

**T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HALOFİLİK ARKEAL KAYNAKLI LİPAZ ÜRETİM KOŞULLARININ  
OPTİMİZASYONU VE AKTİF LİPAZIN SAFLAŞTIRILMASI**

**MELİS ÖZGEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. SEVİL YÜCEL**

**İSTANBUL, 2016**

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HALOFİLİK ARKEAL KAYNAKLI LİPAZ ÜRETİM KOŞULLARININ**  
**OPTİMİZASYONU VE AKTİF LİPAZIN SAFLAŞTIRILMASI**

Melis ÖZGEN tarafından hazırlanan tez çalışması 16.12.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Doç. Dr. Sevil YÜCEL  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Eş Danışman**

Dr. Azade ATTAR  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Sevil YÜCEL  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Dr. Azade ATTAR  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN  
İstanbul Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Melek TÜTER  
İstanbul Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2013-07-04-YL06 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

---

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, birlikte çalışmaktan her zaman büyük keyif aldığım, çalışmalarımda yol gösteren, olumlu enerjisiyle güç veren danışman hocam Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına gösterdiği ilgi ve desteğinden dolayı Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a,

Deneyimlerinden ve bilgisinden faydalandığımız Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e,

Deneysel çalışmalarımda ve tezimin yazılmasında destek veren, emeği geçen, yol gösteren eş danışmanım Dr. Azade ATTAR'a,

Deneysel çalışmalarımda yol gösteren, gece geç saatlere kadar tezimin düzeltmeleriyle uğraşan, son ana kadar benimle birlikte çalışan Araştırma Görevlisi sevgili Yeliz BAŞARAN'a yardımları için,

Bilime olan sevgisi, eğitimime verdiği maddi ve manevi destek, uzun eğitim sürecimde gösterdiği sabır ve sevgi için annem Merih YALÇINÖZ'e,

Tez çalışmam sırasında moral kaynağı olan arkadaşlarıma ve sıkıntılı zamanlarımda yanımda olan aileme

TEŞEKKÜR EDERİM.

Mart, 2016

Melis ÖZGEN

## İÇİNDEKİLER

---

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTIMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ .....	xii
ÖZET .....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1    Literatür Özeti .....	1
1.2    Tezin Amacı .....	1
1.3    Hipotez .....	2
BÖLÜM 2	
TEORİK BİLGİLER.....	3
2.1    Ekstremofilik Arkeler.....	3
2.1.1    Halofilik Arkeler .....	5
2.1.2 <i>Haloarcula hispanica</i> .....	8
2.1.3    Halofilik Enzimler .....	10
2.2    Enzimler .....	11
2.2.1    Enzimlerin Genel Özellikleri.....	12
2.2.2    Enzim Kaynakları.....	13
2.2.3    Enzimlerin Salgılanma Şekilleri .....	13
2.2.4    Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametreler .....	14
2.2.4.1    pH Etkisi.....	14
2.2.4.2    Sıcaklık Etkisi .....	14
2.2.4.3    Substrat Konsantrasyonu Etkisi.....	15
2.2.4.4    Enzim Konsantrasyonu Etkisi .....	15

2.3	Lipazlar .....	15
2.3.1	Lipaz Enzimi ve Yapısı .....	15
2.3.1.1	Lipazın Üç Boyutlu Yapısı.....	18
2.3.1.2	Lipaz Etki Mekanizması .....	19
2.3.2	Lipaz Kaynakları .....	20
2.3.3	Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulama Alanları .....	23
2.3.3.1	Gıda Endüstrisi .....	23
2.3.3.2	Deri İşlenmesi.....	23
2.3.3.3	Kozmetik.....	23
2.3.3.4	Deterjan Endüstrisi.....	24
2.3.3.5	Organik Madde Sentezi .....	24
2.3.3.6	Tekstil Endüstrisi .....	25
2.3.3.7	İlaç Endüstrisi .....	25
2.3.4	Lipaz Üretim Koşulları .....	26
2.3.5	Lipazlar Üretimini Etkileyen Parametreler .....	29
2.3.5.1	Karbon Kaynakları Etkisi .....	29
2.3.5.2	pH Etkisi.....	31
2.3.5.3	Sıcaklık Etkisi .....	31
2.3.5.4	Metal İyonları Etkisi.....	32

### BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD.....	33	
3.1	Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler .....	33
3.1.1	Kullanılan Cihazlar .....	33
3.1.2	Kullanılan Malzemeler .....	34
3.1.3	Kullanılan Kimyasallar .....	35
3.1.4	Kullanılan Tampon ve Çözeltiler .....	36
3.1.5	Lipaz Kaynağı Olarak Kullanılan Arkeik Bakteriler .....	37
3.2	Deneylerin Yapılışı.....	38
3.2.1	Besiyerlerinin Hazırlanması .....	38
3.2.2	Bakterilerin Üretilmesi (Ekim İşlemi ve İnkübasyon).....	41
3.2.3	Analizler .....	42
3.2.3.1	Optik Yoğunluk (OD) Yöntemiyle Hücre Derişimi Ölçümü.....	42
3.2.3.2	Titrimetrik Yöntemle Lipaz Aktivitesi Tayini.....	42
3.2.3.3	Spektrofotometrik Yöntemle Lipaz Aktivitesi Tayini.....	43
3.2.3.4	Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini ve Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması .....	47
3.2.4	Kısmi Saflaştırma İşlemi .....	48
3.2.4.1	Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	49
3.2.4.2	Ultrafiltrasyon .....	49
3.2.5	Kısmi Saflaştırılmış Lipaz Üzerinden Aktivite Tayinleri ile Optimum Parametrelerin Belirlenmesi .....	50
3.2.5.1	Optimum Sıcaklık Değeri Belirlenmesi.....	50
3.2.5.2	Optimum pH Değeri Belirlenmesi .....	50
3.2.5.3	Optimum NaCl Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	50

3.2.6	Kısmi Saflaştırılmış Lipazın Yüzey Aktif Maddelere Karşı Direncinin Araştırılması .....	51	
3.2.6.1	Triton-X Varlığında Lipaz Aktivitesi .....	51	
3.2.6.2	SDS Varlığında Lipaz Aktivitesi .....	51	
<b>BÖLÜM 4</b>			
<b>DENEYSEL SONUÇLAR .....</b>			<b>52</b>
4.1	Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler .....	52	
4.1.1	Tuz Konsantrasyonunun Etkisi.....	52	
4.1.2	Karbon Kaynaklarının Etkisi: Farklı Yağlar.....	54	
4.1.3	Karbon Kaynaklarının Etkisi: Farklı Yağ Asitleri ve Yağ Asidi Esterleri.....	58	
4.1.4	Yağ Değişiminin Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	60	
4.2	Lipazın Kısmi Saflaştırılması .....	62	
4.3	Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması.....	63	
4.4	Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması.....	64	
4.5	NaCl Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisi .....	65	
4.6	Yüzey Aktif Kimyasallarının Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	67	
4.6.1	Triton X-100 Varlığında Lipaz Aktivitesi .....	67	
4.6.2	SDS Varlığında Lipaz Aktivitesi .....	68	
<b>BÖLÜM 5</b>			
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>			<b>70</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>			<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>			<b>86</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

B	Işının çözelti içinde aldığı yol (cm)
C	Konsantrasyon
g	Gram
L	Litre
m	Ağırlık
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikro molar
N	Karıştırma hızı, rpm
nm	Nanometre
t	Reaksiyon süresi (sn)
T	sıcaklık ( $^{\circ}$ C)
U	Ünite ( $\mu$ mol/dk)
U/mg	Spesifik aktivite
V	Hacim
$\epsilon$	Molar absorptivite katsayısı ( $L \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
$\lambda$	Dalga boyu (nm)



## KISALTMA LİSTESİ

---

A	Aktivite
Abs	Absorbans
BSA	Bovin Serum Albumin
dk	Dakika
OD	Optik Yoğunluk
PB	Fosfat tamponu
PNF	<i>p</i> -Nitrofenol
PNFP	<i>p</i> -Nitrofenil Palmitat
rpm	Rotations per minute (dakikadaki devir sayısı)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sn	Saniye
U	Ünite
UV	Ultra viyole

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Lipazların katalitik etkisi. Bir trigliseridin, gliserole ve yağ asitlerine hidroliz edilmesi veya tersinir reaksiyon ile gliserol ve yağ asitlerinden trigliseritler sentezlenmesi [49].....	16
Şekil 2.2	Lipazlar ile katalizlenen reaksiyonlar.....	17
Şekil 2.3	Lipaz molekülünün grafiksel gösterimi.....	18
Şekil 2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lipazının yapısı [49].....	19
Şekil 2.5	Serin hidrolazın katalizlediği hidroliz/esterleşme tepkimelerinin mekanizması.....	20
Şekil 3.1	PNF kalibrasyon eğrisi.....	46
Şekil 3.2	Düşük absorban değerleri için PNF kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 3.3	BSA ile hazırlanan protein standard grafiği.....	48
Şekil 4.1	Besiyeri tuz konsantrasyonunun lipolitik aktiviteye etkisi (T=40 °C, N=100 rpm, pH=7,5; karbon kaynağı: zeytinyağı, değişken parametre: tuz konsantrasyonu).....	55
Şekil 4.2	Besiyerine katılan farklı yağların lipolitik aktiviteye etkisi [T=40 °C, N=100 rpm, pH:7,5 ; Tuz konsantrasyonu: 4 M, değişken parametre: karbon kaynağı (yağlar)].....	57
Şekil 4.3	Besiyerine katılan farklı yağların lipolitik aktiviteye etkisi (devamı).....	57
Şekil 4.4	Besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan farklı yağlar ile elde edilen en yüksek lipaz aktiviteleri (U/mL) (T=40°C, N=100 rpm, pH=7,5 , 4M NaCl).....	58
Şekil 4.5	Besiyerine katılan farklı yağ asidi ve esterlerinin lipolitik aktiviteye etkisi, (T=40 °C, N=100 rpm, pH:7.5, 4M NaCl, Karbon kaynağı: %1 ceviz yağı; değişken parametre: karbon kaynağı olarak yağ asidi ve esterleri).....	60
Şekil 4.6	Besiyerlerinde karbon kaynağı olarak kullanılan farklı yağ asidi ve esterleri ile elde edilen en yüksek lipaz aktivite değerleri (U/mL) (T=40°C, N=100 rpm, pH=7.5 , 4M NaCl, %1 Ceviz yağı).....	60
Şekil 4.7	Yağ derişiminin lipolitik aktiviteye etkisi (T=40°C, N=100 rpm, pH=7,5 , 4M NaCl, Karbon kaynağı: Ceviz yağı).....	62
Şekil 4.8	Farklı yağ derişimleriyle elde edilen en yüksek lipaz aktivite değerleri (T=40 °C, N=100 rpm, pH=7,5 , 4M NaCl, Karbon kaynağı: ceviz yağı).....	62
Şekil 4.9	Sıcaklık parametresinin lipolitik aktiviteye etkisi.....	64
Şekil 4.10	pH parametresinin lipolitik aktiviteye etkisi .....	66
Şekil 4.11	Farklı tuz konsantrasyonlarının lipaz aktivitesine etkisi .....	67

Şekil 4.12	Reaksiyon ortamındaki Triton X-100'ün lipaz aktivitesine etkisi .....	68
Şekil 4.13	Reaksiyon ortamındaki SDS'nin lipaz aktivitesine etkisi .....	70

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 <i>Haloarcula hispanica</i> 4TK1,2TK2 ve 2TK3 suşlarının karakteristik özellikleri.....	9
Çizelge 2.2 Bazı mikrobiyal lipazların özellikleri [50].....	21
Çizelge 2.3 Ticari bakteriyel lipazlar, kaynakları ve uygulama alanları.....	22
Çizelge 2.4 Deterjanlarda kullanılan lipazlar.....	24
Çizelge 2.5 Lipaz Enziminin Kullanım Alanları.....	25
Çizelge 2.6 Ticari Olarak Kullanılan Mikrobiyal Lipazlar.....	26
Çizelge 2.7 Lipaz Fermantasyon Koşulları.....	28
Çizelge 3.1 Hazırlanan Besiyerlerinde İncelenen Parametreler.....	40
Çizelge 3.2 Farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan besiyerleri ve içerikleri.....	41
Çizelge 3.3 Karbon kaynağı olarak farklı yağlar içeren besiyerleri ve içerikleri.....	41
Çizelge 3.4 Karbon kaynağı olarak farklı yağ asitleri ve yağ asidi esteri içeren besiyerleri.....	42
Çizelge 3.5 Karbon kaynağı olarak farklı oranda yağ içeren besiyerleri ve içerikleri.....	42
Çizelge 3.6 Belirli konsantrasyonlarda PNF içeren standart örneklerin $\lambda=404$ nm'de verdikleri absorbans değerleri.....	45
Çizelge 3.7 Belirli konsantrasyonlarda BSA içeren standart örneklerin Bradford belirteci ile girdikleri reaksiyon sonucu 595 nm'de verdikleri absorbans değerleri.....	49
Çizelge 4.1 Besiyeri tuz konsantrasyonlarının lipolitik aktiviteye etkisi (Ünite/mL enzim).....	54
Çizelge 4.2 Besiyerine katılan farklı karbon kaynaklarının (yağların) lipolitik aktiviteye etkisi (Ünite/mL enzim).....	56
Çizelge 4.3 Karbon kaynağı olarak yağ asidi ve esterlerinin lipaz aktivitesine etkisi (Ünite/mL enzim).....	59
Çizelge 4.4 Yağ derişiminin lipaz aktivitesine etkisi, (Ünite/mL enzim).....	61
Çizelge 4.5 Kısmi saflaştırma öncesi ve sonrası lipaz aktivite değerleri ile kısmi saflaştırma sonrası protein derişimleri.....	63
Çizelge 4.6 Farklı sıcaklıklar için aktivite tayini sonuçları ve rölatif aktivite değerleri.....	64
Çizelge 4.7 Farklı pH değerlerinde spektrofotometrik yöntem ile elde edilen lipaz aktivite sonuçları (U/mL).....	65

Çizelge 4.8	Farklı tuz konsantrasyonlarında titrimetrik yöntem ile ölçülen lipaz aktivite değerleri ve rölatif aktiviteler.....	66
Çizelge 4.9	Farklı Triton-X 100 derişimlerinde spektrofotometrik yöntem ile ölçülen lipaz aktiviteleri ve rölatif aktiviteler.....	68
Çizelge 4.10	Farklı SDS derişimlerinde spektrofotometrik yöntem ile ölçülen lipaz aktiviteleri ve rölatif aktiviteler.....	69

## HALOFİLİK ARKEAL KAYNAKLI LİPAZ ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE AKTİF LİPAZIN SAFLAŞTIRILMASI

Melis ÖZGEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sevil YÜCEL  
Eş Danışman: Dr. Azade ATTAR

Lipazlar, enzim sınıflandırmasında hidrolazlar grubunda yer alan, triaçilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Endüstriyel lipazlar, genellikle hücre dışı lipaz üreten mikroorganizma türlerinden sağlanır. Mikrobiyal lipazlar çoğunlukla sıvı kültür ortamlarında üretilirler ve aktiviteleri karbon/azot kaynaklarının tür ve derişiminden, ortam pH'ından ve sıcaklıktan etkilenir.

Ekstremofilik organizmalar, moleküler adaptasyonları sayesinde ekstrem koşullar altında stabil ve aktif enzimler (ekstremozimler) sentezleme yeteneğine sahip olduklarından, önemli biyoteknolojik potansiyelleri bulunmaktadır ve bilimsel açıdan büyük ilgi çekmektedirler. Bu çalışmada, lipaz kaynağı olarak Türkiye Tuzköy Madeni'nden izole edilen, ekstrem halofilik arkea olan *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşu kullanılmıştır. Halofilik arkealar, çok yüksek tuz konsantrasyonlarına ve ekstrem koşullara kolayca adapte olabilmeye özelliğine sahiptirler.

Bu çalışmada lipaz üretiminde önem taşıyan ortam parametrelerinden karbon kaynakları ve tuz konsantrasyonu incelenmiş, *Haloarcula hispanica* için en uygun lipaz üretim parametreleri tespit edilmiştir. Karbon kaynağı olarak çeşitli yağların (zeytinyağı, susam yağı, ayınsafa yağı, kudret narı, çuha çiçeği yağı, ceviz yağı ve balık yağı), yağ asidi esteri tribütirinin ve yağ asidi esterleri stearik asit ve oleik asidin, yağların farklı derişimlerinin ve tuz konsantrasyonunun (3M, 4M ve 5M NaCl) hücre dışı

lipaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. Optimum lipaz üretim koşullarını belirlemek amacıyla, bu parametreler kullanılarak farklı besiyerleri (pH=7,5) hazırlanmış, ekim işlemi yapılmış ve 40°C'de 60 gün boyunca inkübe edilmiştir. İki günde bir düzenli olarak numune alınarak, titrasyon yöntemiyle lipaz aktiviteleri takip edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda *Haloarcula hispanica*'nın hücre dışı lipaz ürettiği, üretim ortamına katılan bazı yağların lipaz üretimini tetiklediği, en uygun karbon kaynaklarının %2 derişimde ceviz yağı ve balık yağı, %1 oranında stearik asit ve tribütirin olduğu, en uygun tuz konsantrasyonunun 4M NaCl olduğu tespit edilmiştir.

Üretilen lipaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve ultrafiltrasyon işlemleriyle kısmi olarak saflaştırılmış, enzimin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacıyla farklı sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarında aktivite tayinleri yapılmıştır. Optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 45°C ve 8,0 olarak saptanmıştır. Farklı tuz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçülmüş, optimum aktivitenin tuzsuz ortamda gerçekleştiği, tuz konsantrasyonu arttıkça aktivitede bir miktar düşme olduğu ancak 5M tuz konsantrasyonunda aktivitesinin %85'ini koruyarak aşırı tuzlu ortamlarda stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Bunu yanı sıra, elde edilen lipaz enziminin Triton X-100 ve SDS yüzey aktif maddelere karşı direnci araştırılmış ve deterjan endüstrisindeki kullanım potansiyeli ortaya konmuştur. Kısmen saflaştırılmış olan lipaz, deterjan katkıları varlığında aktivitesini büyük oranda koruyabildiği için üretilen enzimin deterjanlarda kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Haloarcula hispanica*, ekstrem halofilik arkea, ekstremofil, ekstremozim, lipaz, lipolitik aktivite, kısmi saflaştırma

**OPTIMISATION OF HALOPHILIC ARCHAEAL LIPASE PRODUCTION MEDIA  
AND PURIFICATION OF THE ACTIVE LIPASE**

Melis ÖZGEN

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Sevil YÜCEL

Co-Adviser: Dr. Azade ATTAR

Lipases belong to the hydrolase family of enzymes, hydrolyze triacylglycerides into fatty acids and glycerol. Industrial lipases are mainly produced from microorganisms that secrete extracellular lipase. Microbial lipases are usually produced by submerged fermentation and their activities are influenced by the type and concentration of carbon/nitrogen sources, pH and temperature.

