelenmiştir ve saflaştırılmıştır (Gupta vd., 2004). Gupta vd., (2004) ve Javed vd., (2018) bakteri lipazlarının genellikle hücre dışı olarak üretilmelerine karşın hücre içi veya membrana bağlı da olabildiklerini bildirmişlerdir. Önceki çalışmalarda da (Piatkiewicz, 1987; Kamaly vd., 1990; Meyers vd., 1996) laktik asit bakterilerinin intrasellüler lipazları gösterilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin lipaz üretimleri tween 20, tween 80, tributrin, zeytinyağı ortamında test edilmiştir. İzolatların 11 tanesinin tributrin içeren ortamda lipaz ürettikleri saptanmıştır. Tween 80 ve zeytinyağında lipaz üretimi saptanamamıştır. Phongsopitanun vd., (2015) *Lactobacillus pentosus* ve *Pediococcus lolii*'nin tween 80 içeren ortamda

yüksek miktarda lipaz ürettiğini bildirmişlerdir. Tween 20, tween 40, tween 60 ve tween 80 içeren ortamlarda laktik asit bakterilerinin farklı oranlarda lipaz ürettiğini bildirmişlerdir. Ramyasree ve Dutta, (2013) *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum*'un substrat olarak limon yağı, zeytinyağını ve gül yağını kullanabildiğini bildirmiştir. Lopes vd., (2002) *L. plantarum* için en iyi substratın tributrin olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar bakterilerin zeytinyağını substrat olarak kullanamadığını bildirmişlerdir. Esteban-Torres vd., (2015) rekombinant olarak ürettikleri *L. plantarum*'un en yüksek aktivitesini tributrinde gösterdiğini bildirmişlerdir. Tributrin gerçek yağ olup doğal yağlarda meydana gelen en basit trigliserittir. Trigliseridler, gliserol ve üç uzun zincirli yağ asidinden oluşmuştur. Tributrin suda kolay dispers olduğu için bu tip çalışmalarda çok tercih edilmektedir (Samad vd., 1989). Meyers vd., (1996) triolein, tributrin ve tereyağda laktik asit bakterilerinin lipolitik özelliklerini test etmişlerdir. Araştırmacılar en fazla trioleinin test edilen laktik asit bakterileri tarafından hidrolize edildiğini bildirmişlerdir. Tereyağını çok az sayıda laktik asit bakterisinin hidrolize edebildiğini bildirmişlerdir. Bu izolatların *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus*'a ait türler olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da test ettiğimiz izolatların hiçbiri zeytinyağını hidrolize edememiştir. Sadece tributrinde aktivite göstermişlerdir. Ancak, Lopes vd., (2002) tributrinin spesifik olmadığını lipazlar ve esterazların ikisini de ayırdığını bildirmişlerdir. Bu nedenle tributrinin ilk aşamada kullanılmasının daha uygun olacağını rapor etmişlerdir. Sonrasında Javed vd., (2018) ve Esteban-Torres vd., (2015) de bildirdikleri gibi lipaz aktivite tayini için, p-NPP kullanılabilir. Laktik asit bakterilerinin enzim potansiyelleri özellikle et ve süt ürünlerinde arzu edilen tat ve aromanın elde edilmesinde büyük önem taşımaktadır (Papamanoli vd., 2003).

Yüksek lipolitik aktivite gösteren suşlar seçilerek lipaz enzim üretimi üzerine sıcaklık, pH, çalkalama, fermentasyon süresi ile karbon ve azot kaynaklarının etkisi belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinde lipaz üretimi bakterilere ve bulundukları besiyeri ortamı özelliklerine göre değişmektedir. Seçilen *Enterococcus spp.* için 120 rpm çalkalama hızında 48 saat inkübasyon süresi optimum olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık 45°C, pH 6.5, azot kaynağı olarak %5 pepton, karbon kaynağı glikoz olarak saptanmıştır. Bu faktörler mikroorganizmalara göre değişebilmektedir. Yapılan benzer çalışmalarda bakterilere göre değişen koşullar saptanmıştır. Ramyasree ve Dutta, (2013) *L. lactis*, *L. brevis* ve *L. plantarum* için optimum inkübasyon süresini bulgulardaki gibi

48 saat olarak bildirilmiştir. Lipaz aktivitesi fermentasyon süresine bağlı olarak artmıştır. Ancak aktivite belirli bir fermentasyon süresinden sonra düşmüştür. Aktivitedeki azalmanın nedeni ortamdaki besin maddelerinin azalması olabileceği gibi ortamda bakteriyel toksinlerin birikmesi de olabilir. Maksimum aktivite 0.6 U/ml ile *E. faecium* A4’de elde edilmiştir. Ramyasree ve Dutta, (2013) *L. lactis*, *L. brevis* ve *L. plantarum* lipazı için bakterilerin gelişme koşullarında optimum pH’ı 5-5.5 sıcaklığı da 30-35°C olarak bildirmişlerdir. *Lactobacillus acidophilus* için optimum pH 5 olarak belirlenmiştir. Laktobasilluslar’da pH aralığı 4.0-7.0 arasında değişebilmektedir. Bu değerler çalışmadaki bulguların altındadır. Bu durum mikroorganizmaların farklılığından kaynaklanmaktadır. Sıcaklık mikroorganizmaların metabolik regülasyonunda önemli bir faktördür. pH’ta olan değişikliklere karşı bakterilerin metabolik aktiviteleri çok hassastır. Lipaz üretimi de bundan etkilenmektedir. Optimum pH’tan çok yüksek ve çok düşük pH üretimi önemli ölçüde etkilemektedir (Kumar ve Kanwar, 2012). *Enterococcus spp.* pH 9.6’da geliştiği için çalışmada bulunan pH değeri Ramyasree ve Dutta, (2013)’nın verilerinden daha yüksek olarak bulunmuştur.

Karbon kaynağı olarak glikoz, azot kaynağı olarak pepton içeren substratlarda en yüksek lipaz üretimi elde edilmiştir. Laktik asit bakterileri ile lipaz enzimi üretiminde karbon kaynağı olarak glikoz azot kaynağı olarak pepton kullanıldığında en yüksek aktivite elde edildiği birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (El-Sawah vd., 1995; Bhargavi vd., 2010). Araştırmacıların bu durumun tek karbon kaynağı ve lipid indüserin bulunması durumunda elde edildiğini bildirmişlerdir. Bakterilerin metabolik aktiviteleri düşük sıcaklıkta yavaşlamaktadır (Amato ve Christner, 2009; Uppada vd., 2012). Petrovic vd., (1990) ve El-Sawah vd., (1995)’de ekstrasellüler lipaz üretimi için en uygun karbon kaynağını glikoz olarak saptamışlardır. Ayrıca, azot kaynağı olarak bu çalışmada Sangeetha vd., (2008)’de elde edilen bulgularla uyumlu olarak pepton saptanmıştır.

Laktik asit bakterileri diğer potansiyel lipaz üretici bakterilere göre daha düşük lipaz üretmektedirler. Phongsopitanun vd., (2015) bu bulguya benzer bulgular elde ettiklerini bildirmişlerdir. Buna karşın Stoyanovski vd., (2013) et ürünlerinden izole ettikleri *L. plantarum*, *Lactobacillus sakai*, ve *Lactobacillus* izolatlarının daha yüksek lipaz üretimine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada laktik asit bakterileri ile elde edilen düşük lipaz ürünü sadece ekstrasellüler kısmın kullanılmasından da kaynaklanabilir. Meyers vd., (1996) laktik asit bakterilerinden elde edilen lipazın

intraselüler olduğunu bildirmişlerdir. Chander ve Fuerstenau, (1979) *Enterococcus faecalis*'in hücre içi özütlerinin kısa zincirli yağ asitlerine karşı lipolitik aktivite gösterdiği için üretilen enzimin bir endoenzim lipaz olduğunu da ileri sürmüşlerdir. Singh vd., (1973) *Lactobacillus casei* ve *Lactococcus lactis* lipazları incelemiş ve enzimlerin hücre içi olduğunu tespit etmişlerdir. Piatkiewicz, (1987) *L. lactis* ve *L. lactis* sp. *diacetylactis* tarafından üretilen lipaz enziminin intraselüler veya hücre duvarı ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Bu bulguların aksine bu çalışmada ekstraselüler lipaz aktivitesi saptanmıştır.

Lipaz üretimi fizikokimyasal ve biyolojik faktörlerden etkilenmektedir. Ortamın pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, substrat tipi, mikroorganizmanın tipi gibi. Laktik asit bakterilerinin lipaz ürettiği daha önce yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (Bhargavi vd., 2010; Phongsopitanun vd., 2015; Dinçer ve Kıvanç, 2018).

Enterococcus spp. ait ekstraselüler lipaz enziminin en yüksek aktivitesi 40-50°C arasında bakteriler geliştirildiğinde olmuştur. Benzer olarak Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium*'a ait lipaz enzimi aktivitesinin en yüksek 40°C'de olduğunu aktivitenin 30-70°C de stabil olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar enzim aktivitesinin 80-100°C de stabil olduğunu 100°C den sonra enzim aktivitesinin kalmadığını bildirmişlerdir. Esteban–Torres vd., (2015) *L. plantarum*'a ait esteraz enziminin maksimum aktivitesini 40°C olarak rapor etmişlerdir. Araştırmacılar 5°C'de enzim aktivitesinin ancak %40'ını gösterdiğini, ayrıca elde edilen enzimin 45°C'de 20 saat inkübasyondan sonra enzim aktivitesinin %80'inin kaldığını, 55°C ve 65°C'de 10 saat inkübasyondan sonra ise aktivitenin %40'ının kaldığını bildirmişlerdir. Eko Sukohidayat vd., (2018) *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC 8293 ait lipaz enziminin maksimum aktiviteyi 30-37°C de gösterdiğini saptamışlardır. Bu sıcaklığın üzerinde aktivitenin düştüğü bildirilmiştir. Benzer olarak *L. plantarum* 2739 ait enzimin maksimum aktivitesi 35°C olarak gözlenmiştir (Gobbetti vd., 1997). Bu değerler çalışmadaki bulguların altındadır. Laktik asit bakterileri arasında tür farklılığı bunun nedeni olabilir. Sıcaklık, enzimin şeklini değiştirerek ve moleküler hareket hızını değiştirerek enzim aktivitesini etkileyebilir (Enger vd., 2012). Çalışmada, düşük sıcaklıkta (5°C) 48 saat süresince enzim aktivitesi stabil kalmıştır. Bu durum gıda endüstrisinde önem taşımaktadır. Gıdaların et ve süt ürünlerinin olgunlaşma sırasında uzun süre düşük sıcaklıkta tutulduğu göz önüne alındığında arzu edilen aromanın oluşmasında bu enzim rol oynayabilir. Benzer bulgular

L. plantarum için de verilmiştir (Esteban-Torres vd., 2015). Papon ve Talon, (1988) *Lactobacillus curvatus* ait intrasellüler enzimin 4°C stabil kaldığını bildirmişlerdir. Peynir gibi gıdaların depolama sıcaklıklarında lipaz aktivitesi önem taşımaktadır (Papon ve Talon, 1988). Bu çalışmada A4, D29 ve I10 izolatlarına ait ekstrasellüler enzimler düşük sıcaklıkta olduğu gibi yüksek sıcaklıkta da maksimum aktivite göstermiştir. Benzer bulgular *L. plantarum* için de bildirilmiştir (Esteban-Torres, 2015). Çalışmada depolama süresi 48 saat ile sınırlı kalmıştır. Bunun 20-30 gün gibi bir süre ile yapılması daha iyi sonuç verecektir. Lopes vd., (2002) *L. plantarum* 12028 ile üretilen enzimin düşük sıcaklıkta tutulan enzimin 20 gün aktivitesini koruduğunu ve aktivitenin çok yavaş azaldığını bildirmişlerdir. Lipaz enziminin sıcaklık stabilitesi gıda endüstrisinde önem taşımaktadır (Choo vd., 1998). Enzimlerin 55°C’de 24 ve 48 saat inkübasyonda enzimler stabilitesini korumuştur. Özellikle *E. faecium* A4, *E. faecium* E114, *E. faecium* D22 ve *E. faecium* M48’de ait ekstrasellüler enzimlerin aktivite kaybı olmamış ya da çok düşük olmuştur. Yüksek sıcaklıkta (70°C) aktif bölgeler, substrata uyamayacak şekilde değişir ve bu sıcaklıkta enzim denatüre olur. Sonuçta enzim aktivitesi büyük ölçüde azalır (Toole ve Toole, 2004).