Extremophilic organisms have drawn much scientific interest and have important biotechnological potentials because of their molecular adaptation and their ability to synthesise stable and active macromolecules in extreme environmental conditions. In the present study, an extreme halophilic archaea *Haloarcula hispanica* 2TK2 strain isolated from Tuzkoy Salt Mine of Turkey is used as lipase source. Halophilic archaea easily adapted to life in extreme salty environments, so that their proteins maintain stability and functionality in extreme habitats.

In this study, important parameters for lipase production, carbon sources and salt concentration are investigated and optimal conditions for lipase production from *Haloarcula hispanica* are determined. As carbon sources, a variety of oil (olive oil, sesame oil, calendula oil, bitter melon oil, evening primrose oil, walnut oil and trout oil) in different concentrations, tributyrin as a fatty acid ester, stearic acid and oleic



acid as fatty acids are examined. The effects of these parameters and salt concentrations (3M, 4M and 5M) on extracellular lipase production are investigated. In order to determine optimal lipase production conditions, these parameters are varied in different Brown media (pH=7,5), cultivated and incubated at 40°C for 2 months. Sampled every second day, titrimetric and spectrophotometric activities are monitored. As a result of the experiments, it has been reported that *Haloarcula hispanica* produce extracellular lipase enzyme and some of the carbon sources stimulate the lipase production. The highest lipase activities performed in presence of 2% walnut and trout oil, 1% stearic acid and tributyrin as carbon sources and 4M NaCl as salt concentration.

Lipase is obtained and partially purified applying ammonium sulfate precipitation and ultrafiltration. In order to determine optimal conditions for lipase activity, activity assays performed at different temperature, pH and salt concentrations. Optimal temperature and pH values are 45°C and 8,0 respectively. Optimal activity was performed at salt free conditions and activity decreased as the salt concentration increased but 85% activity was recovered at 5M NaCl concentration and resulted as stability at high NaCl concentrations. Besides, obtained lipase enzyme tested against surface active agents like Triton X-100 and SDS and potential uses in detergent industry is reported. The partially purified lipase succeeded to recover its activity in the presence of detergent additives tested; therefore, the enzyme has been considered to have a required potential for detergent industry.

**Keywords:** *Haloarcula hispanica*, extremely halophilic archaea, extremophile, extremozyme, lipase, lipolytic activity, partial purification

#### 1.1 Literatür Özeti

Lipazlar, çözünmeyen trigliserit substratlarına etki göstererek arayüzey aktivasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Biyoteknolojik uygulamalarda önemli olan biyokatalizörlerin başında gelmektedirler. Endüstriyel prosesler genel olarak zor şartlar altında gerçekleştiklerinden, ekstrem sıcaklıklar ve pH, ekstrem tuz konsantrasyonları ve organik çözücülerin varlığı gibi enzimatik reaksiyonlar için elverişsiz koşullarda da aktivitelerini sürdürebilen enzimlerin uygulama potansiyelleri vardır. Bu bakımdan, ekstremofillerden elde edilen lipazlar, endüstriyel proseslere önemli alternatif çözümler sunmaktadırlar.

Halofilik mikroorganizmalar, tuzu seven ekstremofilik organizmalardır ve yüksek tuz konsantrasyonlarına adaptasyon sağlama yeteneğine sahiptirler. Diğer proteinlerin denatürasyonuna neden olan, yüksek sıcaklık, tuz konsantrasyonu, organik çözücüler ve yüzey aktif maddelerin varlığı gibi ekstrem koşullarda halofilik proteinler üç boyutlu yapılarını koruyarak çözünürlüklerini ve konformasyonlarını kaybetmeden aktivitelerini sürdürürler. Bu nedenle, ekstrem tuzlu ortamlarda stabil ve aktif olan lipolitik enzimler üzerine yapılan karakterizasyon çalışmalarının önemi son zamanlarda artmaktadır.

#### 1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, üzerinde az sayıda enzim çalışması bulunan, 2004 yılında ilk defa Türkiye Tuzköy Madeni'nden izole edilen, halofilik arkea olduğu bilinen *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşundan lipaz enziminin üretimi, enzim üretimini etkileyen

parametrelerin optimizasyonu, elde edilen ve kısmi olarak saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin saptanması, ekstrem koşullardaki fonksiyonu, farklı tuz konsantrasyonlarındaki stabilitesi ve yüzey aktif kimyasallara karşı direncinin araştırılmasıdır.

### **1.3 Hipotez**

Bu çalışmada kullanılan *Haloarcula hispanica*, yeni tanımlanmış, üzerinde yeterli enzim çalışması bulunmayan, aşırı tuzluluğa ve sıcaklığa dayanıklı olduğu saptanmış bir arkeadır. Halofilik arkealar ve proteinleri çok yüksek tuz konsantrasyonlarına kolayca adapte olabilme özellikleri dolayısıyla, ekstrem ortamlardaki stabilitelerini ve fonksiyonlarını sürdürmekte, bu nedenle literatürde “ekstremozim” ifadesiyle tanımlanmaktadırlar. Ekstremozimlerin, ekstrem koşullar altında yapılarını koruyabilme özellikleri sayesinde termal ve alkali stabilite gerektiren, ekstrem reaksiyon şartları altında gerçekleştirilen proseslerde kullanıma uygun olabilecekleri düşünülmektedir. Bu özelliklerinden dolayı bu çalışma için tercih edilen *Haloarcula hispanica*, özellikle ekstrem koşullar altında gerçekleştirilen endüstriyel proseslerde önemli uygulama potansiyeline sahiptir.

Halofilik arkeadan üretilen lipaz kısmen saflaştırılarak, bazı deterjan katkı maddelerinin varlığında aktivitesi incelenmiş ve enzimin deterjanlarda kullanıma uygunluğu araştırılmıştır. Bu çalışma, 2004 yılında tanımlanmış olan *Haloarcula hispanica*'dan lipaz üretimiyle ilgili literatürde bir çalışmanın olmaması, üretilen lipazın dünya pazarında önemli yeri olan deterjan sektöründe kullanım potansiyelinin olması nedeniyle önem taşımaktadır.

### TEORİK BİLGİLER

Bu bölümde enzimler hakkında genel ve lipaz enzimi hakkında detaylı bilgiler verilecektir. Enzim kaynağı mikroorganizmalardan *Haloarcula hispanica*'nın fonksiyonu ve özellikleri anlatılacaktır.

#### 2.1 Ekstremofilik Arkeler

1930'lu yıllarda Edward Chatton, tüm canlıları evrimsel gelişmişlik düzeyleri, benzerlikleri ve hücre morfolojileri yönünden prokaryot ve ökaryot olmak üzere iki gruba ayırmıştır. İlerleyen zaman içerisinde ribozomal RNA dizi analizlerini kapsayan moleküler tekniklerin kullanılmaya başlanması ile hücresel yaşamın üç ayrı dalda evrimleştiği kabul edilmiş ve yaşamın üçüncü formu olan Arkeobakteriler 1970'lerin sonunda tanımlanmıştır. Böylece canlılar, prokaryotik olan Bakteri ve Arkeler ile Ökaryotlar olmak üzere 3 domain'e (üst aleme) ayrılmıştır [1].

Bakteriler gibi arkealar da çekirdeği olmayan tek hücreli canlılardır, yani prokaryotlardır. İlk tanımlanan arkeler aşırı ortamlarda bulunmuş olmalarına rağmen sonradan hemen her habitatta rastlanmışlardır [2].

Membran lipidlerinin kimyasal yapısı, Arkeleri bakteriden ayırt etmede kullanılır. Bakteri ve Ökaryotlarda hücre zarı lipidlerini meydana getiren yağ asitleri ve gliserol ester bağı ile birbirine bağlanırken, Arkea'nın hücre zarı lipidleri eter bağı ile birbirine bağlanan uzun hidrokarbon zincirleri ve gliserolden oluşur [3], [4].

Biyolojik bir terim olarak "arkea" ile jeolojideki Arkean veya Arkeozoik dönemin bir ilişkisi yoktur. Arkeozoik dönem, yer tarihinde arke ve bakterilerin gezegende yaşayan tek canlılar olduğu bir dönemin ismidir. Bu canlılara ait muhtemel fosiller 3,8 milyar yıl öncesine tarihlenmişlerdir [2].

1970'li yılların sonunda keşfedilen arkeobakteriler birçok biyoloğu fazlasıyla şaşırtmıştır. Çünkü bu bakteriler aşırı sıcak, aşırı tuz gibi çok ekstrem koşullarda yaşayabilme özelliğine sahiptirler. Çoğu arkea, aşırıseverdir (ekstremofil). Bazısı yüksek sıcaklıklarda, gayzerlerde veya deniz dibi sıcak su kaynaklarında oluşu gibi 100 °C'nin üstünde yaşarlar. Bazıları çok soğuk ortamlarda veya aşırı tuzlu, asit veya alkali ortamlarda bulunurlar. Bazı arkeler de ılıman şartlarda yaşar (mezofil); bataklık, deniz suyu, toprak ve atık sularda bulunurlar. Çoğu metanojenik bakteri geniş getiren hayvanların, insanların ve termitlerin sindirim sisteminde bulunur. Arkeler genelde diğer organizmalar için zararsızdır ve hastalık etmeni olarak bilineni yoktur [2].

Arkeler tercih ettikleri habitatlarına göre beş gruba ayrılırlar. Bunlar tuzsevenler (halofiller), metanojenler, sülfür indirgeyenler, ısısevenler (temofiller) ve psikofillerdir.

- **Halofiller:** Aşırı tuzlu ortamlarda yaşarlar. En önemli özellikleri çok tuzlu alanlarda yaşayabilmeleridir. Doğal tuz yüzeylerinde yaşarlar. Fotosentez yapabilirler.
- **Metanojenler:** Anaerobik ortamda yaşarlar ve metan üretirler (oksijensiz ortamda ürerler; enerji metabolizmalarının bir sonucu olarak metan gazı üretirler). Arkeobakterilerin büyük bir kısmını oluştururlar. Bataklıklar ve göllerin dipleri gibi oksijence fakir alanlarda, tortu tabakalarında ve hayvanların bağırsaklarında yaşarlar. Bu türler 98 °C civarında en iyi gelişimi gösterirler. 84 °C'nin altındaki sıcaklıklarda ölürler. Bazı türleri ise volkanik bölgelerde sıcaklığın 110 °C olduğu sularda bulunurlar.
- **Termofiller:** Sıcak su kaynakları gibi yüksek sıcaklıklı yerlerde yaşarlar. Bu gruplar mutlaka moleküler genetik yöntemlerle belirlenmiş filojenilere uymayabilirler, tüm arkeleri kapsamayabilirler ve birbirlerini dışlamayabilirler. Gene de daha ayrıntılı çalışmalara başlangıç olarak faydalı sayılırlar.

- **Termoasidofiller:** Kemosentetik olan bu bakteriler sülfür kaynaklarında bulunmuşlardır. 65-85°C'lik sıcaklıkları ve pH'ın 1,0 olduğu yüksek asidik ortamda bulunurlar.
- **Sülfür İndirgeyenler:** Hidrojen ve genellikle volkanik kökenli inorganik sülfürü enerji kaynağı olarak kullanırlar. 85 °C sıcaklıkta yaşayabilirler. Bu bakteriler hakkında çok az şey bilinmektedir.
- **Psikofiller:** Bunlar aşırı soğuk ortamlarda yaşayabilen canlılardır [2].

### 2.1.1 Halofilik Arkeler

Aşırı halofilik arkea, çok çeşitli prokaryot türlerini içeren bir gruptur. Doğal tuz gölleri, denizler, yüksek tuzlu topraklar ya da çok tuzlanmış balık ve et türü yiyeceklerin yüzeyleri gibi yapay olarak ortaya çıkan yüksek derecede tuzlu ortamlar, bu gruptaki canlıların habitatıdır. Bu tip habitatlar genellikle "hipersalin" (aşırı tuzlu) olarak adlandırılır. "Aşırı halofilik" terimi bu canlıların tuz ihtiyacının çok yüksek olduğunu belirtmek için kullanılmıştır. Bu tuzluluk oranı, kimi zaman ortamın tuza doyum noktasına yakın olabilir. Bu organizmalar normal olarak minimum 1,5 M (yaklaşık %9) NaCl'ye ihtiyaç duyarlar. Optimal büyüme için bu konsantrasyon 2-4 M (%12-13) olmalıdır. Hemen hemen bütün aşırı halofiller doyum noktası olan 5.5 M NaCl (%32) konsantrasyonda büyüebilirler, fakat bazı türler için böyle bir ortamda büyüme çok yavaş olabilir [5].

İlk halofilik arkelere ait bilgilere 5000 yıllık Çin eserlerinde rastlanmıştır; denizden tuz elde edilmesi işlemlerinde suyun kızardığı belirtilmiştir. Bu sonucun halofilik bakterilerden kaynaklandığı bilinmektedir. 1919 yılında Klebahn raporuna göre muhtemelen halobakterilerin ilk doğru tanımlamaları yapılmış ve ilk bakteri *Bacillus halobius* olarak adlandırılmıştır. Bunu takiben 1922 yılında tuzlanmış konserve morina balığı üzerindeki kırmızı lekelenmeye neden olan etken *Pseudomonas salinaria* izole edilmiştir. 1930'lu yıllarda solar tuzla ve tuz göllerinin ilk mikrobiyolojik çalışmaları yapılmış ve bu tür ekosistemlerdeki kırmızı halofilik bakterilerin önemi çeşitli çalışmalar neticesinde ortaya konmuştur [6], [7], [8].

Halofil bakteri grupları, gelişmeleri için ihtiyaç duydukları tuz miktarına göre ayrılırlar. Araştırmacılar 0,2 M'dan daha az NaCl konsantrasyonunda gelişenleri "halofil olmayanlar", 0,2-0,5 M NaCl konsantrasyonunda gelişenleri "zayıf halofiller", 0,5-2 M NaCl konsantrasyonunda gelişenleri "orta halofiller", 2-5,2 M NaCl konsantrasyonunda gelişenleri ise "aşırı halofil" bakteriler olarak sınıflandırmışlardır [9], [10], [11].

Halofilik proteinlerin aktivite, kararlılık veya çözünürlük için tuza gereksinimleri vardır. Halofilik protein denebilmesi için ortamda en az 2,5 M NaCl bulunmalıdır. Yüksek tuz konsantrasyonları proteinlerin konformasyonel kararlılığını etkiler [12]. Halofilik arkebakterilerin diğer birçok proteinlerine benzer olarak hücre duvarı proteini distile suya konulduğu zaman denatüre olur. Sonuç olarak tuz yokluğunda hücre duvarının denatüre olmasından ve dağılmasından ötürü hücreler parçalanır ve protein içerikleri dışarı verilir [13].

Halobakteri ifadesi kırmızı pigmentli ekstrem halofilik archaea, *Halobacteriales* ordosunda tek familya olan *Halobacteriaceae* üyelerini ifade eder. Halobacteriales ordosu kok ve basilden yassı ekstrem çok şekilli (pleomorfik) ve *Haloarcula japonica'* da görüldüğü gibi üçgen, trapezoid şekilli hücreleri içermektedir. Henüz kültüre edilmemiş ancak 16S rRNA sekans analizi çalışmaları sonucunda bu grupta yer aldığı belirlenen kare şekilli hücrelerde tespit edilmiştir [14]. Çoğu halobakteri büyümeleri ve hücre bütünlüğünü sağlamaları için 1,5M NaCl'e ihtiyaç duyarlar. Halobakteriler halofilik bakterilerden archaeal karakteristikleriyle (özellikle eter bağlı lipidleri) ayrılır. Çoğu halobakteri C50 karotenoidlerin varlığından dolayı kırmızı veya turuncu pigmentlidir fakat bazı türleri renksiz gaz vezikülleriyle beyaz, opak veya pembe pigmentlidir. Bakteriyorodopsin içeren mor membrana sahip halobakterilerde mor renkte görülebilir [15].

Halobakteriler en halofilik mikroorganizmalardır ve hipersalin tuzlalar doygunluğa eriştiğinde baskın olurlar, tuzlu suya kırmızı bir renk verir. 2500 yıl öncesine ait Çin kayıtlarında tuzlaların kırmızıya büründüğü halobakteriyel bir patlama olduğu bildirilmiştir. Halobakteriyel karotenoid pigmentleri güneş ışınlarının radyasyona, artan sıcaklığa ve tuzlardaki buharlaşmaya karşı hücreye bir koruma sağlar [15].

Soda gölleri sınırlı oranda alkalifiliklere barınak olur, bunlar yüksek tuzun yanında yüksek pH'a ihtiyaç duyarlar. Dünyadaki nötral hipersalin sular *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halorubrum* gibi hemen hemen benzer halobakteriyel türlere ev sahipliği yapar [16].

*Halobacterium* hücresinin hücre duvarı glikoproteinlerden oluşur ve Na<sup>+</sup> iyonları ile stabilize edilir. Na<sup>+</sup> iyonları *Halobacterium*'un hücre duvarının dış yüzeyine bağlanarak hücre yapısının korunmasını sağlar. Eğer ortamda yeterli miktarda Na<sup>+</sup> iyonu yoksa hücre duvarı parçalanır ve hücre patlar. *Halobacterium*'un hücre duvarında glikoprotein yapısında negatif yüklü aspartat ve glutamat gibi asidik aminoasitler bulunur. Bu aminoasitlerin karboksil gruplarının sebep olduğu negatif yükler, Na<sup>+</sup> iyonu ile kaplanır. Na<sup>+</sup> iyonu sulandırılarak uzaklaştırıldığında, bu proteinlerin negatif yüklü kısımları birbirlerini iterek hücrenin patlamasına neden olur. *Halobacterium*'un sitoplazmik proteinleri oldukça asidiktir ve aktiviteleri için K<sup>+</sup> iyonu gereklidir. Ayrıca ribozom yapısının bozulmaması için, dış ortamlarda fazla miktarda Na<sup>+</sup> iyonuna, iç ortamlarda ise K<sup>+</sup> iyonuna ihtiyaç vardır [17], [18].

Halofilik organizmaların (özellikle bakterilerin) karakterizasyonu ile ilgili birtakım çalışmalar yapılmıştır. Ekstrem olarak adlandırılan birçok mikroorganizma adaptasyon gösterdikleri ortam koşullarına bağlı olarak çeşitli özelliklere sahiptirler. Bu nedenle bu mikroorganizmaların biyoteknolojik ve ticari önemleri oldukça yüksektir. Halofilik organizmalar arasında bugüne kadar özellikle gram negatif organizmalarla çalışılmıştır [19]. Gram pozitif organizmalar bu alanda henüz yeni araştırılmaya başlanmış organizmalardır. Halofil mikroorganizmalar arasında *Halobacillus halophilus*, *Marinococcus halophilus*, *Bacillus halophilus* en fazla bilinenleridir. Bu organizmalar Ekstrasellüler nükleazlar başta olmak üzere birçok enzim ve ürünü sentezleme yeteneğine sahiptirler [20], [21], [22]. Bu ürünler arasında bakteriorodopsin, amilaz, lipaz, selülaz, proteaz, biyosümfaktanlar, lektinler ve biyoplastikler sayılabilir [23], [24], [25].

*Halobacteriales* ordosunun ekstrem halofilik arkeleri, organik maddelerin parçalanması ve petrolün bioremediasyonu dahil olmak üzere elektronik, gıda, tıp ve birçok kimyasal ve biyofiziksel çalışmalarda biyoteknolojik potansiyele ve uygulamalara sahiptirler [1].



Potansiyel biyoteknolojik uygulamalara sahip olan kırmızı halofilik arkelerin, tuzla-kristalizasyon göllerinde solar ısınmayı ve evaporasyonu arttırarak tuz üretiminin arttırılmasında kullanılabilecekleri ileri sürülmüştür [26], [27], [28]. Güneş ışığından elektrik üretimi, deniz suyundan tuz giderimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması ve ultra hızda ışık saptanması gibi alanlarda potansiyel olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [29], [30], [31].

Ayrıca Haloferax ve *Haloarcula* cinslerine ait bazı türlerin, ürettikleri ekzopolisakkarit yoluyla viskozite stabilizasyonunda, jelleştirme ajanı ve emülsifiyer olarak petrolün mikrobiyolojik geri kazanımını arttırmak için kullanılabilecekleri belirtilmiştir [31], [32], [33].

İlaç ve kozmetiklerin yapısında kullanılan lipozomların yapımında halofilik arkelerin esterazlara karşı yüksek bir kimyasal stabiliteye sahip olan eter bağlı lipidleri kullanılmaktadır. Amilaz, aminoglukozidaz, proteaz ve lipaz gibi yüksek tuzlulukta işlevsel olan ekoenzimleri, yüksek tuz konsantrasyonunda makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirler [31], [32], [34].

Düşük su aktivitesine adapte olan halofilik enzimlerin, endüstriyel organik sentezlerdeki yüksek özgülükleri ve etkinliklerinden dolayı önemleri artmaktadır[30], [35], [36]. Diğer yandan hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip halofilik arkeler petrol kazalarında dökülen petrolün bioremediasyonunda kullanılabilirler [37], [38]. İnseksit, lindan, DDT veya triklorofenoller gibi halojenli organik bileşenlerin yüksek konsantrasyonlarda üreyebilen halofilik arkelerin patentli proseslerde de kullanıldığı belirtilmiştir [21].

### **2.1.2 *Haloarcula hispanica***

Bu çalışmada kullanılan ve halofilik bir arkea olduğu bilinen *Haloarcula Hispanica* 2TK2 suşu, ilk defa 2004 yılında Birbir ve ark. tarafından, Türkiye, Tuzköy Madeni'nden izole edilmiştir [32]. Arkeal kaynaklı *Haloarcula hispanica*'nın 2TK2 suşu karakteristik özellikleri ile birlikte Çizelge 2.1'de sunulmuştur [39].

Çizelge 2. 1 *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşunun karakteristik özellikleri

<b>Karakteristikler</b>	<b>2TK2</b>
Koloni morfolojisi	Yuvarlak
Koloni büyüklüğü	2 mm
Koloni yüksekliği	Konveks
Koloni yoğunluğu	Parlak
Koloni kenarı	Düzensiz kenarlı
Pigmentasyon	Turuncu – Kırmızı
Hücre şekli	Düzensiz hücreler
Küt uçlu	+
Sivri uçlu	+
Yuvarlak uçlu	-
Hücre düzenlenmesi	Tekli ve çiftli hücreler
Gram negatif	+
Hareket	+
Hücre boyutu (am)	2.5x2.5-5.0
%0-8 NaCl	-
%10 NaCl	+
%15 NaCl	+
%25 NaCl	+
pH 4,5	-
pH 6,0	+
pH 7,0	+
pH 7,5	+
Oksidaz aktivitesi	+
Katalaz aktivitesi	+
Jelatin hidrolizi	+
Kazein hidrolizi	+
Nişasta hidrolizi	+
DNaz aktivitesi	+
Selülaz	+
Tween 80 hidrolizi	+
İndol üretimi	-
Nitratın nitrite indirgenmesi	+
Amonifikasyon	+
Nitratın amonyaka indirgenmesi	+
Nitrit ve amonyak varlığında Brown besiyerinde anaerobik gelişme	+
D-Glukoz	+
Maltoz	+
Sukroz	+
Laktoz	-

### 2.1.3 Halofilik Enzimler

Yunanca kökenli *hals*, tuz ve *phile* ise sevmek anlamına gelmektedir ve halofilik fonksiyon için tuza olan ihtiyacı ifade eder. Halofilik enzimler toplandıkları organizmanın halofilliğine veya aktiviteleri, stabiliteleri ve çözünebilirlikleri için gerekli tuza göre tanımlanırlar [12]. Aşırı halofillerde su dengesinin sağlanması çok önemlidir. Bazı mikroorganizmalar düşük su aktiviteli ortamlarda hücre içerisinde organik bileşikler sentezleyerek veya depolayarak kendilerini aşırı hipertonic ortamlardaki basınca dayanıklı hale getirirler. Bu bileşikler ile hücre yüksek basınçlı durumlarda bile susuz kalmaz ve hücrenin kendi iç yoğunluğu daha fazla olduğundan çevresinden devamlı olarak su alabilir. Yani hücrenin iç yoğunluğu sentezlenen bu bileşikler ile artırılır. 'Compatible solute' olarak adlandırılan bu bileşikler aşırı halofil bakterilerde ektoin, halofil bakterilerde K<sup>+</sup> ve glycine betain'dir [18], [40].

Günümüzde, aşırı halofil arkebakteriyel enzimler hakkında biyoteknolojik çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu cinslerin aşırı tuzlu ortamlarda aktif olması, uzun süre enzimlerin doğal koşullarda kararlı kalması, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmaları ve fazla miktarlarda organik çözücü içeren ortamlar gibi düşük su içeren ortamlarda katalitik aktivitelerini koruyabilmeleri, bu bakterilerin enzimlerinin ileride biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda ülkemizin zengin mikrobiyal biyoçeşitliliğinin avantajını kullanarak farklı tuzlu ortamlarda karbonhidrat sindirebilen enzimleri üreten aşırı halofil arkebakteri izolatları incelenmiştir [41].

Arkebakterilerin biyoteknolojik önemi her geçen gün artmaktadır. Örneğin; bazı aşırı arkebakterilerin tuzlu besinler, özellikle de salamura balıkların, etlerin üzerinde yaşaması besin endüstrisi açısından önemlidir. *Halobacterium* ve *Halococcus* türleri proteinleri parçalayan hücre dışı enzimler salarak besin maddesinde bozulmaya yol açmaktadırlar [42].

Halofil arkebakteride bulunan enzimler yüksek tuz konsantrasyonunda aktif, kararlı ve çözünür olmalıdır. Genelde tuz, enzimlerin çözünürlüğünü arttırmakta ve katlanmış yapının kararlılığını bozmaktadır fakat halofil enzimler, halofil bakterilerin sitoplazmasındaki KCl konsantrasyonlarından dolayı hem çözünür hem de kararlı

kalabilirler. Aşırı tuzlu ortamlarda çok fazla besin kaynağı bulunmadığından ortamda bulunan az miktarda besinin tam parçalanabilmesi için halofil mikroorganizmalar çeşitli enzimler salgılamaktadır. Açığa çıkarılan glikoz da bu mikroorganizmalar tarafından tek karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır [39]. Enzim çalışma çözeltilerinde halofil enzimlerin çalışabilmesi için mutlaka bir miktar tuz gereklidir. Eğer ortamda tuz bulunmazsa enzim aktivitesini kaybetmektedir. Yapılan çalışmalarda enzim aktivitesi için en ideal tuz konsantrasyonunun 4 M NaCl olduğu saptanmıştır [43]. Halofil Arkebakterilerde bulunan enzimler yüksek tuz konsantrasyonunda aktif, kararlı ve çözünür olmalıdır. Genelde tuz enzimlerin çözünürlüğünü artırır ve katlanmış yapının kararlılığını bozar fakat halofilik enzimler, halofil bakterilerin sitoplazmasındaki KCl konsantrasyonlarından dolayı hem çözünür hem de kararlı kalabilirler. Bu mikroorganizmaların adaptasyon mekanizmalarında enzim ile çözücü etkileşimleri ve üç boyutlu yapılar çok önemlidir. Kararlılık, stabilite ve aktivite, enzim dinamiği ile çok yakından ilgilidir ve protein dinamiği de çözücü çevresinden çok etkilenir. Halofil Arkebakterilerden elde edilen bazı enzimlerin aktiviteleri, tuz konsantrasyonunun daha da artırılmasıyla artarken bazı enzimlerde düşmektedir. Halofilik enzimler, tuzlu ortamda sadece iyi katlanmış, birbirleriyle etkileşen polipeptid zincirlerinden oluşmuştur gibi basit bir kavrama oturtamayız. Bu tür enzimler karmaşık bir protein yapısı içerirler ve çözücü tabakası ile etkileşirler. Bu etkileşimler sayesinde çözünürlüğe, alt ünitelerin kararlılığına ve alt üniteler arasında etkileşimlere müdahale edilmiş olur. Bu etkileşimler, kristal yapıda bile çözünürlüğünün sınırlı olması ve düzensizlikler nedeniyle gözlemlenemeyebilir. Tüm zorluklara rağmen halofilik adaptasyonun anlaşılabilmesi için bu çalışmalar oldukça önemlidir [12].

## **2.2 Enzimler**

Enzimler, canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında biyo-moleküllerdir. En belirgin fonksiyonları canlı hücrelerdeki metabolik reaksiyonları katalizlemeleridir.

Katalizleme olayı, enzimin üzerinde bulunan ve etkin bölge olarak bilinen çok küçük bir bölge tarafından gerçekleştirilir. Katalizleme sırasında substrat etkin bölgeye bağlanır. Maksimum katalitik etki, bu bölgede bulunan fonksiyonel grupların en uygun konuma gelmesiyle oluşur [44].

### 2.2.1 Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, kimyasal ve metabolik tepkimelerde katalizör görevi yapan, hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan salgılanan protein yapısında makro moleküllerdir. Biyolojik katalizör olan enzimler, hücre içersinde üretilmelerine rağmen birçoğu hücre dışına salınarak aktivite gösterirler. Enzimlerin bu özellikleri endüstriyel uygulamalarda kullanımlarının yolunu açmıştır [45].

Enzimin aktivasyonu, sahip olduğu katalitik yapısından kaynaklanmaktadır. Aktivasyon reaksiyonları enzim tüketilmeksizin gerçekleşir. Enzimin etki gösterdiği moleküle “substrat” adı verilir. Enzimlerin isimlendirilmeleri, etki gösterdikleri madde isimlerinin sonuna -az (-ase) eki getirilerek yapılır. Bütün enzimlerin aminoasit dizilimleri kendine özgüdür [45].

Doğada her metabolik reaksiyon enzimler tarafından kontrol edilir. Enzim, reaksiyon sırasında değişikliğe uğramadan yapısını korur ve başka bir substrat ile tekrar reaksiyona girer. Kimyasal katalizörlerin çoğunluğu birçok reaksiyonu katalizleyebilirler; seçici değildirler. Ancak biyolojik katalizör olarak adlandırılan enzimler oldukça seçici olup spesifik reaksiyonlarda katalizör etkisi gösterirler. Bu özellik, enzim molekülünün şeklinden kaynaklanır. Enzim – substrat ilişkisi, kilit – anahtar uyumu gibidir. Enzimler farklı iki kısımdan oluşur: Apoenzim (protein kısım) ve koenzim (organik ya da inorganik kısım). Bu kısımlar tek başlarına işlevsel değildirler. Bazı enzimler ise etkinlikleri için belirli iyonlara ihtiyaç duyarlar. Örneğin tükürükteki amilaz, nişastayı klor ( $Cl^-$ ) iyonlarının bulunduğu ortamda parçalayabilmektedir. Canlı bünyesinde bulunan mangan ( $Mn^{+2}$ ), bakır ( $Cu^{+2}$ ), çinko ( $Zn^{+2}$ ), demir ( $Fe^{+2}$ ) gibi eser elementler ve diğer bazı elementler enzimatik reaksiyonlarda aktivatör olarak kullanılır. Ayrıca bazı enzimlerin etkinliği yapılarındaki metal iyonlarına bağlıdır. Koenzim kısmı kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ), potasyum ( $K^+$ ), magnezyum ( $Mg^{+2}$ ), çinko ( $Zn^{+2}$ ) ise kofaktör adını alır. Koenzim kısmının organik olduğu durumlarda, bu kısmın apoenzime kovalent bağlarla bağlanması söz konusu ise prestatik grup olarak adlandırılır. Koenzim ve apoenzim birlikteliğine “haloenzim” denir [45].

Bir enzim molekülü genellikle globüler yapıda bulunur ve molekül içi veya arası bağlar ile sekonder ya da tersiyer yapıda tutulur. Proteinlerin bu yapıları sıcaklık ve pH etkisi

ile bozulabilir; bu nedenle enzimlerin katalitik aktiviteleri pH ve sıcaklığa bağlıdır. Her enzimin katalitik aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Bu değere “optimum sıcaklık” denir. Bu değerden yüksek sıcaklıklarda enzim yapısı molekül içi veya arası bağların kopması sonucu bozulmaya başlar. Aynı zamanda her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı vardır ve bu değere de “optimum pH” denir. Bazı maddeler ise enzimlerin aktif bölgelerine tutularak enzimin deformasyonunu sağlar, katalitik etkisini azaltabilir ya da tamamen sonlandırabilir; bu tür maddelere de “inhibitör” adı verilir [45].

### 2.2.2 Enzim Kaynakları

Endüstride kullanılan enzimler, bitkisel, hayvansal ya da mikroorganizma kaynaklıdır. **Hayvansal kaynaklı enzimler;** genellikle yumurta akı, domuz midesi, pankreas, geviş getiren hayvanların sindirim sistemi gibi yenilebilen organlardan izole edilmektedir ve besinlerin hazırlanmasında uzun zamandır kullanılmaktadır[46].

**Bitkisel kaynaklı enzimler;** toksik olmayan, yenmesinde bir sakınca bulunmayan bitkilerden elde edilmektedir. Bu sınıftaki en önemli enzim arpa tohumundan elde edilen malt amilazıdır. Bu enzim bira üretimi ve ekmek yapımında kullanılmaktadır[46].

**Mikrobiyal kaynaklı enzimler;** belirli mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Bu mikroorganizmalar toksik ve patojen olmayanlardan seçilirler. Bira üretimi, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı *Bacillus* sp. ve *Aspergillus* sp. tarafından üretilen amilaz ve  $\beta$ -glukanazlardır. Yine *Bacillus* ve *Aspergillus*'dan izole edilen proteazlar, deterjan üretiminde ve dericilikte derinin yumuşatılması amacı ile kullanılmaktadırlar [47].

### 2.2.3 Enzimlerin Salgılanma Şekilleri

Salgılanma şekillerine göre enzimler, intraselüler ve ekstraselüler olarak iki grupta değerlendirilmektedirler. Lipazlar ekstraselüler enzimlerdir ve bu yüzden gidecekleri son hedefe varmaları için bakteriyel membrana doğru taşınmaları gerekmektedir.

**İntraselüler enzimler**, sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları; şekerler, aminoasitler, karboksilik asitler gibi küçük molekül ağırlığına sahip, hücre zarından geçebilen enzimlerdir [46].

**Ekstraselüler enzimler**, besiyeri ve hücre yapılarının dış kısmı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanırlar. Örneğin *Escherichia coli* gibi gram-negatif bakterilerde proteinler iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşluk arasında kalırlar. Çünkü gram-negatif bakteri duvarları, gram-pozitif bakterilerde bulunmayan bir dış membrana sahiptirler. Gram-pozitif bakterilerde ise enzimler doğrudan besiyerine salgılanırlar. İntraselüler enzimlerin aksine, ekstraselüler enzimlerin stabilitesi daha yüksektir ve çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler [46].

## **2.2.4 Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametreler**

### **2.2.4.1 pH Etkisi**

Enzim reaksiyon hızları farklı hidrojen iyonu konsantrasyonlarında farklı değerler almaktadırlar. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH'a o enzimin optimum pH'ı denir. Optimum pH değerinin hemen yanındaki pH değerlerinde enzim reaksiyonlarının yavaşladığı görülmektedir. Genellikle optimum pH değerinden uzaklaştıkça aktivite düşmekte, enzim denatüre olmakta veya inaktif hale geçmektedir. Enzim çalışmalarında optimum pH'ta çalışabilmek için tampon çözeltiler kullanılmakta ve pH belirli bir değerde sabit tutulmaya çalışılmaktadır [44].

### **2.2.4.2 Sıcaklık Etkisi**

Normal kinetik kurallarına göre sıcaklık arttıkça reaksiyon hızında artmaktadır. Enzim reaksiyonları aktivite – sıcaklık ilişkisi bakımından incelendiğinde normal kimyasal reaksiyonlarla birebir uyuşmadığı görülür. Enzim reaksiyonlarında ancak belirli bir sıcaklığa kadar reaksiyon hızının, dolayısıyla aktivitenin arttığı görülür. Enzimatik reaksiyonlar bu sıcaklık sınırları içerisinde Arrhenius kanununa uymaktadırlar. Enzimler protein yapısında oldukları için belirli bir sıcaklıktan sonra yapıları bozulmaya başlar, belirli bir süre sonra da enzim tamamen denature olacağından enzim üst sıcaklık sınırına doğru çıkıldıkça tamamen aktivitesini yitirir [44].