Enzim aktivitesini etkileyen diğer bir faktör de pH’tır. pH, her enzimin, enzimin en iyi çalıştığı optimum pH’a sahip olması nedeniyle enzim aktivitesini etkileyebilmektedir. *Enterococcus spp.* ait ekstrasellüler enzimlerin aktiviteleri alkali ortamda maksimum olmuştur. En yüksek aktivite değerleri bakterilere göre değişmiştir. *E. faecium* E66 ait ekstrasellüler enzim en yüksek aktivitesini pH 11 de gösterirken, *E. durans* E114, *E. faecium* D22, *E. faecium* M48 izolatlarına ait enzim pH 9’da en yüksek aktiviteyi göstermiştir. *E. faecium* M93 izolatına ait enzim ise pH 8’de en yüksek aktivite göstermiştir. Bu değerden sonra pH’ın yükselmesi ile enzim aktivitesi kaybolmuştur. Benzer olarak Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium* lipazı için optimum pH’ı 10.8 olarak bildirmişlerdir. pH 7-12 arasında iken enzim aktivitesinin stabil kaldığını asidik pH’ta ise aktivite kaybı olduğunu rapor etmişlerdir. *E. faecium* A4’a ait ekstrasellüler enzim aktivitesinde pH 6’dan sonra bir aktivite azalması görülmemiştir. Lipazlar dan tributrin esterazlar *L. plantarum*’dan izole edilmiştir (Gobetti vd., 1996, 1997). Bu enzimin optimal pH değerinin 7 civarında olduğu bildirilmiştir. Esteban –Torres vd., (2015)’de *L. plantarum*’dan elde edilen esteraz enzimi için optimum pH’ı 7 olarak bildirmişlerdir. Andersen vd., (1995) ise *L. plantarum* MF32’den elde edilen lipaz aktivitesi için optimum

pH'nın bu çalışmada ki bulgular gibi alkalın ortam (pH 9.3) olduğunu bildirmişlerdir. Eko Sukohidayat vd., (2018) *L. mesenteroides subsp. mesenteroides ATCC 8293* ait lipaz enziminin maksimum aktiviteyi pH 8.0'de gösterdiğini gözlemişlerdir. Benzer bulgu *Lactobacillus sp. G5* içinde bildirilmiştir (Rashmi ve Gayathri, 2014). Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium*'a ait lipaz enzimi aktivitesinin pH 7-12 arasında stabil kaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada optimum pH değerlerinden sonra aktivitede azalma görülmüştür. Araştırmacılar asidik koşullarda lipaz aktivitesindeki düşüklüğün Ca^{+2} iyonlarının kaybı ile enzimin aktif bölgesindeki koordinasyon ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Pratuangdejkul ve Dharmsthiti, 2000). Genel olarak, bakteriler tarafından üretilen lipazlar nötr veya alkalın pH optimumuna sahiptir. Optimum pH'ların üstünde ve altındaki değerlerde enzim aktivitesi düşebilir. pH'daki herhangi bir değışiklik, enzimler üzerindeki elektrik yüklerinin değışmesine neden olabileceğinden enzimin üçüncül ve kuaterner yapılarını stabilize eden iyonik bağları etkileyebilmektedir. Bu durum ise enzimin üç boyutlu yapısında ve aktivitesinde değışmeye neden olur. Sonuçta enzim aktivitesi düşer (Eko Sukohidayat vd., 2018).

Metal iyonlarının varlığı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Metal iyonları enzimle bağlandığında enzimin katalitik fonksiyonunu etkileyebilir.

Ca^{+2} iyonları, *E. faecium E66*, *E. durans E114* ve *E. faecium M93*'ten elde edilen ekstrasellüler lipaz enzimlerinin aktivitesini artırırken diğerk bakterilerden elde edilen ekstrasellüler enzimlerde aktivite üzerine etkili olmamıştır. Lopes vd., (2002) laktik asit bakterilerine ait lipaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'ın etkili olmadığını rapor etmişlerdir. Baysal vd., (2005) ise *Bacillus coagulans* bakterisinde Ca^{+2} 'ın enzim aktivitesini artırdığını tespit etmişlerdir. Ca^{+2} ve NaCl yağ asidi akseptörü olarak ya da arayüzey yükünü baskılama etkisi nedeniyle ortama ilave edilmektedir. Ayrıca Ca^{+2} iyonlarının varlığında lipaz enziminin aktivite artışına neden olan Ca^{+2} iyonları proteinin ısı ile denatürasyonunu önleyen yapıyı stabilize edebilir. Proteaz etkisini önleyebilir (Brockhoff ve Jensen, 1974).

Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonları *E. durans E114* ve *E. faecium M93*'e ait ekstrasellüler enzimlerin aktivitesini artırırken diğerk bakterilerden elde edilen enzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Lopes vd., (2002)'de laktik asit bakterilerine ait lipaz enzimlerinin aktivitesi üzerine bu iyonların iki üç kat artırdığını saptamışlardır. Ancak

Mn⁺² iyonlarının laktik asit bakterilerinde antioksidan olarak rol oynadığını bildirmişlerdir. Esteban–Torres vd., (2015)’de *L. plantarum*’dan elde edilen enzim aktivitesi Mn⁺² iyonlarının varlığında arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar Hg⁺², Cu⁺² ve Ni⁺² iyonlarının enzim aktivitesini önemli oranda inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium*’a ait lipaz enzimi aktivitesinin Na⁺, Ca⁺², Li⁺ ve Mg⁺² ile arttığı buna karşılık Ba⁺²’in varlığında ise aktivitenin düştüğü bildirilmiştir.

Triton X-100 iyonik olmayan bir sürfaktandır. Enzim aktivitesi üzerine etkisi suşlara göre değişmiştir. *E. faecium* E66 ve *E. faecium* D22 den kısmi saflaştırılan ekstrasellüler enzimlerde önemli ölçüde aktivite kaybına neden olurken, *E. durans* E114, *E. faecium* M48 ve *E. faecium* M93’e ait ekstrasellüler enzimlerin aktivitesi üzerine bir etkisi olmamıştır. Benzer olarak *Leuconostoc subsp. mesenteroides* ile yapılan bir çalışmada enzim aktivitesini Triton X-100 ün artırdığı bildirilmiştir (Eko Sukohidayat vd., 2018). Araştırmacılar Triton X-100 gibi iyonik olmayan sürfektanların lipaz aktivitesini indüklediğini ve enzim denatürasyonunu önlediğini bildirmişlerdir. Çalışmada ise bu bulguların tersine enzim aktivitesi azalmıştır. Bu durum Triton X-100 ün enzim-substrat interaksiyonunu etkilemesi nedeniyle olabilir. Ayrıca iyonik olmayan sürfektanlar enzimi adsorbe ederek inaktivasyonuna neden olabilir (Amid vd., 2015a; 2015b).