#### **2.2.4.3 Substrat Konsantrasyonu Etkisi**

Enzim – substrat konsantrasyonu ilişkisi incelendiği zaman başlangıçta substrat konsantrasyonu arttıkça enzim tepkime reaksiyon hızının arttığı, dolayısıyla enzim aktivitesinin arttığı görölmektedir. Substrat konsantrasyonu belirli bir limite ulaşınca iki ihtimal söz konusudur: Substratı inhibe edici etkisi varsa reaksiyonun yavaşladığı, inhibe edici bir etkisi yoksa substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın hızın değişmeden sabit kaldığı gözlemlenmektedir [44].

#### **2.2.4.4 Enzim Konsantrasyonu Etkisi**

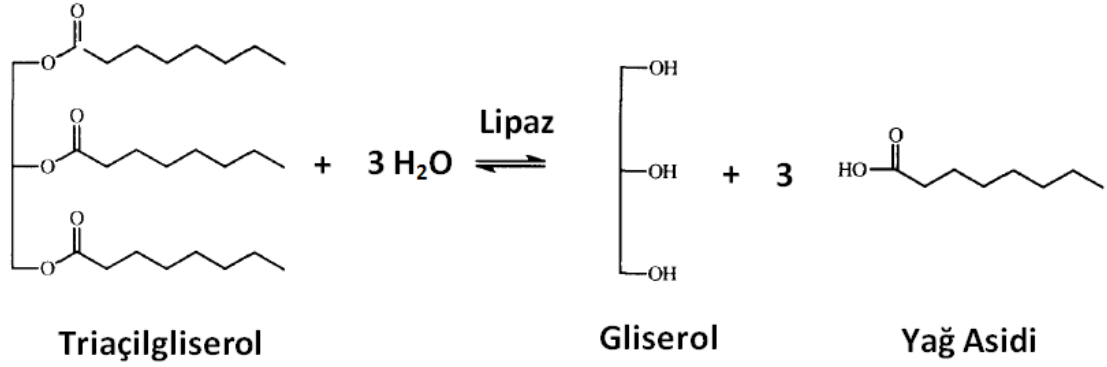
Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar, bu seviyeden sonra substrat konsantrasyonunun artması ile reaksiyon hızı değişmez [44].

### **2.3 Lipazlar**

#### **2.3.1 Lipaz Enzimi ve Yapısı**

Lipazlar (triacilgliserol ailhidrolaz, E.C. 3.1.1.3) geniş endüstriyel potansiyeli olan ve fizyolojik olarak büyük öneme sahip enzimlerdir. Lipazlar sulu ortamlarda triacilgliserollerde bulunan karboksilester bağları ile etkileşime girerek yağ asitleri ve gliserol oluşturan triacilgliserolester hidrolazlardır [48].



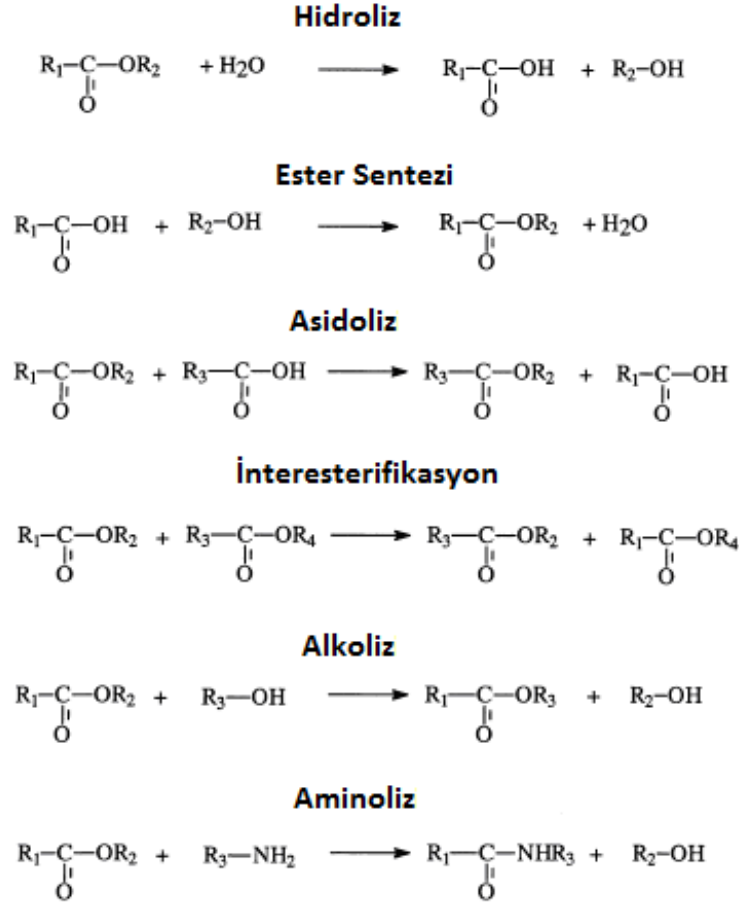


Şekil 2. 1 Lipazların katalitik etkisi. Bir trigliseridin, gliserole ve yağ asitlerine hidroliz edilmesi veya tersinir reaksiyon ile gliserol ve yağ asitlerinden trigliseritler sentezlenmesi [49]

Lipazlar, hücre dışı enzim üreten mikroorganizmalardan elde edilmektedir ve diğer enzimlere göre daha ucuz ve farklı kaynaklardan kolay elde edilebilmektedir. Bu yüzden biyokatalizör olarak geniş alanlarda kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin % 80'e yakını hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Proteaz ve karbohidrazlar gibi enzimler uzun yıllardır endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Günümüzde lipazlar, oldukça geniş uygulamalar ile giderek artan bu pazarın yaklaşık % 10'luk kısmını oluşturmaktadır. Lipazlar esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, kimyasal olarak üretilmeyen özel bileşiklerin üretimistereo, bölgesel spesifik özellikleri ile kolaylaştırmaları, ester bağına spesifik olmaları, yüksek substrat seçicilikleri ve yan ürün oluşumunu engellemeleri gibi avantajlara sahiptirler [50].

Esterazlardan farklı olarak, lipazlar yağ-su ara-yüzeyine adsorbe olduklarında aktiftir ve çözünen substrat içeren sulu çözeltilerde düşük aktivite gösterirler. Çok az suyun bulunduğu ortamlarda ise lipazlar esterifikasyon, alkoliz ve asidoliz gibi tersinir reaksiyonları da gerçekleştirebilmektedir [51].

Lipazlar çok yönlü katalizörlerdir. Doğal olarak yağların hidrolizini katalizlemeleri yanında esterleşme, transesterleşme, interesterleşme ve aminoliz tepkimelerini de katalizlerler (Şekil 2.2) [51].



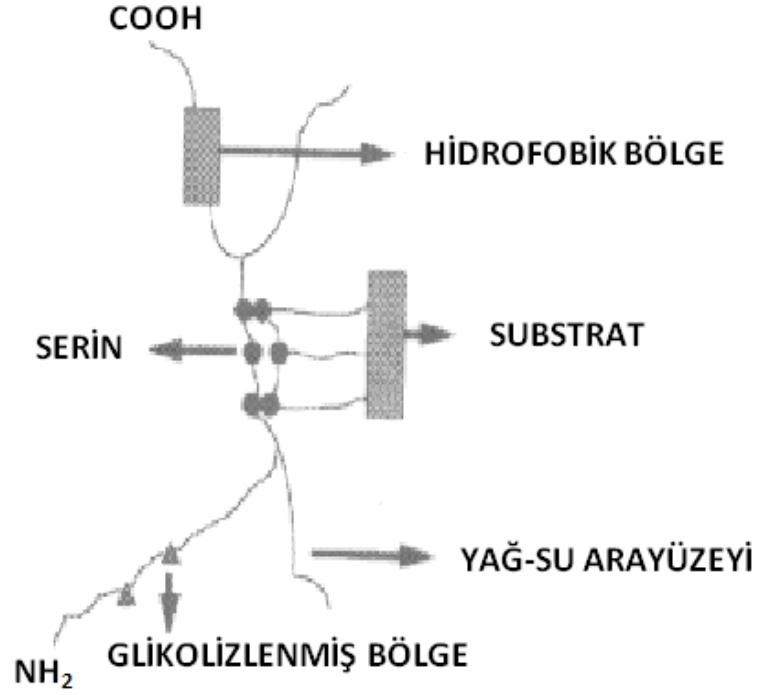
Şekil 2. 2 Lipazlar ile katalizlenen reaksiyonlar

Lipazlar lipolitik aktivitenin yanı sıra esterolitik aktiviteye de sahiptir ve geniş bir substrat seçiciliğinde regio-, kemo- ve enantiyoseçici katalizör olarak etki etmektedir. Bunun yanında substrat aralığını da büyük ölçüde arttırmaktadır [51]. Ökaryotlarda, lipazlar lipoprotein metabolizması, yağların parçalanması, adsorplanması ve tekrar düzenlenmesi gibi çok sayıdaki lipid metabolizmasında görev almaktadırlar. Bitkilerde ise enerji değişim dokularında bulunmaktadır.

Lipaz substratları suda oldukça düşük çözünürlüğe sahip triaçilgliserollerdir ve reaksiyonlar yağ-su arayüzeyinde gerçekleşir. Lipazların katalitik potansiyeli, protein mühendisliği, solvent mühendisliği, yönlendirilmiş evrim gibi yöntemler kullanılarak arttırılarak daha seçici hale getirilmektedir [52].

Lipazlar, yağ-su ara yüzeyinde etki gösteren aktif bölgesinde serin bulunan, serin hidrolazlardır. Katalitik üçlü Ser-Asp/Glu-His oluşmaktadır ve genellikle aktif bölgesinde

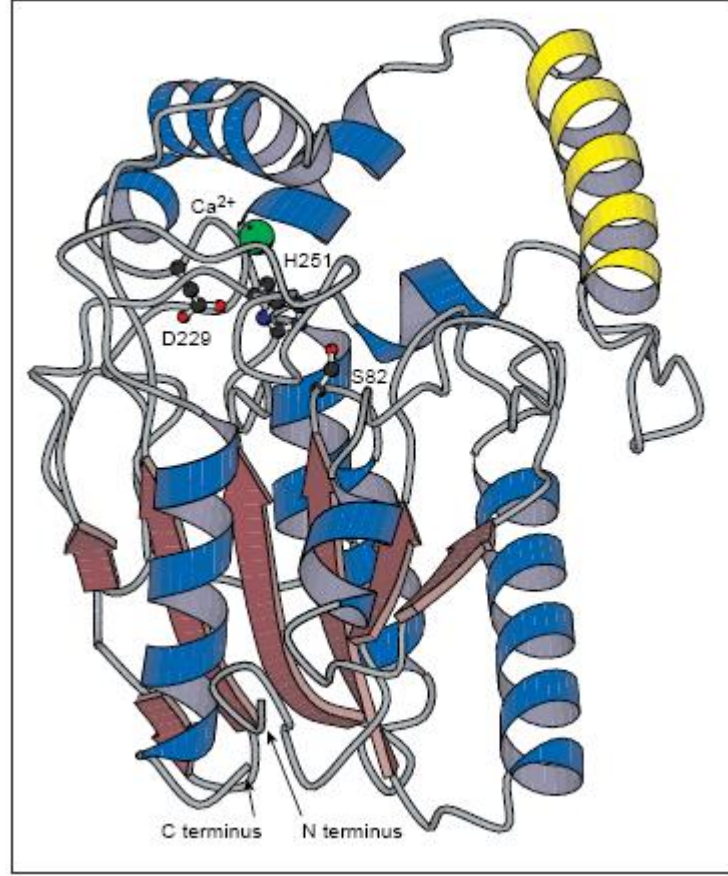
serin içeren Gly-x-Ser-x-Gly konsensus dizisine sahiptir. Lipazların 3-D yapısı incelendiğinde alfa-Beta hidrolaz katlanması içerdiği görülmektedir (Şekil 2.3) [53].



Şekil 2. 3 Lipaz molekülünün grafiksel gösterimi [50]

### 2.3.1.1 Lipazın Üç Boyutlu Yapısı

Lipazların büyük çoğunluğu, hücre dışı salgılanan, moleküler ağırlığı 20 ve 60 kDa arasındaki asidik glikoproteinlerdir. Çoğu saflaştırılmış lipazlar % 2-15 karbonhidrat içerir. Memeli, bakteri ve fungal kaynaklı lipazların primer yapıları saptanmış ve aminoasit sayılarının 270 ile 641 arasında değiştiği görülmüştür. Tüm lipazlar "α /β- hidrolaz katlanması" olarak bilinen karakteristik bir katlanma şekli gösterirler. Lipazın iç kısmı 8 farklı β zincirinden (β1- β8) oluşan merkezi β tabakası ve bunu çevreleyen 6 adet α-heliks (A-F) zincirinden oluşmaktadır (Şekil 2.4). Aktif bölge serin, aspartik (glutamik) asit ve histidin aminoasitlerini içeren katalitik üçlüden oluşur [49].

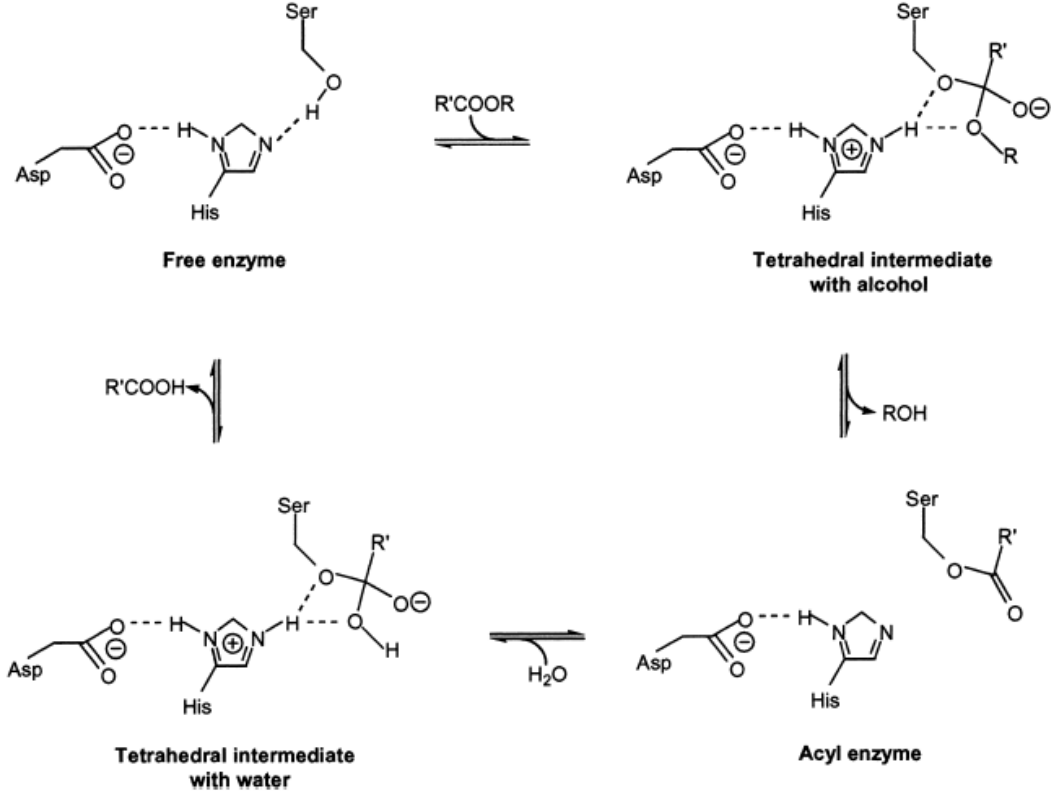


Şekil 2. 4 *Pseudomonas aeruginosa* lipazını yapısı [49]

### 2.3.1.2 Lipaz Etki Mekanizması

Lipaz katalizli esterleşme tepkimesinin mekanizması serin hidrolazlara benzemektedir. Burada iki tetrahedral arabileşik oluşmaktadır (Şekil 2.5). İlk tetrahedral arabileşik katalitik üçlüdeki serin rezidüsünün asit üzerine nükleofilik atağı ile oluşur. Arabileşik bir molekül su kaybettiğinde açıl-enzim kompleksi ortaya çıkmaktadır. Daha sonraki basamakta alkol molekülü açıl-enzim kompleksine nükleofilik atak yapar ve ikinci tetrahedral arabileşik oluşur. En son olarak ise bir ester molekülü kaybedilir ve enzim doğal formuna geri döner [54].

Lipazları esterazlardan ayıran; arayüzey aktivasyonudur. Lipolitik aktivite kritik konsantrasyonun altındaki substrat konsantrasyonlarında daima sıfırdır ve bu değer üstündeki substrat konsantrasyonlarında hızlı bir şekilde artar. Bu durum; yağ ve su arasındaki arayüzeyde hidrofobik substrat ile temas kurulmasını takiben kapağın açılması ve daha sonra lipazın aktif olması ile açıklanır.



Şekil 2. 5 Serin hidrolazın katalizlediği hidroliz/esterleşme tepkimelerinin mekanizması

### 2.3.2 Lipaz Kaynakları

Biyolojik olarak aktif enzimler herhangi bir canlı organizmadan elde edilebilirler. Lipazlar, bitki ve hayvan dokularından ekstraksiyonla veya mikroorganizmalardan fermantasyon yoluyla üretilir. Ticari lipazlar genelde mikrobiyal kaynaklıdır. Ekstrasellüler bakteriyel lipazlar üretimlerinin kolay olması nedeniyle kimyasal öneme sahiptir [56].

Ticari amaçla enzim üretiminde kullanılan kaynaklar çok geniş çaptadır. Endüstride kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mantar ve maya, % 13 bakteri, % 4 bitki, % 8 hayvan kaynaklıdır. Günümüzde enzim kaynağı olarak mikrobiyal kaynaklar, mikrobiyal olmayanlara tercih edilmektedir çünkü;

- (1) Genellikle üretimleri daha ucuzdur.
- (2) Enzim içerikleri daha kontrol edilebilir ve daha tahmin edilebilirdir.
- (3) Bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre daha kararlı yapıda enzim elde edilmektedir.

(4) Kullanılacak hammadde ve araç gereci sağlamak kolaydır.

(5) Hayvansal ve bitkisel dokular sağlığa zararlı materyaller içerebilirler.

Bitki ve hayvan kültürleri kullanımında karşılaşılan zorluklardan dolayı mikrobiyal kaynaklar tercih sebebi olmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin büyük bir çoğunluğu kısıtlı sayıda türden elde edilmektedir. En önemli lipaz kaynağı bakteriyel soylar *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* ve *Pseudomonas*'tır [57]. Bakteriyel lipazların başarılı bir şekilde kullanılması ile lipaz kaynaklı birçok ürün yakın geçmişte pazara girmiştir (Çizelge2.3) [56].

Fungal lipaz kaynağı olarak; *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Ashbya*, *Beauveria*, *Acremonium*, *Alternariacins*lerine ait türler kullanılabilir. Lipaz kaynağı olarak kullanılabilen mayalar ise; *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Trichosporon*'dur [58].

Çizelge 2. 2 Bazı mikrobiyal lipazların özellikleri [50]

Organizma	Spesifiklik	Moleküler ağırlık (kDa)	İzoelektrik noktası	Optimum pH	Optimum Sıcaklık
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Spesifik değil	30	7.3	6.5 – 7.0	70
<i>Pseudomonas sp.</i>	1,3 spesifik	32	4.5	7.8	47
<i>P. fluorescens</i>	1,3 spesifik	32	4.5	7.0	50 – 55
<i>Candida cylindracea</i>	Spesifik değil	120	4.2	7.2	45
<i>C. carvata</i>	18:1>16.0	195	-	5.0 – 8.0	60
<i>C. deformans</i>	1,3 spesifik	207	-	7.0	80
<i>Aspergillus niger</i>	1,3 spesifik	38	4.3	5.6	25
<i>Geotrichum candidum</i>	cis-doymamış yağ asitleri	55	4.3	6.6	40
<i>Humicola lanuginosa</i>	Spesifik değil	27.5	-	8.0	60
<i>Mucor miehei</i>	1,3 spesifik	-	-	8.0	40
Lipaz A	Spesifik değil	27	4.9	7.5	35
Lipaz B	Spesifik değil	36	4.1	5.8	40
<i>Rhizopus arrhizus</i>	1,3 spesifik	43	6.3	8.0	-
<i>R. delemar</i>	1,3 spesifik	41.3	4.2	5.6	35

Çizelge 2. 3 Ticari bakteriyel lipazlar, kaynakları ve uygulama alanları

Ticari Lipaz	Kaynak	Firma	Uygulama Alanı	Referans
Lumafast	<i>Pseudomonas menodocina</i>	Genecor International, USA	Deterjan	[51]
Lipomax	<i>P. alcaligenes</i>	Gist-Brocades, The Netherlands	Deterjan	[51]
-	<i>P. glumae</i>	Unilever, The Netherlands	Deterjan	[51]
-	<i>Bacillus pumilus</i>	Solvay, Belgium	Deterjan	[51]
Chiro CLEC-PC, Chirazyme L-1	<i>P. cepacia</i>	Altus Biologics, Manheim	Organik sentez	[49]
Amano P, P-30, PS, LPL-80, LPL-200S	<i>P. cepacia</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Organik sentez	[49]
Lipase AH	<i>P. cepacia</i>	AmanoPharmaceutic als, Japan	Organik sentez	[49]
Lipase AK, YS	<i>P. fluorescens</i>	AmanoPharmaceutic als, Japan	Organik sentez	[49]
Lipase 56P	<i>P. fluorescens</i>	Biocatalysts, UK Biotransformations,	Kimyasal	[59]
Lipase K-10	<i>Pseudomonas sp.</i>	AmanoPharmaceutic als, Japan	Organik sentez	[49]
Chromobacterium viscosum lipase	<i>C. viscosum</i>	Asahi Chemical Biocatalysts	Organik sentez	[59]
Lipase 50P	<i>C. viscosum</i>	Biocatalysts, UK Biotransformations,	Kimyasal	[59]
Lipase QL	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Organik sentez	[49]
Lipoprotein lipase	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Araştırma	[59]
Lipase PL, QL/QLL, PLC/PLG,QLC/QLG	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Organik sentez	[59]
Alkaline lipase	<i>Achromobacter sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Araştırma	[59]
Lipase AL, ALC/ALG	<i>Achromobacter sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Organik sentez	[59]
Combizyme 23P (proteinase/lipase mix)	-	Biocatalysts, UK	Atık İşleme	[59]
Combizyme 61P (proteinase/lipase mix)	-	Biocatalysts, UK	Atık İşleme	[59]

### **2.3.3 Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulama Alanları**

Mikrobiyal lipaz enzimi ise gıda endüstrisi başta olmak üzere çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağların işlenmesinde, gıda işlenmesinde, deterjan endüstrisinde, kimyasal sentezlenmesinde, eczacılıkta, kağıt yapımında ve kozmetiklerin üretiminde lipaz enzimi kullanılmaktadır. Bununla birlikte lipazlar yağlı atıkların geridönüşümde kullanılmaktadır. Endüstriyel enzim pazarının büyük bölümünü oluşturan ticari olarak kullanılan lipazların uygulama alanları Çizelge 2.5'te belirtilmiştir [60].

#### **2.3.3.1 Gıda Endüstrisi**

Katı ve sıvı yağlar gıdaların önemli bileşenlerindedir. Trigliseritin fiziksel özellikleri, besin değeri ve lezzeti; gliserol omurgasında yer alan yağ asitlerinin pozisyonu, zincir büyüklüğü ve doymunluk derecesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Gliserol omurgasında yer alan bir ya da daha fazla yağ asitinin pozisyonunun değiştirilmesi lipidlerin özelliklerinin değiştirilmesine olanak sağlar. Lipitlerin bu özelliklerinden dolayı, lipazlar ekonomik olarak daha değerli yağların oluşmasına olanak sağlamaktadır [61].

#### **2.3.3.2 Deri İşlenmesi**

Deri sanayisinde kılların ve deri altındaki yağların uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlemler, su içeren küvetlerde, yüksek sıcaklıkta, pH: 8-13 de derinin suya batırılması, yıkanması ve kıldan uzaklaştırılmasını içerir. Bu işlemler için termofilik lipazlar ve proteazlar hidrolitik özelliklerinden dolayı birlikte kullanılmaktadır [62].

#### **2.3.3.3 Kozmetik**

Yüzey parlaticılar ve aromalar, kozmetiklerin ve parfümlerin başlıca bileşenleridir. Lipazların surfaktanlar üzerinde ve aroma üretiminde aktivitelerinin bulunması, lipazların kozmetik alanında kullanımını önemli kılmıştır. Monoaçilgliseroller ve diaçilgliseroller, gliserolün lipazlar tarafından katalize edilen esterifikasyon reaksiyonları sonucu elde edilen ve kozmetik alanında kullanılan surfaktanlardır. Lipaz, gül oksit hazırlamak üzere 3,7-dimetil-4,7-oktadien-1-ol'ün transesterifikasyonunu



sağlamaktadır. Gül oksit parfüm endüstrisinde kullanılan önemli bir koku maddesidir [62].

#### 2.3.3.4 Deterjan Endüstrisi

Lipazlar yağları hidrolize edebilme özelliklerinden dolayı deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Lipazların deterjanlarda kullanılabilmesi için bazı gereksinimleri karşılamaları gerekmektedir; düşük substrat özgülüğüne sahip olup, yağların çeşitli pozisyonlardan hidroliz edilebilmesi ve pH 10-11 aralığında ve 30-60 °C arasındaki sıcaklıklardaki yıkama koşullarına dayanabilmesi önemlidir. Ayrıca lipazların deterjanda yer alan diğer enzimlerin ve surfaktanların vereceği hasarlara dayanıklı olması gerekmektedir (Çizelge 2.4) [61].

Çizelge 2. 4 Deterjanlarda kullanılan lipazlar

Enzim adı	Firma adı	Kaynak
Lipolase	Novo Nordisk	<i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> 'ye klonlanıp ekspres edilmiştir.
Lipomax	Gist Brocades	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , aynı organizmada klonlanıp ekspres edilmiştir
Lumafast	Genencor	<i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Bacillus sp.</i> 'de klonlanıp ekspres edilmiştir

#### 2.3.3.5 Organik Madde Sentezi

Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır. Bu enzimler hidrofilik-lipofilik ara yüzde çalışırlar ve reaksiyon karışımındaki organik çözücülere karşı toleranslıdırlar. Saf enantiyo bileşiklerin sentezinde lipazların kullanımı üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Lipazlar, su-sıvı ara yüzeyinde suya karışmayan trigliseritlerin hidrolizini katalize ederler. Belirli koşullar altında reaksiyon karışımındaki suyun miktarı lipaz tarafından katalize edilen reaksiyonun yönünü belirler. Susuz ya da suyun az olduğu reaksiyon durumunda, sadece esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları meydana gelir. Suyun varlığında ise hidroliz reaksiyonları oluşur [61].

### 2.3.3.6 Tekstil Endüstrisi

Kumaşların boyama işleminde; boyaların emilimini arttırmak için kumaştaki yağlayıcıların uzaklaştırılmasında ve kotların taşlanma işlemlerinde değişik renkte oluşan ince çizgilerin giderilmesinde kullanılır [63].

### 2.3.3.7 İlaç Endüstrisi

Lipazların stereo seçiciliği birbiriyle karışmayan tek fazlı sistemler içinde çeşitli rasemik organik asit karışımlarını çözmek için kullanılmaktadır. Rasemik alkoller lipaz tarafından katalizlenen transesterifikasyon reaksiyonları ile oluşturulan saf enantiyomerler içinde de çözülebilir [61]. Lipaz enziminin kullanıldığı sektörler Çizelge 2.5 'te özetlenmiştir. Çizelge 2.6'da ise ticari olarak kullanılan lipazlar verilmiştir.

Çizelge 2. 5 Lipaz Enziminin Kullanım Alanları [60]

Endüstri Adı	Kullanıldığı Yer	Kullanım Amacı
Deterjan Endüstrisi	Yağ hidrolizi	Kumaşlardan yağlı boyaların uzaklaştırılması
Süt ve Süt Ürünleri Endüstrisi	Süt yağının hidrolizi, peynir üretiminde, tereyağının modifikasyonu	Sütte, peynirde ve tereyağında lezzet artırıcı maddelerin geliştirilmesi
Fırıncılık Endüstrisi	Pastane ve fırın ürünleri	Raf ömrünün uzatılması
İçecek Endüstrisi	İçecekler	Aroma geliştirilmesi
Sos Üretimi	Mayonez, sos ve krema yapımı	Kalite artırılması
Doğal Gıda Üretimi	Transesterifikasyon reaksiyonları	Sağlıklı, doğal gıdaların üretilmesi
Et ve Balık Endüstrisi	Lezzet artırılması	Et ve balık ürünlerinde yağın uzaklaştırılması
Yağ Endüstrisi	Transesterifikasyon ve hidroliz reaksiyonları	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol, mono ve digliserollerin üretilmesi
Kimyasal Endüstri	Enantioseçicilik ve sentez reaksiyonları	Kiral yapıların ve çeşitli kimyasalların elde edilmesi
Eczacılık Endüstrisi	Transesterifikasyon ve hidroliz reaksiyonları	Sindirime yardımcı ajanların geliştirilmesi
Kozmetik Endüstrisi	Sentez reaksiyonları	Cilt nemlendiricilerinin ve emülsifyerlerin hazırlanması
Deri Endüstrisi	Hidroliz reaksiyonları	Deri üretimi amacıyla
Kağıt Endüstrisi	Hidroliz reaksiyonları	Kağıtların kalitesinin artırılması

Çizelge 2. 6 Ticari Olarak Kullanılan Mikrobiyal Lipazlar

Endüstri Adı	Kullanıldığı Yer	Kullanım Amacı
Deterjan Endüstrisi	Yağ hidrolizi	Kumaşlardan yağlı boyaların uzaklaştırılması
Süt ve Süt Ürünleri Endüstrisi	Süt yağının hidrolizi, peynir üretiminde, tereyağının modifikasyonu	Sütte, peynirde ve tereyağında lezzet artırıcı maddelerin geliştirilmesi
Fırıncılık Endüstrisi	Pastane ve fırın ürünleri	Raf ömrünün uzatılması
İçecek Endüstrisi	İçecekler	Aroma geliştirilmesi
Sos Üretimi	Mayonez, sos ve krema yapımı	Kalite artırılması
Doğal Gıda Üretimi	Transesterifikasyon reaksiyonları	Sağlıklı, doğal gıdaların üretilmesi
Et ve Balık Endüstrisi	Lezzet artırılması	Et ve balık ürünlerinde yağın uzaklaştırılması
Yağ Endüstrisi	Transesterifikasyon ve hidroliz reaksiyonları	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol, mono ve digliserollerin üretilmesi
Kimyasal Endüstri	Enantioseçicilik ve sentez reaksiyonları	Kiral yapıların ve çeşitli kimyasalların elde edilmesi
Eczacılık Endüstrisi	Transesterifikasyon ve hidroliz reaksiyonları	Sindirime yardımcı ajanların geliştirilmesi
Kozmetik Endüstrisi	Sentez reaksiyonları	Cilt nemlendiricilerinin ve emülsifiyerlerin hazırlanması
Deri Endüstrisi	Hidroliz reaksiyonları	Deri üretimi amacıyla
Kağıt Endüstrisi	Hidroliz reaksiyonları	Kağıtların kalitesinin artırılması

#### 2.3.4 Lipaz Üretim Koşulları

Bakteriyel lipazlar çoğunlukla hücre dışına salgılanırlar ve besiyeri ortamı, sıcaklık, pH, azot ve karbon kaynağı, yağların ortamda bulunması, inorganik tuzlar, çalkalama, çözülmüş oksijen konsantrasyonundan etkilenirler [64].

Lipaz üretimi genellikle uyarıcı bağımlıdır bu yüzden yağlar enzimin uyarılmasında etkileyici role sahiptir. Lipaz üretimi genellikle lipitler tarafından uyarılmaktadır ve trigliseritlerin ortamda bulunmasıyla koordineli olarak gerçekleşmektedir. Bunun yanında serbest yağ asitleri, hidroliz edilebilir esterler, safra tuzları ve gliserol de lipaz üretimini uyarılmaktadır [56].

Lipaz üretiminde hem indükleyici hem de inhibitör olarak etki eden trigliseritler önemli bir yer tutmaktadır. Trigliseritler arasında zeytinyağının lipaz üretiminin indüklenmesinde en etkili enzim olduğu gözlenmiştir. *P. fragi* 'nin lipaz üretimini doymamış yağ asidi tuzları inhibe ederken, *P. fragi* ve *M. freudenreichii*'in lipaz üretimine tribütirin ve trioktanoinin etkisi olmamıştır. Tereyağı, mısır yağı veya zeytinyağı *P. roqueforti*, *Saccharomyces sp.*, *B. licheniformis*, *M. caseolyticus* ve *Staphylococcus sp.* tarafından lipaz üretimini inhibe etmektedir. Zeytinyağı, yarfıstığı yağı, pamuk tohumu yağı gibi trigliseritler ve oleik asit, linoleik asit, linolenik asit gibi yağ asitleri *P. mephitica* tarafından lipaz üretimini uyarmaktadırlar. *A. wentii* büyüme besiyerine doğal ve sentetik lipitler ilave edildiğinde lipaz üretimi ve büyümede azalma göstermiştir. *R. oligosporus*'un yağ içeren besiyerine gum acacia gibi emülsiyeciler maddelerin ilavesiyle lipaz üretimi ve büyümesi artmıştır. Triolein, zeytinyağı, tribütirin ve oleik asit butilesteri protoplasta immobilize edilmiş lipaz üretimini indüklerken Tween 80 lipaz aktivitesini arttırmıştır [50].

Sugiura ve arkadaşları *Bacillus sp.*'den %1 zeytinyağı içeren besiyeri kullanıldığında lipaz ürettiklerini bildirmişlerdir [65]. Fruktoz ve palmiye yağı *Rhodotorula glutinis*'ten hücre dışı salınan lipaz üretimi için sırasıyla en iyi karbonhidrat ve lipit kaynağı olduğu bildirilmiştir. *Penicillium expansum*'den elde edilen alkali lipaz pH 8,3 %0,1 zeytinyağı içeren besiyerinde maksimum aktivite gösterirken ortama Tween 20 ve lubrol PX ilavesi enzim kararlılığını arttırmıştır. *Bacillus sp.* strain termofilik lipaz üretimi 70°C'de tripalmitin varlığında gerçekleştirilmiştir. *Ophiostoma piceae* mantarından lipaz üretimini gerçekleştirmek için farklı bitki yağlarının (zeytinyağı, soya fasulyesi, ayçiçeği, susam, pamuk tohumu, mısır ve yarfıstığı yağları) etkisi incelendiğinde maksimum aktivite zeytinyağı varlığında elde edilmiştir [61].

Çizelge 2.7'de farklı bakteri türlerinin fermantasyon koşulları verilmiştir.