Tween 80 esasen mikrobiyal lipaz üretimi için önemli bir substrattır. Çalışmada Tween 80 *Enterococcus spp.* ait ekstrasellüler enzimlerin aktivitesi üzerine önemli bir etkisi olmamıştır. Bulguların aksine Lopes vd., (2002) laktik asit bakterilerine ait enzimlerin aktivitesini Tween 80’in inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Eko Sukohidayat vd., (2018) tween 20 ve tween 80’in enzim aktivitesini artırdığını anyonik sürfaktan SDS’in ise enzim aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Baysal vd., (2005) ise SDS’in lipaz enzim üretimini artırdığını rapor etmişlerdir. Çalışmada ise tween 20 ve tween 80’in enzim aktivitesi üzerine etkisi bakteri suşlarına göre değişirken, anyonik sürfaktan SDS ise bütün test bakterilerinden elde edilen kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler enzimlerin hepsinin aktivitesini düşürmüştür. Esakkiraj vd., (2017) triton-X 100, tween 20 ve tween 80’in *Bacillus*’a ait lipaz enziminin aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Bu etkinin sürfektanların hidrofilik/lipofilik (HLB) dengesi yüzünden meydana geldiği rapor edilmiştir. HLB, belirli bir deterjanın polar olmayan ve polar fazlar arasında dağılma şekli olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak, triton X-100 (HLB: 13.5), tween 80 (HLB: 15) ve tween 20 (HLB: 13.7) gibi iyonik olmayan yüzey aktif maddeleri düşük HLB’e sahiptir

(Eko Sukohidayat vd., 2018). Düşük HLB değerlerine sahip yüzey aktif maddeleri, lipaz aktivitesi üzerinde daha az zararlı etkilere neden olur (Bose ve Keharia, 2013). SDS enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe sebep olur. Enzim yüzeyinin hidrofobikliği üzerinde değişikliklere yol açabilir. Sonuçta enzimin üçüncül yapısı bozularak enzimin inaktive olmasına neden olur (de Almeida vd., 2013). Katyonların, sürfaktanların ve bazı bileşiklerin lipaz aktivitesi üzerine etkisi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Bakterinin özelliklerine, substrat ve kullanılan sistem gibi faktörler etkilidir. Troller ve Bozeman, (1970) stafilokokal lipaz aktivitesi üzerine kalsiyum iyonlarının etkisinin iyon konsantrasyonuna ve kullanılan substrat tipine bağlı olduğunu göstermişlerdir. Metalleri şelatlayıcı EDTA bazı suşların enzimlerinin aktivitesini artırırken bazı izolatların enzimlerinin aktivitelerini ise etkilememiştir. Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium* MTCC5695'in optimum koşullarda üretilen enzim aktivitesini EDTA'nın inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Enzimlerin birçoğu tuza tolerans göstermiştir. Halofil özellik göstermektedirler. *Enterococcus spp.* ait lipaz enzimleri %25 gibi yüksek tuz konsantrasyonunda bile aktivitesini kaybetmemiştir. A4, E66, M48, E68, M93 izolatlarına ait ekstrasellüler enzimlerin aktiviteleri %15-%25 tuz konsantrasyonunda artmıştır. Bu özellikleri gıda üretiminde önemli bir özelliktir. Esteban–Torres vd., (2015) *L. plantarum* 'a ait lipaz enzimini halotolerant olduğunu bildirmiştir. Süt ve et ürünlerinin fermentasyonunda tuz toleransı önem taşımaktadır. Bu fermentasyonlarda yüksek tuz konsantrasyonu vardır (Bautista-Gallego vd., 2013; Johnson vd., 2009). Peynir yapımında ve olgunlaşmasında tuz ilavesi bulunmaktadır. Ayrıca peynir salamurasına yaklaşık %20 civarında tuz ilave edilmektedir (Johnson vd., 2009).

Son yıllarda atık materyallerden yararlı maddelerin üretimi büyük önem taşımaktadır. Böylece hem çevre kirliliği önlenirken diğer taraftan da ekonomik önemi olan ürünler elde edilebilmektedir. Çalışmada zeytin atığı ve peynir altı suyunun besi ortamında kullanılabileceği belirlenmiştir. Bu şekilde ekonomik önemi yüksek olan ürün elde edilebilir. Zeytin atığının kullanıldığı besi ortamında *Enterococcus spp.* ile üretilen ekstrasellüler enzimde daha yüksek enzim aktivitesi elde edilmiştir. *E. faecium* E66 ile daha yüksek enzim aktivitesi elde edildiği için çalışmalarda %10 zeytin atığı kullanılarak lipaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Kısmi saflaştırılan ekstrasellüler enzimin optimum aktivitesi 45°C'de elde edilmiştir. Ekstrasellüler enzimin sıcaklık toleransı 24-

48 saat inkübasyon süresi sonunda oldukça stabil kalmıştır. Optimum pH 10 olarak bulunmuştur. pH direnci de farklı pH'larda 2 ve 3.5 saat inkübe edildiğinde enzim aktivitesini özellikle alkali koşullarda fazla kaybetmemiştir. Mg^{+2} katyonu dışındaki katyonların varlığında enzim aktivitesi düşmüştür. Mg^{+2} katyonu ise enzim aktivitesini artırmıştır. Yüzey aktif maddelerden Triton X-100 ve tween 80 enzim aktivitesini artırırken tween 20 ve SDS enzim aktivitesini düşürmüştür. Bu enzimin tuz direnci yüksek olup halofilik özellik göstermiştir. Bu özellik gıdaların hazırlanması açısından önem taşımaktadır.

Test bakterileri ampisiline ve gentamisine dirençli olarak saptanırken vankomisine ve ciprofloksasine *M93* ve *E68* hariç dirençli olarak bulunmuştur. Laktik asit bakterileri vankomisine doğal olarak dirençli olduğu düşünülmektedir. Vankomisin direncinin hücre duvarının (peptidoglikanın) sentezi sırasında D-alanin ve D_laktada vankomisin bağlanamadığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Handwerger vd., 1994). Benzer olarak Koll-Klais vd., (2005) laktik asit bakterilerinde vankomisin direnci bildirilmiştir. Süt ve süt ürünlerinde izole edilen Enterokokların gentamisine dirençli oldukları rapor edilmiştir (Çitak vd., 2004). Test bakterilerinin hepsinde jelatinaz ve hemoliz aktivitesi negatif olarak belirlenmiştir. Bu açıdan bakıldığında virulans özelliği yoktur. Ancak virulans genlerinin incelenmesi gıdalarda kullanımını daha güvenli hale getirecektir.