Çizelge 2. 7 Lipaz fermantasyon koşulları

Bakteri	pH	Sıcaklık (°C)	Çalkalama (rpm)	İnkübasyon Süresi (saat)	Karbon Kaynağı	Azot Kaynağı
<i>Acinetobacter sp.</i>	7,0	25	200	9	Tween-80, zeytinyağı	-
<i>A. calcoaceticus</i>	6,8	30	250	12	Laktik asit, oleik asit	-
<i>A. calcoaceticus LP009</i>	7,0	15	200	24	Tween-80	Tripton, maya özütü
<i>Bacillus sp.</i>	7,0	28	200	80	Zeytinyağı	Pepton, maya özütü
<i>Bacillus sp. RSJ1</i>	9,0	50	200	12	Tween-80, zeytinyağı	Pepton, maya özütü
<i>Bacillus sp. strain 398</i>	7,2	55	200	12	Gliserol	Polipepton, maya özütü, et suyu
<i>Bacillus strain A30-1 (ATCC 53841)</i>	9,0	60	200	15–24	Mısır yağı	Amonyum Klorid, maya özütü
<i>B. alcalophilus</i>	10,6	60	100	20	Maltoz, soya küspesi	Pepton, maya özütü
<i>B. licheniformis strain H1</i>	9,0	50	200	10	Glukoz	Pepton, maya özütü, et suyu
<i>Burkholderia sp.</i>	7,0	45	250	24	Glukoz, hardal yağı	NH Cl, (NH ) HPO
<i>Geobacillus sp.</i>	9,0	70	200	24.	Tween-80, zeytinyağı	n.s.
<i>Pseudomonas sp.</i>	9,0	30	150	72	Soya küspesi, nişasta	Mısır maserasyon sıvısı, NaNO <sub>3</sub>
<i>Pseudomonas sp.</i>	7,0		150	60	Soya peptonu, pamuk küspesi, Yerfistiği yağı	Soya peptonu
<i>Pseudomonas sp. G6</i>	8,0	34	200	96	n-hegzadekan, tribütirin	n.s.
<i>Pseudomonas sp. strain KB 700A (recombinant lipase)</i>	7,0	37	150	16	Casamino acids	maya özütü
<i>P. aeruginosa</i>	8,5	37	200	6	Tween-80	KNO <sub>3</sub>
<i>P. aeruginosa LP602</i>	7,2	30	200	48	Peyniraltı suyu, soya yağı, glukoz	Amonyum sülfat, maya özütü
<i>P. fragi, P. fluorescens BW 96CCI, P. putida</i>	7,5	30	150	96	Dekstroz, tereyağı	Tripton, maya özütü
<i>P. putida ATCC 795</i>	7,5	27	150	72	Soya unu, nişasta, tuzsuz tereyağı	Bacto-pepton
<i>P. putida 3SK</i>	7,0	30	500	24	Zeytinyağı	-
<i>S. haemolyticus L62</i>	7,0	37	150	20	Zeytinyağı	Tripton, maya özütü
<i>Bacillus sp., Pseudomonas sp.</i>	7,0	30	150	24	Dekstroz, triolein	Tripton, maya özütü

## 2.3.5 Lipazlar Üretimini Etkileyen Parametreler

### 2.3.5.1 Karbon Kaynakları Etkisi

Mikrobiyal lipazların üretiminde çoğunlukla zeytinyağı, ayçiçek yağı, soya fasulyesi yağı, susam yağı, pamuk yağı, mısır yağı, yer fıstığı yağı ve palmiye yağı gibi bitkisel kaynaklı yağlar denenmektedir. Yağlı bir ortamda çoğalan mikroorganizmalar, lipaz üretme potansiyeline sahiptir. Mikroorganizmalar yağları karbon veya azot kaynağı olarak kullanırken bir yandan da lipaz üretmektedir.

Sugihara 1991'de *Bacillus sp.*'den %1 zeytinyağı içeren kültür ortamında lipaz üretmiştir. *Rhodotorula glutinis*'ten elde edilen hücre dışı lipazın üretiminde palmiye yağı en iyi lipid kaynağı olarak belirlenmiştir [66]. *P. fluorescens* SIK WI tarafından üretilen lipaz için ise trikaproik (C6), trikaprilin (C8) en iyi triaçilgliserol kaynağı olarak gözlenmiş, bununla birlikte enzim triolenin 1 ve 3 konumundaki ester bağlarını da hidroliz etmiştir [67].

Termofilik *Bacillus sp.* türü Wai 28A45'ten ısı kararlı lipaz üretimi tripalmitin, tristearin, trimiristin karbon kaynakları ile test edilmiş ve tripalmitin en iyi lipaz aktivitesi vermiştir [68]. Yine termofilik *Bacillus* türü A30-1 (ATCC 53841), mısır yağı ve zeytinyağı (%1) kullanıldığında maksimum seviyede lipaz üretmiştir [69].

*Rhizopus oryzae* için kolza tohumu ve mısır yağının lipaz üretimi için en uygun substratlar olduğu, optimal çoğalma için yağ derişiminin %3, optimal lipaz üretimi için yağ derişiminin %2 olduğu bildirilmiştir [70].

Bir alkali lipazın, *P. alcaligenes* M-1 tarafından sitrik asit ve soya yağı içeren ortamda üretildiği bildirilmiştir. Bu lipaz alkali bir ortamda yağ lekelerini çıkarmak için mükemmel bir özellik göstermektedir. *Bacillus stearothermophilus* L1'den sığır eti, palmiye yağı içeren ortamda yüksek alkali ısı kararlılıkta lipaz üretildiği açıklanmıştır. Sentetik substratlarla aktivite değerlendirmesi sonucunda enzimin özellikle *p*-nitrofenilkaprilata etki gösterdiği anlaşılmıştır [60].

*P. aeruginosa*'nın KKA-5 karbon kaynağı olarak hint yağı kullanıldığında maksimum lipaz aktivitesi verdiği ifade edilmiştir. Enzim alkali koşullarda kararlıdır [60].

*Acremonium strictum*'un, azot kaynağı olarak soya fasulyesi içeren ortamda büyükmiktarda lipaz üretmiş olduğu bildirilmiştir [60].

Farklı *Rhizopus* türlerinin lipazlarının (40-45 kDa) orta zincirli yağ asitlerine (C8-C10) karşı maksimum aktivite gösterdiği açıklanmıştır. *Candida curvata*, *C. tropicalis*, *C. valida* ve *C. pelliculosa*'dan üretilen lipazların trigliseritlerdeki farklı ester bağlarına nonspesifik olduğu belirlenmiştir [50].

*Geotrichum candidum* süt ürünlerindeki yağı hidrolize ederken C9'da *cis* çift bağı içeren yağ asitlerine spesiflik göstermiş olup, bu özelliği nedeniyle trigliseritlerin yapısal analizleri için başvurulan bir türdür [50].

*Aspergillus niger*'in hücre içi ve hücre dışı lipazları 1,3-(konum) spesifiktir. *P. cyclopium*, *P. verrucosum* var. *cyclopium* ve *P. crustosum* gibi *Penicillium* türlerinden izole edilen lipazlar bütirik asit için spesiflik göstermiştir. *P. cyclopium* lipazının di ve monogliseritlere trigliseritlere oranla daha yüksek aktivite gösterdiği açıklanmıştır. *H. lanuginosa* lipazları kokonat yağı ve yüksek miktarlarda laurik asit içeren yağlara daha fazla hidrolitik aktivite göstermektedir [50].

Lesitin, *R. japonicus*'un lipaz üretimini artırdığı belirlenmiştir. Doymamış yağ asidituzları *P. fragi*'nin lipaz üretimini inhibe etmiştir [50].

Zeytinyağı, yer fıstığı yağı, pamuk yağı ile oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi yağ asitleri *P. mephitica*'nın lipaz üretimini artırmaktadır [50].

Gao ve Breuil (1995) bir fungus olan *Ophiostoma piceae* lipazının üretiminde zeytinyağı, soya fasulyesi, ayçiçeği, susam pamuk, mısır yağı ve yer fıstığı yağı gibi farklı bitkiyağlarını karşılaştırmış, maksimum lipaz üretiminin zeytinyağı kullanıldığında gözlendiğini bildirmiştir [50].

*Rhizopus oryzae* ile yapılan bir incelemede ise ortama farklı türde yağların eklenmesi hem lipaz aktivitesini yükseltmiş, hem de yağsız ortamla karşılaştırıldığında hücre derişimi artmıştır. Hücre çoğalması için optimum bir yağ derişimi olup, optimum lipaz üretimi için bu derişim değişmiştir [60].

Lipaz üretimi için kullanılan karbon kaynaklarından biri de glukozdur; *P. fragi* lipazının üretimi için glukoz gerekli görülmüştür. *Talaromyces emersonii*'de ise kuru

mikroorganizma kütlesi başına lipaz aktivitesinin, karbon kaynağı olarak laktoz, mannoz, ksiloz, fruktoz, dekstrin ve ramnoz kullanıldığında glukoza oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir [50].

Genellikle mikroorganizmalar yüksek miktarda lipazı organik azot kaynakları (özellikle polipepton, mısır unu özütü, maya özütü) kullanıldığında sağlar. *Penicillium citrinum* türü için yapılan bir incelemede pepton içeren ortamda maksimum üretim elde edilmiştir [60].

*Humicola sp.*, *T. lanuginosus*, *Penicillium purpurogenum* ve *Chrysosporium sulfureum* mikroorganizmalarından ısı kararlı lipaz üretim çalışmalarında azot kaynağı olarak maya özütü kullanımının yüksek lipaz üretimi verdiği açıklanmıştır. Salleh ve ark. (1993) tarafından, *Rhizopus oryzae* tarafından hücre dışı lipaz üretimi için pepton optimal azotkaynağı olarak belirlenmiştir. Lin ve ark. (1996) *P. alcaligenes* F-111 tarafından soyatozu, pepton ve maya özütü içeren ortamda bir hücre dışı alkali lipaz üretildiğini, üretilen bu lipazın aktivitesinin sodyum dodesil sülfat, sodyum tripolifosfat, sodyumdodesilbenzen sülfonat ve sodyum alkil benzen sülfonat gibi katyonik surfaktanlardan etkilenmediğini bildirmiştir [60].

Üre ve amonyum sülfat kullanımı genel olarak lipaz sentezini inhibe etmekte, oleik asit ve Tween 80 lipaz üretimi için hızlandırıcı etki göstermektedir [60].

### **2.3.5.2 pH Etkisi**

Çoğalma ortamının başlangıç pH değeri lipaz üretimi için önemlidir. Maksimum aktivite *P. fragi* için pH > 7; *P. aeruginosa* için pH=9 iken gözlenmiş olup ortamın asitliğinin artmasının lipaz aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Buna karşılık maksimum çoğalma *S. lipolytica*, *M. caseolyticus*, *B. licheniformis*, *A. wentii*, *M. hiemalis*, *R. nigricans*, *Mucor racemosus*, *R. oligosporus*, *P. aeruginosa* EF2 için asidik pH (4.0-7.0) olarak açıklanmıştır [50].

### **2.3.5.3 Sıcaklık Etkisi**

Oso (1978), *T. emersonii* 'den lipaz üretiminde 45°C'in en iyi sıcaklık olduğunu bildirmiştir. 22-35°C aralığındaki sıcaklıkların da *A. wentii*, *M. hiemalis*, *R. nigricans*, *M.*



*racemosus*, *R. oligosporus* ve *P. aeruginosa* 'nın maksimum lipaz üretimi için optimum olduğu açıklanmıştır [50].

*P. fluorescens*'ten elde edilen lipazın bir proteaz olan subtilisin tarafından 20°C'ta inaktif olduğu bildirilmiş, bu etki mikroorganizma çoğalma ortamında daha yüksek sıcaklıklarda (30-40°C) daha fazla görülmüştür [50].

#### 2.3.5.4 Metal İyonları Etkisi

Pokorny ve ark. (1994),  $Mg^{+2}$ 'nin *Aspergillus niger*'den lipaz üretimini artırdığını açıklarken, benzer şekilde Janssen ve ark. (1994) termofilik bir *Bacillus* sp.'nin lipaz üretimini, üretim ortamına eklenen magnezyum, demir ve kalsiyum iyonlarının birkaç kat artırdığını bildirmiştir. Kok ve ark. (1995)'nin açıklamasına göre *Aci. Calcoaceticus* BD 413'ten hücre dışı lipaz üretimi de yine ortama eklenen  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ile artmıştır. Lin ve ark. (1995), *P. pseudocaligenes* F-111'in lipaz üretiminin fosfat içeren ortama  $Mg^{+2}$  eklenmesi ile artış gösterdiğini ifade etmiştir. Metal iyonlarının 1 mM derişimlerinin lipaz aktivitesine etkisini incelediği çalışmasında Lin ve ark. (1996), *P.pseudocaligenes* F-111 lipazının  $Fe^{+3}$  varlığında %60 inhibe olduğunu açıklamıştır [60].

Sidhu ve ark. (1998) tarafından ortamda  $Ca^{+2}$ 'nin termofilik *Bacillus* sp. RS-12'nin lipaz üretimini artırdığı ifade edilirken, Sharon ve ark. (1998), *P. pseudoalcaligenes* KKA-5 için ortamdaki  $Ca^{+2}$ 'nin lipaz üretimine etki etmediğini açıklamıştır. Sharon ve ark. (1998), *P. aeruginosa* KKA-5 lipazının  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  varlığında aktivitesini koruduğunu fakat  $Mn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  varlığında az miktarda,  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  gibi ağır metal tuzları varlığında güçlü bir şekilde inhibe olduğunu açıklamıştır. Benzer şekilde Hiol ve ark. (2000), *Rhizop oryzae* lipazının aktivitesinin  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  varlığında azaldığını rapor etmiştir. Chartrain ve ark. (1993) *P. aeruginosa* MB5001 lipazının 1 mM  $ZnSO_4$  ile %94 inhibe olduğunu açıklamıştır. Genellikle  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının lipaz üretimini artırdığı görülmektedir.  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ag^{+1}$  gibi ağır metal tuzları ise enzimi genellikle inhibe etmektedir [60].

### MATERYAL ve METOD

Yapılan deneysel çalışmalarda, farklı konsantrasyon ve içeriklerde hazırlanan Brown besiyerlerine *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşunun ekimi yapılmış ve her bir besiyerinde 50 gün boyunca bakterinin gelişimi ve ürettiği lipaz enziminin aktivitesi izlenmiştir. Aktivite tayin yöntemleri olarak titrasyon yöntemi ve spektrofotometrik yöntem kullanılmış, aktivite değerleri Ünite/mL enzim cinsinden ifade edilmiştir. Daha sonra üretilen besiyeri ortamındaki enzimler, amonyum sülfat çöktürmesi ve ultrafiltrasyon metoduyla kısmi olarak saflaştırılıp tekrar enzim aktivitesi ölçülmüş ve ticari lipaz enzimiyle karşılaştırmaları yapılmıştır. Böylelikle en aktif enzimi üretmeye uygun besiyeri şartlarının bulunması amaçlanmıştır. Ayrıca, kısmi saflaştırılmış lipaz için maksimum enzim aktivitesinin elde edildiği optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiş, tuzlu ortamdaki stabilitesi ve Triton X-100 ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) yüzey aktif maddelerine karşı direnci araştırılmıştır.

#### 3.1 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

##### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi, Ohaus marka Explorer Pro model: Kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.
- Distile su cihazı, GFL: Besiyerleri ve çözeltiler için kullanılan distile su temin edilmiştir.
- pH metre, Inolab/WTW: Besiyerlerinin ve tampon çözeltilerin pH'ının ayarlanmasında kullanılmıştır.

- Isıtıcı magnetic karıştırıcı, Heidolph marka MR Hei-Standard model: Besiyerlerinin ve tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
- Otoklav, Systech/2540 ML: Besiyerlerinin sterilizasyon işlemi için kullanılmıştır.
- Laminer hava akım kabini, Thermo Scientific MSC 1.2: Besiyerlerine ekim işlemleri steril kabin içerisinde yapılmıştır.
- Çalkalamalı İnkübatör, Lab Companion SI-300R: Ekim işlemi gerçekleştirildikten sonra, besiyerlerinin inkübasyonu için kullanılmıştır.
- Soğutmalı Mikro Santrifüj, Thermo IEC, Micromax RF: Besiyerlerinden alınan numunelerdeki bakterilerin çöktürülmesinde kullanılmıştır.
- Soğutmalı Santrifüj, Heraeus D-37520: Saflaştırma işlemine tabi tutulacak besiyerlerindeki hücrelerin çöktürülmesinde kullanılmıştır.
- Santrifüj cihazı, Hettich, 4800 rpm: Saflaştırma işleminde, amonyum sülfat tuzlarının çöktürülmesi için kullanılmıştır.
- Çalkalamalı su banyoları, GFL/1086: Aktivite tayinlerinde reaksiyonlar sıcaklık ayarlı olarak su banyoları içinde gerçekleştirilmiştir.
- UV-Visible Spektrofotometre, Sinco S-3100: Optik yoğunluk ölçümleri ve enzim aktivite tayinleri için kullanılmıştır.
- Ultrafiltrasyon sistemi, Stirred ultrafiltration cell – Amicon: Kısmi saflaştırma işleminde kullanılmıştır.
- Membranlar, Regenerated cellulose membrane Dia 100 mm, MW 10.000: Kısmi saflaştırma işleminde, ultrafiltrasyon sistemi içerisinde kullanılmıştır.
- Vorteks cihazı, Heidolph: Enzim aktivite ve Bradford tayinlerinde numunelerin homojenizasyonu için kullanılmıştır.

### **3.1.2 Kullanılan Malzemeler**

- Beher
- Erlen : 50 mL, 150 mL, 250 mL, 300 mL, 500 mL

- Balon joje : 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1L
- Mezür
- Ependorf tüpleri, 2 mL
- Falkon tüpleri, 50 mL
- Pastör pipetleri
- Deney tüpleri
- Otomatik pipet : 1-20 µL, 50-200 µL, 500-2500 µL
- Büret
- Filtre kağıdı

### 3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

**Besi yerlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar;** NaCl (Merck), KCl (Fluka), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Fluka), Maya ekstraktı (Difco), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck), Zeytinyağı, Ceviz yağı (Aksu Vital), Susam yağı (Aksu Vital), Balık yağı, Kudret narı yağı, Çuha çiçeği yağı, Aynısafa yağı (Aksu Vital), Tribütirin, Oleik asit, Stearik asit.

**Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar;** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Riedel de Haen), NaOH (Fluka), Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane (Merck), HCl (Merck), CH<sub>3</sub>COOH (Merck), NaHCO<sub>3</sub> (Merck), NaCl (Fluka).

**Kısmi saflaştırma işleminde kullanılan kimyasallar;** Amonyum sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(Fluka).

**Aktivite tayininde kullanılan kimyasallar;** Paranitrofenol, p-nitrofenil palmitat, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Triton X-100 (Fluka), İsoopropanol, NaOH (Fluka), Zeytinyağı, Fenol ftalein indikatörü, Etanol (Merck), Dietil eter.

**Protein miktarı tayininde (Bradford) kullanılan kimyasallar;** Coomassie Brilliant Blue G-250, Fosforik asit, Etil alkol %96 (Merck), Bovin Serum Albumin (BSA).

### 3.1.4 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

**Sodyum Fosfat Tamponu (PB);** Titrimetrik aktivite tayininde kullanılmıştır. 0,1 M, 1 L Sodyum Fosfat tamponu için, 15,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (a) ve 26,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (b) tartılarak ayrı ayrı 500 mL distile su içerisinde çözüldü. (a)'ya (b) eklendi ve 1 M NaOH ile oda sıcaklığında pH 7'ye ayarlandı.

**Tris-HCl Tamponu (1 mol/L);** Spektrofotometrik aktivite tayininde kullanılmıştır. 121,1 g Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane bazı tartıldı, 700 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra pH değeri HCl ile oda sıcaklığında 7,3'e ayarlandı. Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Otoklavda 20 dk. sterilize edildikten sonra buzdolabında saklandı.

**Karbonat tamponu;** 0,025 M Sodyum Karbonat Tamponu için gerekli miktarda (0,66 g)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  distile su içerisinde çözüldü ve hacmi 250 mL'ye distile su ile tamamlandı. pH değeri oda sıcaklığında ayarlandı.

pH 9,2 ve pH 10 değerlerinde gerçekleştirilen aktivite tayinlerinde, ilgili pH ayarlaması yapılarak karbonat tamponu kullanılmıştır.

**Asetat tamponu;** 0.1 M Asetat tamponu için gerekli miktarda (1,43 mL)  $\text{CH}_3\text{COOH}$  distile su içerisinde çözüldü ve hacim 250 mL'ye tamamlandı. pH metre aracılığıyla, tamponun pH değeri oda sıcaklığında ayarlandı.

pH 4, pH 5 ve pH 5,6 değerlerinde gerçekleştirilen aktivite tayinlerinde, ilgili pH ayarlaması yapılarak asetat tamponu kullanılmıştır.

**Alkol-eter çözeltisi;** Titrimetrik aktivite tayininde reaksiyonu durdurmak amacıyla 1:1 oranında eter-alkol çözeltisi kullanılmıştır. Eşit miktarlarda etil alkol ve eter karıştırıldıktan sonra, pH'ı nötrlemek amacıyla, iki damla fenol ftalein indikatörü damlatıldıktan sonra açık pembe renk görülünceye kadar 0,5 N NaOH çözeltisi eklenmiştir.

**NaOH çözeltisi;** Titrimetrik aktivite tayinlerinde, reaksiyon ortamı NaOH ile titre edilmiştir. Bunun için 0,04 N ve 0,08 N NaOH kullanılmıştır. 0,04 N NaOH için, 1,6 g NaOH tartılıp hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

NaOH çözeltisinin standardizasyonu (gerçek normalitesinin bulunması) için bir miktar Potasyum Ftalat etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 0,25 – 0,45 g arası bir miktar

tartılarak, bir erlende 100 mL distile su içersinde çözülmüştür. 2 damla fenol ftalein indikatörü damlatıldıktan sonra hazırlanan NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir, sarfiyat not edilmiştir. Aynı işlem üç defa tekrarlanıp ortalaması alınmıştır. Normalitenin hesaplanması için formül şu şekildedir:

$$A = \frac{B}{0,20423 \times C} \quad (3.1)$$

A = NaOH normalitesi

B = Potasyum ftalat tartımı (g)

C = NaOH sarfiyatı (mL)

**Paranitrofenil Palmitat (PNFP) çözeltisi;** Spektrofotometrik lipaz aktivitesi tayininde, lipaz substratı olarak kullanılmıştır.

1,59mM PNFP çözeltisi hazırlamak için, 0,03 g PNFP (MW=377,52 g/mol), 0,032 g SDS ve 1 g Triton-X tartıldı. Balon jodede isopropanol ile çözümlenerek son hacim 50 mL'ye tamamlandı. 45°C su banyosunda 15 dk karıştırılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Hazırlanan bu çözelti buzdolabında en fazla 3 gün bozulmadan muhafaza edilebilmektedir. Çözelti bulanıklaşırsa tekrar 45°C'de bekletilerek çözünmesi sağlanır.

**Commassie Brilliant Blue;** Protein miktarı tayinini için Bradford ayracı olarak kullanılmıştır. 1,05 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 12,5 mL %96'lık etanolde çözüldürüldü. Üzerine 25 mL %85'lik fosforik asit eklendi. Son hacim 250 mL'ye distile su ile tamamlandı. Karanlıkta bir gece karıştırılarak bekletildi. Filtre kağıdından süzüldü.

### 3.1.5 Lipaz Kaynağı Olarak Kullanılan Arkeik Bakteriler

Deneylerde Türkiye Tuzköy madeninden izole edilen *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşu kullanılmıştır. Lipaz üretimi için, daha önceden çoğaltılmış stok halinde bulundurulan kültür ortamlarından ekim yapılmıştır.

### 3.2 Deneylerin Yapılışı

Deneyler için izlenen yol;

- Lipaz üretimi: Farklı parametrelerde hazırlanan ve sterilizasyonu yapılan besiyerlerine bakteri ekimi yapılması ve inkübasyonu
- Besiyerlerinden iki günde bir numune alınması, protein yoğunluğu ve hücre gelişiminin izlenmesi, titrimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle lipaz aktivitesinin belirlenmesi
- Maksimum lipaz aktivitesine erişilen optimum besiyeri parametrelerinin saptanması
- Lipaz enziminin besiyerlerinden kısmi olarak saflaştırılması ve konsantre edilmesi
- Kısmi saflaştırılarak elde edilen lipaz enziminin aktivitesini etkileyen parametrelerin (sıcaklık ve pH) optimizasyonu
- Kısmi saflaştırılmış enzimin tuzlu ortamda stabilitesinin belirlenmesi
- Kısmi saflaştırılmış enzimin Triton X-100 ve SDS yüzey aktif maddelerine karşı direncinin araştırılması

#### 3.2.1 Besiyerlerinin Hazırlanması

Deneylerde lipaz üretim ortamı olarak Brown besiyeri kullanılmıştır. Lipaz üretimini indüklemek üzere besiyerlerine ilave karbon kaynağı olarak %1-4 oranında yağ eklenmiştir.

Maksimum lipaz aktivitesinin görüldüğü besiyeri koşullarını saptamak için, besiyerleri farklı tuz konsantrasyonları ve farklı karbon kaynakları olmak üzere değişik parametrelerde hazırlanmıştır.

1 L Brown besiyeri için standart olarak 250 g NaCl (4 M), 20 g MgSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O , 5 g Maya özütü, 3 g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O , 2 g KCl tartılıp distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözündürüldükten sonra pH'ı 2 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Besiyerleri otoklavda 121°C ve 1 bar basınç altında 20 dk sterilize edildi.

Deneylerde, (1) farklı tuz konsantrasyonlarının, (2) karbon kaynağı olarak farklı yağların, (3) farklı yağ asidi ve esterlerinin ve (4) yağ derişimlerinin lipaz aktivitesine etkisini incelemek üzere, 4 set besiyeri hazırlanmış ve ekim yapılmıştır.

Hazırlanan besiyeri ortamı parametreleri ve içerikleri Çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Hazırlanan besiyerlerinde incelenen parametreler

Besiyerleri	İncelenen Parametreler	
	Tuz (NaCl)	Karbon kaynağı
Besiyeri 1	3 M	%1 Zeytinyağı
Besiyeri 2	4 M	%1 Zeytinyağı
Besiyeri 3	5 M	%1 Zeytinyağı
Besiyeri 4 *	4 M	Kontrol
Besiyeri 5	4 M	%1 Zeyinyacağı
Besiyeri 6	4 M	%1 Susam yağı
Besiyeri 7	4 M	%1 Aynısafa yağı
Besiyeri 8	4 M	%1 Kudretnarı yağı
Besiyeri 9	4 M	%1 Çuha çiçeğı yağı
Besiyeri 10	4 M	%1 Balık yağı
Besiyeri 11	4 M	%1 Ceviz yağı
Besiyeri 12	4 M	%1 Ceviz yağı + %1 Tribütirin
Besiyeri 13	4 M	%1 Ceviz yağı + %1 Oleik asit
Besiyeri 14	4 M	%1 Ceviz yağı + %1 Stearik asit
Besiyeri 15 *	4 M	Kontrol
Besiyeri 16	4 M	%1 Ceviz yağı
Besiyeri 17	4 M	%2 Ceviz yağı
Besiyeri 18	4 M	%3 Ceviz yağı
Besiyeri 19	4 M	%4 Ceviz yağı

\* Besiyeri 4 ve Besiyeri 15 standart Brown besiyeridir.



Çizelge 3. 2 Farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan besiyerleri ve içerikleri  
(Toplam hacim 250 mL)

İçerik	Besiyeri 1 3 M NaCl	Besiyeri 2 4 M NaCl	Besiyeri 3 5 M NaCl
NaCl	44 g	58,5 g	73,1 g
MgSO <sub>4</sub>	5 g	5 g	5 g
Maya özütü	1,25 g	1,25 g	1,25 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	0,75 g	0,75 g	0,75 g
KCl	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Zeytinyağı	3 mL	3 mL	3 mL

Çizelge 3. 3 Karbon kaynağı olarak farklı yağlar içeren besiyerleri ve içerikleri  
(Toplam hacim 250 mL, 4 M NaCl)

İçerik	Besiyeri 4	Besiyeri 5	Besiyeri 6	Besiyeri 7	Besiyeri 8	Besiyeri 9	Besiyeri 10	Besiyeri 11
NaCl(4 M)	58,5 g	58,5 g	58,5 g	58,5 g	58,5 g	58,5 g	58,5 g	58,5 g
MgSO <sub>4</sub>	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
Maya özütü	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g
KCl	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Zeytinyağı	-	3 mL	-	-	-	-	-	-
Susamyacı	-	-	3 mL	-	-	-	-	-
Aynısafa yağı	-	-	-	3 mL	-	-	-	-
Kudret narı yağı	-	-	-	-	3 mL	-	-	-
Çuha çiçeğı yağı	-	-	-	-	-	3 mL	-	-
Balık yağı	-	-	-	-	-	-	3 mL	-
Ceviz yağı	-	-	-	-	-	-	-	3 mL

Çizelge 3. 4 Karbon kaynağı olarak farklı yağ asitleri ve yağ asidi esteri içeren besiyerleri ve içerikleri (Toplam hacim 250 mL, 4 M NaCl)

İçerik	Besiyeri 12	Besiyeri 13	Besiyeri 14
NaCl	58,5 g	58,5 g	58,5 g
MgSO <sub>4</sub>	5 g	5 g	5 g
Maya özütü	1,25 g	1,25 g	1,25 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	0,75 g	0,75 g	0,75 g
KCl	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Ceviz yağı	3 mL	3 mL	3 mL
Tribütirin (%1)	2,5 mL	-	-
Stearik asit (%1)	-	2,5 g	-
Oleik asit (%1)	-	-	3 mL

Çizelge 3. 5 Karbon kaynağı olarak farklı oranda yağ içeren besiyerleri ve içerikleri (Toplam hacim 250 mL, 4 M NaCl)

İçerik	Besiyeri 15	Besiyeri 16	Besiyeri 17	Besiyeri 18	Besiyeri 19
NaCl	58,5 g	58,5 g	58,5 g	58,5 g	58,5 g
MgSO <sub>4</sub>	5 g	5 g	5 g	5 g	5 g
Maya özütü	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g	1,25 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g	0,75 g
KCl	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Ceviz yağı	-	3 mL	6 mL	9 mL	12 mL

### 3.2.2 Bakterilerin Üretilmesi (Ekim İşlemi ve İnkübasyon)

Deneylerde Türkiye Tuzköy Tuz Madeni'nden izole edilen *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşu kullanılmıştır. Lipaz üretimi için, daha önceden çoğaltılmış stok halinde bulunduran kültür ortamlarından ekim yapılmıştır. Ekim işlemi steril kabin içerisinde, stok numunelerden ekim yapılacak besiyeri hacminin %10'u kadar alınarak besiyerlerinin üzerine eklenmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir. Ekim işleminden

sonranumuneler, mikroorganizmanın gelişmesi için optimum olarak saptanmış 40°C sıcaklık ve 100 rpm'ye ayarlanmış orbital çalkalamalı inkübator içine alınmıştır.

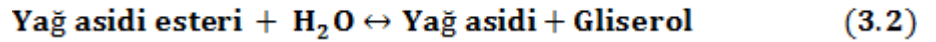
### 3.2.3 Analizler

#### 3.2.3.1 Optik Yoğunluk (OD) Yöntemiyle Hücre Derişimi Ölçümü

İnkübatördeki numunelerden pastor pipetleri aracılığıyla iki günde bir alınan numuneler, mikroorganizmanın gelişim evrelerinin takibi amacıyla analiz edilmişlerdir. Numuneler 1 mL'lik kuvartz küvetler içersine alınarak 600 nm'deki optik yoğunlukları ölçülmüştür. Blank (şahit) olarak, mikroorganizma içermeyen steril besiyeri numuneleri kullanılmıştır.

#### 3.2.3.2 Titrimetrik Yöntemle Lipaz Aktivitesi Tayini

İki günde bir besiyerlerinden alınan numunelerin lipaz aktivitesi titrimetrik yöntem ile tayin edilmiştir. Ependorf tüplerine alınan besiyeri numuneleri, hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 15000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Enzimin denatüre olmasını engellemek için santrifüj işlemleri 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Titrimetrik olarak lipaz aktivitesi belirlenirken substrat olarak zeytinyağı kullanılmıştır. Küçük bir erlene konulan 500 µL zeytinyağı, 2,5 mL 0,1 M pH=7,2 fosfat tamponu ve 400 µL hücresi çöktürülmüş lipaz üretim ortamı, su banyosunda 37°C'de 30 dk karıştırılmıştır. Reaksiyon eter/etanol (1:1) karışımından 2,5 mL reaksiyon ortamına eklenerek sonlandırılmıştır. Karışıma indikatör olarak 2 damla fenol ftalein eklenerek 0,08 N NaOH ile titre edilmiştir. Her bir numune için üçer tekrar yapılmıştır. Enzim aktivitesi, sarf edilen NaOH miktarından yola çıkılarak hesaplanmıştır.



Lipaz aktivite değerleri, U/mL enzim cinsinden verilmiştir.

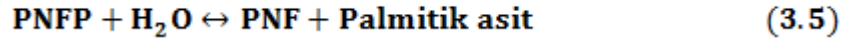
1 Ünite enzim (U), zeytinyağından dakikada 1 µmol yağ asidi hidrolizleyen (açığa çıkaran) enzim miktarı olarak tanımlanmış [65], [66] ve aşağıda verilen (3.3) numaralı eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\frac{U}{ml\text{ enzim}} = \frac{(\text{Örnek}, ml_{\text{harcanan}} - \text{şahit}, ml_{\text{harcanan}})_{(NaOH)} \times [NaOH] \times 1000}{(V_{\text{örnek}}, ml) \times t} \quad (3.3)$$

$$\frac{U}{ml\text{ enzim}} = \frac{(\text{Örnek}, ml_{\text{harcanan}} - \text{şahit}, ml_{\text{harcanan}})_{(NaOH)} \times 0,08\text{ N} \times 1000}{(0,4\text{ ml}) \times 30dk} \quad (3.4)$$

### 3.2.3.3 Spektrofotometrik Yöntemle Lipaz Aktivitesi Tayini

Spektrofotometrik olarak lipaz aktivitesi tayin edilirken, substrat olarak reaksiyona giren p-nitrofenil palmitatın (PNFP) enzimatik hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün (PNF) absorbansta yarattığı değişiklikten yararlanılmıştır.



Lipaz üretim ortamı 15000 rpm, 4°C sıcaklıkta 10 dk santrifüjlenerek hücre içeriğinden ayrılmıştır. Hidroliz reaksiyonu 2,5 mL PNFP çözeltisi; 2,5 mL pH 7,3 Tris-HCl tamponu ve 400 µL lipaz üretim ortamı (süpernatant) içeren toplam 5,4 mL'lik reaksiyon karışımı üzerinden yürütülmüştür. Reaksiyonlar 37°C 'ye ayarlı çalkalamalı su banyosu içerisinde 150 rpm çalkalama hızında karıştırılarak 15 dk için gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için deney tüpleri 99°C'lik su banyosuna aktarılmış ve 3 dk bekletilmiştir. Numuneler oda sıcaklığına geldiğinde Sinco S-3100 UV-Visible Spektrofotometre cihazı kullanılarak 404 nm'deki absorbansları okunmuştur. Hidroliz tepkimesi sonucunda açığa çıkan PNF'un 404 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. Enzim aktivite tayinleri her bir numune için üçer kere tekrar edilmiştir [67], [68].

Enzim aktivitesi, okunan absorbans değerlerinden yola çıkılarak hesaplanmıştır. Bunun için, bilinen konsantrasyonlarda PNF çözeltileri hazırlanarak, 404 nm'deki absorbans değerleri okunmuş ve bu değerler ile çizilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılmıştır.

Lipaz aktivite değerleri, U/mL enzim cinsinden verilmiştir.

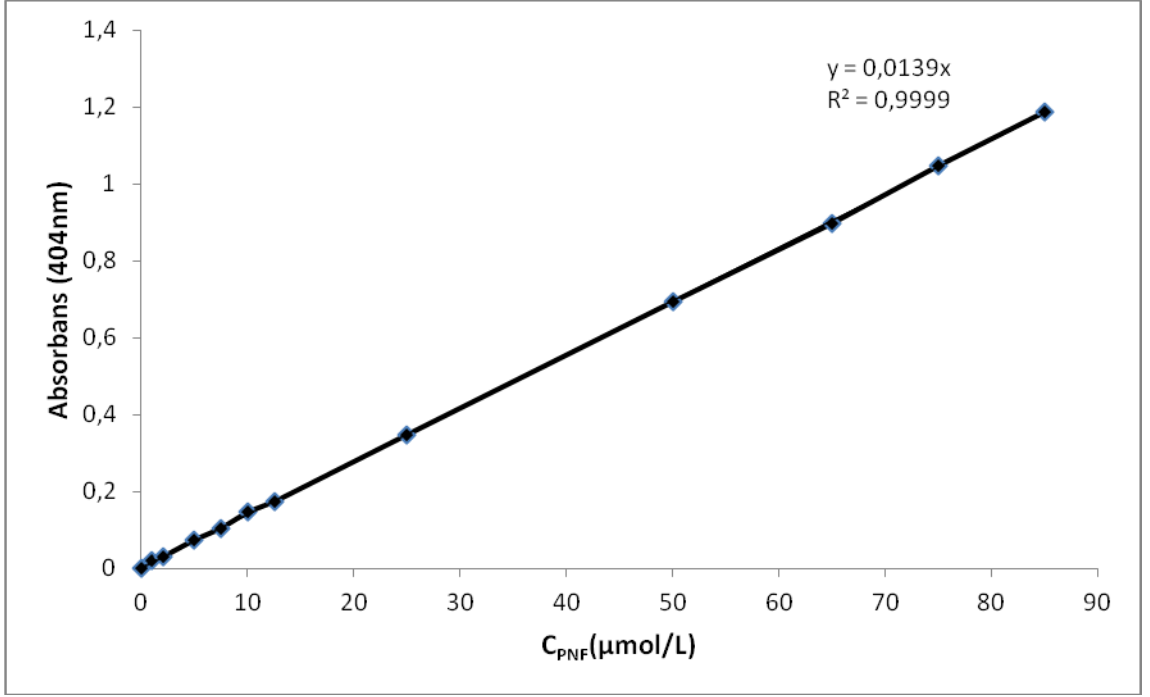
Bir Ünite enzim (U), 1 dakikada 1 µmol PNF açığa çıkarmak için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [69].