Kısmi olarak saflaştırılmış *Enterococcus spp.* izolatlarına ait lipaz enzimlerinin moleküler ağırlığı 19-20 kDa arasında belirlenmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmada *E. faecium* lipazı için moleküler ağırlık 19.172 kDa olarak belirlenmiştir (Ramakrishnan vd., 2016). Esteban-Torres vd., (2015) *L. plantarum* için yaklaşık 31 kDa olarak saptamışlardır. Mikrobiyal lipaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları 11-67 kDa arasında belirlenmiştir (Saxena vd., 2003). *Staphylococcus lipolyticus* lipaz proteinin moleküler ağırlığı 67 kDa olarak bildirilmiştir (Arora, 2013). Bharathi vd., (2018) ise farklı bakteriler için 32-47 kDa olarak bildirmiştir. Araştırmacılar farklı bakteri suşlarının lipaz enziminin farklı moleküler ağırlığına sahip olduğunu bildirerek bunun genetik farklılık yüzünden olduğunu bildirmişlerdir.

Son yıllarda, mikrobiyal lipazlar, çok katlı özelliklerinden dolayı ticari ve endüstriyel uygulamalar için bitki ve hayvan lipazları üzerinde önem kazanmıştır (Akoh vd., 2007; Antczak vd., 2009). Süt ve ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin değişen oranlarda lipaz ürettikleri belirlenmiştir. Lipaz üretiminin en iyi olduğu sıcaklık 35-45°C, pH 7, en iyi karbonhidrat olarak glikoz, azot kaynağı olarak da pepton olduğu belirlenmiştir. Peynir altı suyu ve zeytin atığı da iyi birer substrat olabilir. Ancak üzerinde çalışılarak optimum koşullarının belirlenmesi gerekmektedir.

Laktik asit bakterilerinin lipaz enzimi üretimi diğer lipaz üretici bakterileri ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Bununla birlikte, yüksek laktik asit bakteri sayısı ve aktivitesi fermente et ve süt ürünlerinde önem taşımaktadır. Et ürünlerinde olgunlaşmanın yavaş bir işlem olduğu, düşük aktivitelerin bile hayvan yağı üzerine etki etmesine izin vermesi nedeniyle önem taşımaktadır. Bu şekilde laktik asit bakterilerine ait lipazların lezzet oluşumu üzerindeki rolü nedeniyle önem taşımaktadır. Süt ürünlerinin oluşumunda tereyağı ve peynirde arzu edilen aromanın oluşmasında laktik asit bakterilerinin lipazı önemli bir rol oynayabilir. Bu özellikleri nedeniyle, bu mikroorganizmalardan izole edilen lipazların araştırılması her yıl artmaktadır (Lopes vd., 2002). *Enterococcus spp.* ile üretilen lipaz enzimi 45°C’de, pH 9-10’da aktivitelerinin yüksek olmasının yanında gıdaların pH 5.0-5.5 gibi asidik koşullarda da aktiviteye sahip olmaktadır. 55°C’ye 48 saat gibi bir süre direnç göstermesi ayrıca düşük sıcaklıkta da aktivitesini kaybetmemesi ve halofil özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde ümit vaat etmektedir. Bu lipazların kullanımı gıda üretiminde bazı avantajlar sağlayabileceğinden önem taşımaktadır. Ancak açıklanması gereken birçok nokta bulunmaktadır. Lipaz aktivitesini artırmak için optimizasyon çalışmalarının detaylandırılması saflaştırma işlemlerinin iyileştirilmesi daha kesin sonuç için önem taşımaktadır. Zeytin atığında yapılan üretimin daha da geliştirilmesi gerektiği ve katı faz fermentasyon uygulanırsa daha yüksek verim elde edileceği düşünülmektedir. Laktik asit bakterileri yararlı bakteriler olduğu için ileri saflaştırma işlemleri olmadan kullanılabilirler. Bu hususların belirlenmesi için ise birçok çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Adrio, J.L. ve Demain, A.L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- Akho, C.C. ve David, B. (2008). *Min. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (3), Casimir C., Francis & Taylor, NY.
- Akkaya, A. ve Pazarlıoğlu, N. (2012). 21. Yüzyılın Anahtar Teknolojisi: Beyaz Biyoteknoloji. *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1(1), 22-33.
- Akoh, C.C., Chang, S.W., Lee, G.C., Shaw, J.F. (2007). Enzymatic approach to biodiesel production. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8995-9005.
- Amato, P. ve Christner, B.C. (2009). Energy metabolism response to low-temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 711-718.
- Amid, M., Manap, M., Hussin, M., Mustafa, S. (2015a). A novel aqueous two phase system composed of surfactant and xylitol for the purification of lipase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds and recycling of phase components. *Molecules*, 20(6), 11184-11201.
- Amid, M., Murshid, F.S., Manap, M.Y., Hussin, M. (2015b). A novel aqueous micellar two-phase system composed of surfactant and sorbitol for purification of pectinase enzyme from *Psidium guajava* and recycling phase components. *BioMed Research International*, 8.
- Ananthi, S., Immanuel, G. ve Palavesam, I. (2013). Optimization of lipase production by *Bacillus cereus* strain MSU AS through submerged fermentation. *Plant Sci. Feed*, 3(2), 31-39.
- Andersen, H.J., Ostdal, H. ve Blom, H. (1995). Partial purification and characterisation of a lipase from *Lactobacillus plantarum* MF32. *Food chemistry*, 53(4), 369-373.
- Antczak, M.S., Kubiak, A., Antczak, T., Bielecki, S. (2009). Enzymatic biodiesel synthesis-key factors affecting efficiency of the process, *Renew. Energy.*, 34, 1185-1194.
- Aravindan, R., Anbumathi, P. ve Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *Int. J. Biotechnol.*, 6, 141-158.

- Arık, G. (2012). Aktinomiset kaynaklı lipaz geninin klonlanması, dizilenmesi ve ekspresyonu. Yüksek lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Arora, P.K. (2013). *Staphylococcus lipolyticus* sp. nov., a new cold-adapted lipase producing marine species. *Annals of Microbiology*, 63(3), 913-922.
- Arpigny, J.L. ve Jaeger, K.E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemistry Journal*, 343(1), 177-183.
- Banat, I.M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource technology*, 51(1), 1-12.
- Balkan, U., (2013). Kitosan boncuklara lipaz immobilizasyonu. Yüksek lisans Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Basheer, S.M., Chellappan, S., Beena, P.S., Sukumaran, R.K., Elyas, K.K., Chandrasekaran, M. (2011). Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnology*, 28(6), 627-638.
- Bautista-Gallego, J., Rantsiou, K., Garrido-Fernandez, A., Cocolin, L., Arroyo-Lopez, F.N. (2013). Salt reduction in vegetable fermentation: reality or desire?. *Journal of food science*, 78(8), R1095-R1100.
- Baysal, Z., Alkan, M. H., Uyar, F., Doğru, M. (2005). Kavun kabuğu kullanarak katıfaz fermentasyon tekniği ile termotoleran *Bacillus coagulans*' tan lipaz enzimi üretimi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G.ve Komathi, S. (2018). Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *Journal of King Saud University-Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.018>.
- Bhargavi, P.L., Manjushri, R. ve Reddy, P.N. (2010). Lipase production by lactic acid bacteria in submerged and solid state fermentation. *BTAIJ*, 4(3), 126-129.

- Boonmahome, P. ve Mongkolthanaruk, W. (2013). Lipase-producing bacterium and its enzyme characterization. *J. Life Sci. Technol*, 1(4), 196-200.
- Bose, A. ve Keharia, H. (2013). Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(3), 255-266.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., Alberghina, L., Carrea, G., Lotti, M. (2003). Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein science*, 12(10), 2312-2319.
- Brockhoff, H. ve Jensen, R.G. (1974). *Lipolytic Enzymes*. Academic Press, New York, pp. 1–340.
- Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., Garcia-Fruitos, E. (2015). Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. *Microbial cell factories*, 14(1), 137.
- Carrasco-Lopez, C., Godoy, C., de las Rivas, B., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., Martinez-Ripol, M., Hermoso, J.A. (2009). Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4365-4372.
- Castro, H.F., Mendes, A.A. ve Santos, J.C. (2004). Modificação de oleos gorduras por biotransformação. *Quim. Nova*, 27(1), 146-156.
- Chander, H., Chebbi, N.B. ve Ranganathan, B. (1973). Lipase activity of *Lactobacillus brevis*. *Archiv für Mikrobiologie*, 92(2), 171-174.
- Chander, S. ve Fuerstenau, D. W. (1979). Interfacial properties and equilibria in the apatite-aqueous solution system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 506-516.
- Chauhan, M., Chauhan, R.S., Garlapati, V.K. (2013). Modelling and optimization studies on a novel lipase production by *Staphylococcus arlettae* through submerged fermentation. *Enzyme research*, 171, 1429-1443.

- Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., Sayadi, S. (2011). A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids in health and disease*, 10(1), 221.
- Choo, D.W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., Esaki, N. (1998). A cold-adapted lipase of an alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterisation. *Appl. Environ. Microb.*, 64 (2), 486– 491.
- Çakar, N.E. (2016). *Aspergillus niger* HBF 39'dan *lipaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Yüksek lisans Tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çitak, S., Yucel, N. ve Orhan, S. (2004). Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *International journal of dairy technology*, 57(1), 27-31.
- Dalmaso, G.Z.L., Ferreira, D. ve Vermelho, A.B. (2015). Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, 13(4), 1925-1965.
- de Almeida, A.F., Tauk-Tornisielo, S.M. ve Carmona, E.C. (2013). Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. *BioMed research international*, ID 435818, 10.
- Deive, F.J., Costas, M. ve Longo, M.A. (2003). Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology letters*, 25(17), 1403-1406.
- Dinçer, E. ve Kıvanç, M. (2018). Lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from turkish pastırma. *Anadolu Univ. J. of Sci. and Technology C – Life Sci. and Biotech.*, 7(1), 12 – 19.
- Eaton, T.J. ve Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4), 1628-1635.
- Eko Sukohidayat, N., Zarei, M., Baharin, B., Manap, M. (2018). Purification and characterization of lipase produced by *Leuconostoc mesenteroides* Subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 using an aqueous two-phase system (ATPS) composed of triton X-100 and maltitol. *Molecules*, 23(7), 1800.

- El-Sawah, M.M.A., Sherief, A.A. ve Bayoumy, S.M. (1995). Enzymatic properties of lipase and characteristics production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67(4), 357-362.
- Enger, E.D., Ross, F.C. ve Bailey, D.B. (2012). *Concepts in Biology*, 14th ed.; McGraw-Hill: New York, NY, USA.
- Ephraim, D.P., Bhat. S.G. ve Muthuswamy, C.K. (2014). Lipase production by immobilized *Bacillus smithii* BTMS11 and its potential application in wastewater treatment. *Int. J. Curr. Biotechnol.*, 2, 1-8.
- Erginkaya, Z., Yurdakul, N.E. ve Karakaş, A. (2007). *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*'in başlangıç ve probiyotik kültür özellikleri. *Gıda*, 32 (3), 137-142.
- Ersoy, E. ve Bayşu, N. (1981). *Pratik Biyokimya* (372.baskı). Ankara Üniversitesi Ankara: Veteriner Fakültesi Yayınları.
- Esakkiraj, P., Antonyraj, C.B., Meleppat, B., Ankaiah, D., Ayyanna, R., Ahamed, S.I.B., Arul, V. (2017). Molecular characterization and application of lipase from *Bacillus* sp. PU1 and investigation of structural changes based on pH and temperature using MD simulation. *International journal of biological macromolecules*, 103, 47-56.
- Esteban-Torres, M., Mancheno, J. M., de las Rivas, B., Munoz, R. (2015). Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 246-252.
- Falony, G., Armas, J.C., Mendoza, J.C.D., Hernandez, J.L.M. (2006). Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 235–240.
- Fernandes, P. ve Carvalho, F. (2017). Microbial enzymes for the food industry. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00019-4>.
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., ve Valero, F. (2013). The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Elektronik Biyoteknoloji Dergisi*, 16 (3), 12-12.

- Florou-Paneri, P., Christaki, E. ve Bonos, E. (2013). Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. IntechOpen.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 105-122.
- Fukumoto, J., Iwai, M. ve Tsujisaka, Y. (1963). Studies on lipase. 1. Purification and crystallization of a lipase secreted by *A. niger*. *J. Gen. App*, 353-361.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 215-222.
- Gobbetti, M., Fox, P.F. ve Stepaniak, L. (1996). Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, 8, 127-135.
- Gobbetti, M., Fox, P. F. ve Stepaniak, L. (1997). Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *Journal of Dairy Science*, 80(12), 3099-3106.
- Gupta, R., Gupta, N. ve Rath, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 763–781.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 1-18.
- Gül, Ü.D. (2013). Fungal lipazlar ve endüstride kullanım alanları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 13(1), 1-8.
- Handwerger, S., Pucci, M.J., Volk, K.J., Liu, J.I.N.P.I.N. G., Lee, M.S. (1994). Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *Journal of bacteriology*, 176(1), 260-264.
- Hasan, F., Shah, A.A. ve Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 235-251.

- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T., (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567.
- Hugas, M., Garriga, M. ve Aymerich, M.T. (2003). Functionalty of enterococci in meat products. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 223-233.
- Imamura, S., Takahashi, M., Misaki, H., Matsuura, K. (1989). Method and reagent containing lipases for enzymatic determination of triglycerides. *West Germany Patent*, 3(912), 226.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M.H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34.
- Jensen, M.O., Jensen, T. R., Kjaer, K., Bjornholm, T., Mouritsen, O. G., Peters, G. H. (2002). Orientation and conformation of a lipase at an interface studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical journal*, 83(1), 98-111.
- Johnson, M.E., Kapoor, R., McMahon, D.J., McCoy, D.R., Narasimmon, R.G. (2009). Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: Scientific and technological aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 252-268.
- Kamaly, K. M., Takayama, K. ve Marth, E. H. (1990). Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and their mutants. *J. Dairy Sci.* 73(2), 280–290.
- Kapoor, M. ve Gupta, M.N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.
- Karigar, C.S. ve Rao, S.S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*, 1-11.
- Karlson, P. (1988). *Tıp ve fen bilimciler için biyokimya*. (Çev: A. Telefoncu). Kırklareli: Arkadaş Tıp Kitapları.
- Karmee, S., Patria, R. ve Lin, C. (2015). Techno-economic evaluation of biodiesel production from waste cooking oil—a case study of Hong Kong. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 4362-4371.

- Khan, I.M.; Dill, C.W.; Chandan, R.C.; Shahani, K.M. (1967). Bovine pancreatic lipase. II. Stability and effect of activators and inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta.*, 132, 68.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N. (2006). Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Ko, W.H., Wang, I.T., Ann, P.J. (2005). "A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils, " *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 597, 599.
- Koll-Klais, P., Mandar, R., Leibur, E., Marcotte, H., Hammarström, L., Mikelsaar, M. (2005). Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral microbiology and immunology*, 20(6), 354-361.
- Konkit, M., Choi, W.J., Kim, W. (2016). Aldehyde dehydrogenase activity in *Lactococcus chungangensis*: application in cream cheese to reduce aldehyde in alcohol metabolism. *J. Dairy Sci.* 99(3), 1755-1761.
- Korman, T.P., Sahachartsiri, B., Charbonneau, D.M., Huang, G.L., Beauregard, M., Bowie, J.U. (2013). Dieselzymes: development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 70.
- Kumar, A., Kanwar, S.S. (2012). Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. *Dyn. Biochem. Process Biotech. Mol. Biol.*, 6(1), 13-27.
- Kumar, A., Parihar, S.S. ve Batra, N. (2012a). Enrichment, isolation and optimization of lipase-producing *Staphylococcus* sp. from oil mill waste (oil cake). *Journal of Experimental Sciences.*, 3(8), 26-30.
- Kumar, R., Sharma, A., Kumar, A., Singh, D. (2012b). Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, purification and some properties. *World Appl. Sci. J.*, 16(7), 940-948.
- Kynclova, E., Hartig, A. ve Schalkhammer, T. (1995). Oligonucleotide labelled lipase as a new sensitive hybridization probe and its use in bio-assays and biosensors. *Journal of molecular recognition*, 8(1-2), 139-145.

- Lee, L.P., Karbul, H.M., Citartan, M., Gopinath, S.C., Lakshmipriya, T., Tang, T.H. (2015). Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. *BioMed research international*, 9.
- Li, N., Zong, M.H. ve Ma, D. (2009). Unexpected reversal of the regioselectivity in *Thermomyces lauginosus* lipase-catalyzed acylation of floxuridine. *Biotechnology letters*, 31(8), 1241-1244.
- Liu, Z.Q., Zheng, X.B., Zhang, S.P., Zheng, Y.G. (2012). Cloning, expression and characterization of a lipase gene from the *Candida antarctica* ZJB09193 and its application in biosynthesis of vitamin A esters. *Microbiological research*, 167(8), 452-460.
- Lopes, M.F.S., Cunha, A.E., Clemente, J.J., Carrondo, M.T., Crespo, M.B. (1999). Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(2), 249-254.
- Lopes, M.D.F.S., Leitao, A.L., Regalla, M., Marques, J.F., Carrondo, M.J.T., Crespo, M.T.B. (2002). Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *International journal of food microbiology*, 76(1-2), 107-115.
- Maia, M.M.D., Heasley, A., De Morais, M.C., Melo, E.H.M., Morais Jr, M.A., Ledingham, W.M., Lima Filho, J.L. (2001). Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource technology*, 76(1), 23-27.
- Marangoni, A.G. (2002). Lipases: structure, function, and properties. In *Lipid biotechnology* (pp. 358-387). CRC Press.
- Mazzucotelli, C.A., Ponce, A.G., Kotlar, C.E., Moreira, M.D.R. (2013). Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. *Food Sci. Technol*, 33(2), 295-303.
- Meyers, S.A., Cuppett, S.L. ve Hutkins, R.W. (1996). Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiology*, 13, 383–389.

- Mukherjee, K.D. ve Hills, M.J. (1994). in *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application* (Woolley, P. and Petersen, S. B., eds), Cambridge University Press, Cambridge. pp. 49–75.
- Nardini, M. ve Dijkstra, B.W. (1999). α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*, 9(6), 732-737.
- Okafor, J.I. ve Gugnani, H.C. (1990). Lipase activity of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* species. *Mycoses*, 33(2), 81-85.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, U.T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry*, 29(2), 119-131.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science*, 65(2), 859-867.
- Papon, M. ve Talon, R. (1988). Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of applied bacteriology*, 64(2), 107-115.
- Pereira, E.B., de Castro, H.F., De Moraes, F.F., Zanin, G.M. (2002). Esterification activity and stability of *Candida rugosa* lipase immobilized into chitosan. *Applied biochemistry and biotechnology*, 98(1-9), 977-986.
- Petrovic, S.E., Skrinjar, M., Becarevic, A., Vujicic, I.F., Banka, L. (1990). Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnology Letters*, 12(4), 299-304.
- Phongsopitanun, W., Kudo, T., Mori, M., Shiomi, K., Pittayakhajonwut, P., Suwanborirux, K., Tanasupawat, S. (2015). *Micromonospora fluostatini* sp. nov., isolated from marine sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4417-4423.
- Piatkiewicz, A. (1987). Lipase and esterase formation by mutants of lactic acid streptococci and lactobacilli. *Milchwissenschaft*, 42(9), 561–564.

- Pratuangdejkul, J. ve Dharmsthiti, S. (2000). Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Microbiological research*, 155(2), 95-100.
- Rahman, N.Z.R.A. ve Basri, M. (2006). *New lipases and proteases*. Nova Publishers, Inc. New York, U.S.A.
- Rajan, A., Kumar, D.S. ve Nair, A.J. (2011). Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from aged and crude rice bran oil and quantification by HPTLC. *Int. J. Biol. Chem.*, 5(11), 116-126.
- Rajendran, A., Palanisamy, A. ve Thangavelu, V. (2009). Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian archives of biology and technology*, 52(1), 207-219.
- Ramakrishnan, V., Balakrishnan, B., Rai, A. K., Narayan, B., Halami, P. M. (2012). Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste. *International Aquatic Research*, 4(1), 14.
- Ramakrishnan, V., Goveas, L.C., Narayan, B., Halami, P.M. (2013). Comparison of lipase production by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 and *Pediococcus acidilactici* MTCC 11361 using fish waste as substrate: optimization of culture conditions by response surface methodology. *ISRN biotechnology*, 1-9.
- Ramakrishnan, V., Goveas, L.C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P.M., Narayan, B. (2016). Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 19–27.
- Ramyasree, S. ve Dutta, J.R. (2013). The effect of process parameters in enhancement of lipase production by co-culture of lactic acid bacteria and their mutagenesis study. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(4), 393–398.
- Rashmi, B.S. ve Gayathri, D. (2014). Partial purification, characterization of *Lactobacillus* sp. G5 lipase and their probiotic potential. *International Food Research Journal*, 21(5), 1737-1743.

- Ray, A. (2012). Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and technology*, 2(2), 33-37.
- Ribeiro, B.D., Castro, A.M.D., Coelho, M.A.Z., Freire, D.M.G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res.*, 1-16.
- Sabat, S., Murthy, V.K., Pavithra, M., Mayur, P., Chandavar, A. (2012). Production and characterisation of extracellular lipase from *Bacillus stearothermophilus* MTCC 37 under different fermentation conditions. *Int. J. Eng. Res. Appl.*, 2(3), 1775-1781.
- Salihu, A. ve Alam, M.Z. (2015). Solvent tolerant lipases: a review. *Process Biochem.*, 50(1), 86-96.
- Salminen, M.K., Rautelin H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V., Jarvinen, A. (2004). *Lactobacillus bacteremi*, clinical significance and patient outcome with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. *Clinical infectious diseases*, 38(1), 62-69.
- Samad, M. Y. A., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Yunus, W. Z. W., Ampon, K., Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of microbiological methods*, 9(1), 51-56.
- Sangeetha, R., Geetha, A. ve Arulpandi, I. (2008). Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Internet J Microbiol*, 5(2).
- Sangeetha, R., Geetha, A. ve Arulpandi, I. (2010). Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. *Brazilian journal of Microbiology*, 41(1), 179-185.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Rani, K.Y., Sridhar, S., Mehtab, V., Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol. Prog.*, 34(1), 5-28.
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S. (2003). Review: purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods*, 52, 1-18.

- Shafqat, I., Shahzad, S., Yasmin, A., (2015). Microbial potential of lipase production from different industrial effluents. *Journal of Applied Biological Sciences (JABS)*, E-ISSN: 2146-0108, 9(1), 15-19.
- Sharma Chander, K. ve Kanwar Shamsher, S. (2012). Purification of a Novel Thermophilic Lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498. *ISCA J. Biological Sci.*, 1, 43-48.
- Sharma, D., Sharma, B. ve Shukla, A.K. (2011). Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*, 10 (1), 23-40.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662.
- Singh, A., Srinivasan, R.A., Dudani, A.T. (1973). Studies on exocellular and endocellular lipases of some of the lipolytic bacteria. *Milchwissenschaft* 28, 164-166.
- Stoyanovski, S., Antonova-Nikolova, S., Kirilov, N., Ivanova, I., Tenev, T., Handjinesheva, V. (2013). API ZYM enzymatic profile of lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian meat product “Lukanka”. *Bulg J Agric Sci., Supplement 2(19)*, 86-89.
- Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp., *J Biochem.*, 109,211–6.
- Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R. ve Cabral, J.M.S. (1992). Purification of lipases. *Journal of biotechnology*, 26(2-3), 111-142.
- Telefoncu, A. (1993). *Besin kimyası*. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 149, 172s.
- Thomson, C.A., Delaquis, P.J. ve Mazza, G. (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(2), 165–187.
- Toole, G. ve Toole, S. (2004). *Essential AS Biology for OCR*. Nelson Thornes.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M. D., Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and rioprocess technology*, 3(2), 182-196.

- Troller, J.A. ve Bozeman, M.A. (1970). Isolation and characterisation of a staphylococcal lipase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 20(3), 480– 484.
- Uppada, S.R., Gupta, A.K. ve Dutta, J.R. (2012). Statistical optimization of culture parameters for lipase production from *Lactococcus lactis* and its application in detergent industry. *International Journal of Chem Tech Research*, 4(4), 1509-1517.
- Uppada, S.R., Akula, M., Bhattacharya, A., Dutta, J.R. (2017). Immobilized lipase from *Lactobacillus plantarum* in meat degradation and synthesis of flavor esters. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 331–334.
- Vulfson, E.N. (1994). Industrial applications of lipases. In: Woolley P, Peterson SB, editors. *Lipases—their structure, biochemistry and applications*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, pp. 271–88.
- Wang, J.R., Li, Y.Y., Xu, S.D., Li, P., Liu, J.S., Liu, D.N. (2014). High-level expression of pro-form lipase from *Rhizopus oryzae* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 203-217.
- Wayne, P.A. (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100-S20.
- Xie, W., Khosasih, V., Suwanto, A., Kim, H.K. (2012). Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. *J Microbiol Biotechnol.*, 22(1),84-91.
- Yörük, G. ve Güner, A. (2011). Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176.
- Zaidi, A., Gainer, J.I., Carta, G. (1995). Fatty acid esterification using nylon-immobilized lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, 48(6), 601-605.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esra ACU

Doğum Yeri ve Tarihi : Nevşehir/ 07.02.1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Erciyes Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi
Öğretmenliği (2007-2011)

Yüksek Lisans Öğrenimi :

LÜE-İleri Tek. ABD-Biyoteknoloji BD (Tezli) (YL)

İŞ DENEYİMLERİ

Nuri Erbak Ortaokulu-Fen Bilgisi Öğretmenliği (2018-2019)

Yiğitler İmam Hatip Ortaokulu-Fen Bilgisi Öğretmenliği (2015-2018)

Tavşanlı Şehitlik Ortaokulu -Fen Bilgisi Öğretmenliği (2013-2015)

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : esra_acu@hotmail.com

Tarih : 06/12/2019