### Para-nitrofenol Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması ve Örnek Aktivite Hesabı

Spektrofotometrik aktivite tayininde hidroliz reaksiyonu ürünü olan para-nitrofenol (PNF) standard grafiğinin hazırlanması için öncelikle 0,00151 M PNF stok çözeltisi hazırlandı. Bunun için 0,021 g PNF (MW=139,11 g/mol) 100 mL distile su içerisinde çözüldü. Bu stok çözelti üzerinden distile su ile gerekli seyreltmeler yapılarak 1-85  $\mu$ M standart PNF çözeltileri hazırlandı. Konsantrasyonu bilinen bu standartların, PNF içermeyen şahite karşı  $\lambda=404$  nm dalga boyunda absorbanları okundu. Absorbans değerleri ile bilinen PNF konsantrasyonları arasındaki ilişki grafiğe döküldü (Şekil 3.1).

Çizelge 3. 6 Belirli konsantrasyonlarda PNF içeren standart örneklerin  $\lambda=404$  nm'de verdikleri absorbans değerleri

PNF derişimi ( $\mu$ mol/L)	Absorbans ( $\lambda=404$ nm)
0	0
1	0,0207
2	0,0302
5	0,0735
7,5	0,1034
10	0,1473
12,5	0,173
25	0,348
50	0,693
65	0,8984
75	1,0459
85	1,186



Şekil 3. 1 PNF kalibrasyon eğrisi

Aktivite reaksiyonları sonucunda absorbanları okunan örnekler için kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak, açığa çıkan PNF miktarları tespit edildi. Absorbans değeri 1'in üzerinde çıkan numuneler için, absorbans 1'in altına düşene dek gerekli seyreltmeler yapılarak okundu.

Aktivite (U/mL) hesabında, kalibrasyon grafiği vasıtasıyla bulunan PNF konsantrasyonlarından yararlanıldı.

Bir Ünite enzim (U), 1 dakikada 1 µmol PNF açığa çıkarmak için gerekli olan enzim miktarıdır tanımına ve Lambert Beer kanununa göre;

Lamber Beer kanunu:  $Abs = \epsilon \times b \times C$

$\epsilon = 0,0139 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (molar absorptivite katsayısı)

$b = 1 \text{ cm}$  (ışık yolu)

$C = \text{PNF konsantrasyonu } (\mu\text{mol/L})$

$V_T$  (Toplam hacim) = 5,4 mL

$V_{\text{örnek}} = 0,4 \text{ mL}$

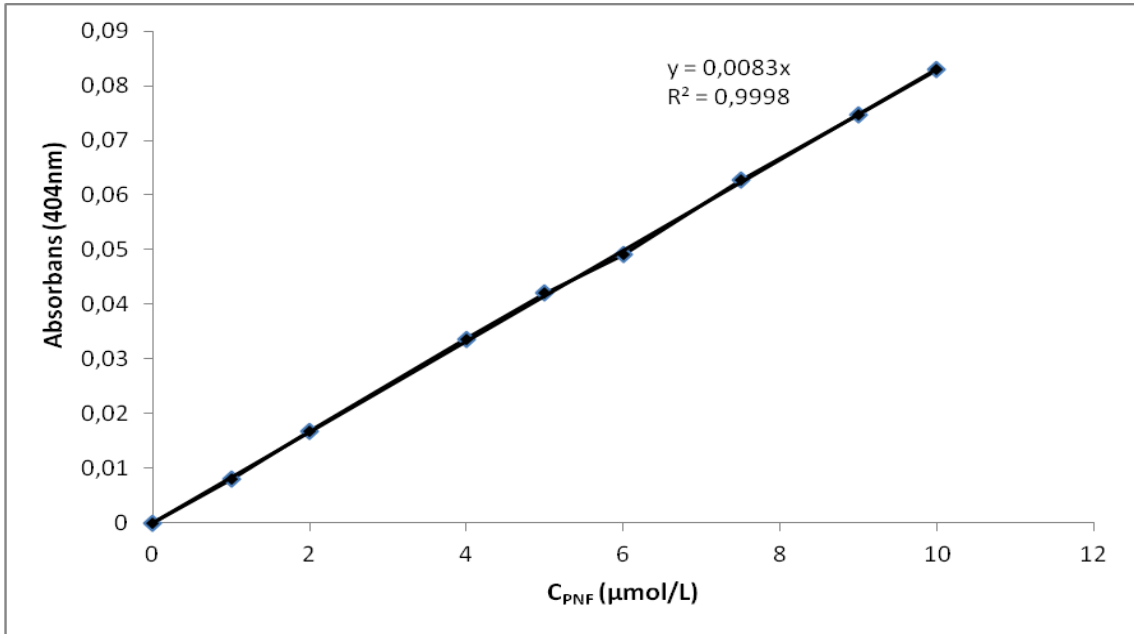
$t$  (reaksiyon süresi) = 15 dk

$$\frac{U}{ml\ enzym} = \frac{Abs}{\varepsilon (L.\mu mol^{-1}cm^{-1})} \times b(1cm) \times V_T(ml) \times \frac{1 L}{1000mL} \times \frac{1}{t(dk)} \times \frac{1}{V_{\text{ornek}}(m)} \quad (3.6)$$

$$\frac{\mu mol}{dk.ml enzym} = \frac{Abs}{0,0139(L.\mu mol^{-1})} \times 5,4(ml) \times \frac{1 L}{1000 mL} \times \frac{1}{15 dk} \times \frac{1}{0,4 ml enzym} \quad (3.7)$$

$$Aktivite \left( \frac{U}{ml enzym} \right) = Abs \times 0,0647 \quad (3.8)$$

Kısmi saflaştırma öncesinde yapılan lipaz aktivite tayinlerinde okunan absorbands değerleri 0,008-0,01 aralığında olduğundan, sadece bu aralık için daraltılmış ikinci bir kalibrasyon grafiği (Şekil 3.2) çizildi. Bunun için 1-10  $\mu\text{mol/L}$  konsantrasyon aralığında PNF standart çözeltileri hazırlanıp, 404 nm'de absorbandsları okundu.



Şekil 3. 2 Düşük absorbands değerleri için PNF kalibrasyon eğrisi

Şekil 3.2'de verilen kalibrasyon grafiğinde doğrunun eğiminden yararlanarak  $\varepsilon=0,0083$  olarak bulundu. Buna göre, yukarıdaki formüllerden katsayı yeniden hesaplandı.

$$\frac{\mu mol}{dk.ml enzym} = \frac{Abs}{0,0083(L.\mu mol^{-1})} \times 5,4(ml) \times \frac{1 L}{1000 mL} \times \frac{1}{15 dk} \times \frac{1}{0,4 ml enzym} \quad (3.9)$$

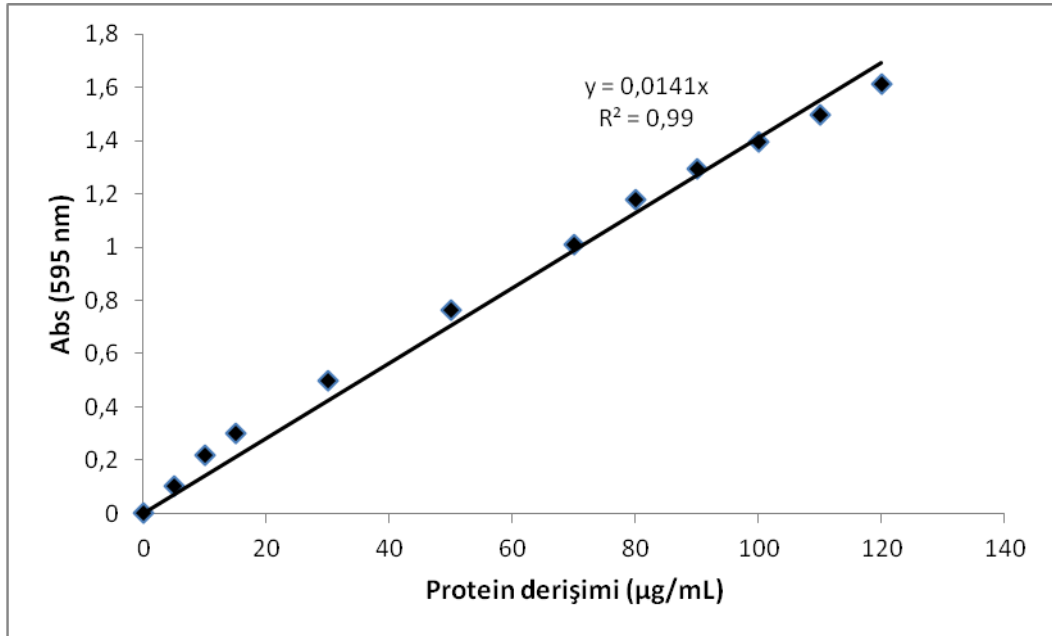
$$Aktivite \left( \frac{U}{ml enzym} \right) = Abs \times 0,1084 \quad (3.10)$$

0,008-0,01 aralığındaki tüm absorbands değerleri için aktivite hesabı yapılırken bu katsayı kullanıldı.

### 3.2.3.4 Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini ve Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması

Enzimler biyolojik reaksiyonları katalizleyen protein yapıda molekküllerdir. Lipaz enzimine ait aktivite sonuçlarının değerlendirilmesinde katkı sağlayacağından ortamdaki total protein miktarı belirlenmiştir. Bu çalışmada 5-100 mg/mL arasında oldukça hassas sonuçlar veren Bradford yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntem, "Coomassie Brilliant Blue G-250" boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbanasının ölçülmesi ilkesine dayanır [70].

Standart grafiğinin oluşturulması için 1 mg/mL bovin serum albumin (BSA) seyreltilerek kullanıldı. 1 mL distile su içerisinde 5 – 120 µg BSA içeren örnekler hazırlandı. Konsantrasyonları belli olan bu standartlar üzerine 1 mL Bradford belirteci eklendi ve vortekslendi. Şahit için standart çözelti yerine 1 mL distile su koyularak aynı işlem uygulandı. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilen örneklerin absorbanları 595 nm dalga boyunda, BSA içermeyen şahite karşı okundu. Absorbanstaki değişim ile protein miktarı arasında korelasyon grafiğe döküldü (Şekil 3.3) [71].



Şekil 3. 3 BSA ile hazırlanan protein standart grafiği



Çizelge 3. 7 Belirli konsantrasyonlarda BSA içeren standart örneklerin Bradford belirteci ile girdikleri reaksiyon sonucu 595 nm’de verdikleri absorbands değerleri

BSA miktarı (µg/mL)	Absorbans (OD <sub>595</sub> )
0	0
5	0,1024
10	0,22
15	0,30
30	0,50
50	0,7655
70	1,11
80	1,1783
90	1,2959
100	1,3969
110	1,4977
120	1,6138

Örneklerdeki total protein miktarları bu standart grafik üzerinden hesaplandı. Eğrinin denklemi üzerinden, bilinmeyen örneğin absorbandsı ölçülerek buna karşılık gelen protein konsantrasyonu hesaplandı.

İçerdiği protein miktarı belirlenmek istenen besiyeri örnekleri ve kısmi saflaştırılmış emzim örneklerinden 1 mL alınarak deney tüplerine konuldu, üzerine 1 mL Bradford belirteci eklendi ve vortekslendi. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi ve 595 nm’de absorbandsları okundu. Elde edilen absorbandslarla standart grafiğin eğiminden yararlanılarak örneklerdeki protein miktarı hesaplandı. Her örnekten üçer tekrar yapıldı.

#### 3.2.4 Kısmi Saflaştırma İşlemi

En aktif lipaz üretim ortamı olarak saptanan besiyerleri, en az 2 aylık inkübasyon süreleri sonunda kısmi saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Besiyerinin tamamı 50

mL'lik falkon tüpleri içersine alınmış, 15000 rpm, 4°C'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutularak hücrelerin çökmesi sağlanmıştır.

#### **3.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

Hücre içeriğinden arındırılan enzim üretim ortamına, %40 (w/v) doygunluk oluşturacak şekilde gerekli miktarda amonyum sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir. Bu oran, lipaz enzimi proteinlerini çöken ya da çökmeyen kısımda maksimum verimle tutmak için optimal doygunluk oranı olarak deneme yanılma yöntemiyle bulunmuştur. %40 doygunlukta (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanıldığında lipaz enziminin çökmeden kalarak diğer bazı proteinlerden ayrıldığı lipaz aktivite ve protein miktarı tayinleri yapılarak tespit edilmiştir. Çöktürme işlemi 4°C 'lik buzdolabı içersinde manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> küçük miktarlar halinde yavaş yavaş eklenmiş; her bir miktar eklenmeden önce bir önceki eklenen kısmın tamamen çözünmesi beklenmiştir. Çöktürme işlemi sonunda örnek tekrar falkon tüplerine alınarak 4800 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında supernatant dekante edilerek ayrılmış ve ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Amonyum sülfat ile çöktürme işlemi sonrasında pellet halinde çöken kısımda lipaz enzimi varlığını araştırmak amacıyla, pellet yeterli miktarda distile su içersinde 4°C'de tamamen çözüldürülmüş ve elde edilen protein + tuz çözeltisi ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmuştur.

#### **3.2.4.2 Ultrafiltrasyon**

Ultrafiltrasyon işlemi, rejenere selüloz membran kullanılarak, karıştırıcılı ultrafiltrasyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Çöktürme işlemi sonrasında elde edilen her iki fraksiyon (supernatant ve tuz-protein) ayrı ayrı ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Filtre üzerinde kalan 30 mL'lik kısım iki kere distile su ile yıkanmış ve proteinlerin muhafaza edilmesi amacıyla fosfat tamponu ile yıkanarak tampon çözelti içersine alınmıştır. Toplanan ultrafiltrasyon ürünü olası partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 4°C, 15000 rpm koşullarında 10 dk santrifüjlenmiştir.

### **3.2.5 Kısmi Saflaştırılmış Lipaz Üzerinden Aktivite Tayinleri ile Optimum Parametrelerin Belirlenmesi**

#### **3.2.5.1 Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi**

Maksimum enzim aktivitesinin sağlandığı optimum sıcaklık değerinin saptanması amacıyla, su banyosu farklı sıcaklık değerlerinde ayarlanarak hidroliz reaksiyonları yürütülmüş, titrimetrik yöntem ile aktivite tayinleri yapılmıştır. Para-nitrofenol'un uzun süre yüksek sıcaklık değerlerinde kendiliğinden parçalanması söz konusu olduğu için, titrimetrik aktivite tayini tercih edilmiştir. Aktivite tayinlerinde Besiyeri 5'ten (4 M, %1 zeytin yağı) saflaştırılan enzim numunesi kullanılmış, aynı örneğe Bradford protein tayini yapılarak kısmi saflaştırılan enzimin spesifik aktivite değeri belirlenmiştir.

Aktivite tayinleri 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Her sıcaklık değerinde üçer reaksiyon tekrar edilmiştir.

#### **3.2.5.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesi**

Maksimum lipaz aktivitesinin gerçekleştiği optimum pH değerinin saptanması amacıyla, pH 4 – 10 değer aralığında hazırlanan farklı tampon çözeltiler içerisinde hidroliz reaksiyonları yürütülmüş, spektrofotometrik yöntem ile aktivite tayinleri yapılmış, 404 nm'de absorbans değerleri okunmuştur.

pH 4 – 5,6 aralığında asetat tamponu, pH 6 – 8 aralığında fosfat tamponu, pH 9 için Tris-HCl tamponu, pH 9,2 ve pH 10 için karbonat tamponu kullanılmıştır. Enzim aktivite tayinleri, optimum sıcaklık değeri olarak belirlenen 45°C 'de yürütülmüştür. Besiyeri 17 (%2 ceviz yağı içerikli) üretim ortamından kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisi kullanılmıştır. Her pH değeri için üçer tekrar yapılmıştır.

#### **3.2.5.3 Optimum NaCl Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Maksimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği ortam tuz konsantrasyon değerinin belirlenmesi amacıyla, reaksiyonlar farklı tuz konsantrasyonları içeren ortamlarda, optimizasyon sürecinde belirlenen optimum sıcaklık ve pH koşullarında yürütülmüş ve enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Lipolitik aktivitenin en yüksek olduğu optimum pH değerindeki fosfat tamponu 1M, 2M, 3M, 4M ve 5M NaCl içerecek şekilde hazırlanmış ve titrimetrik aktivite tayinlerinde kullanılmıştır. Enzim aktivite tayinleri her molarite değeri için üçer numune halinde tekrarlanmıştır.

### **3.2.6 Kısmi Saflaştırılmış Lipazın Yüzey Aktif Maddelere Karşı Direncinin Araştırılması**

#### **3.2.6.1 Triton-X Varlığında Lipaz Aktivitesi**

Noniyonik yüzey aktif maddelerden olan Triton X-100 'ün farklı konsantrasyonlarda (%1-70 v/v) reaksiyon ortamına eklenmesinin lipaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Lipaz aktivite tayinleri, optimum değerler olarak saptanan ortam koşullarında gerçekleştirilmiştir. 15 dakikalık reaksiyonlar sonucunda spektrofotometrik aktivite tayini yapılmıştır. Bütün deneyler üç paralel olarak yürütülmüştür. Sonuçlar rölatif aktivite olarak verilmiştir (Şekil 4.19).

#### **3.2.6.2 SDS Varlığında Lipaz Aktivitesi**

Anyonik yüzey aktif maddelerden olan sodyum dodesil sülfatın reaksiyon ortamındaki varlığının lipaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, reaksiyon ortamına farklı oranlarda (%w/v) SDS eklenmiştir. Eklenen SDS oranları toplam reaksiyon hacmi üzerinden, %1, %2,5, %5 ve %10 (w/v) olmak üzere hesaplanarak fosfat tamponu içersinde çözülmüştür. Lipaz aktivite tayinleri, optimum olarak saptanan pH ve sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. 15 dakikalık reaksiyonlar sonucunda spektrofotometrik aktivite tayini yapılmıştır. SDS katılmayan örnek %100 aktif kabul edilerek, sonuçlar rölatif aktivite cinsinden verilmiştir (Şekil 4.20).

### DENEYSEL SONUÇLAR

Farklı ortam parametreleri ve yağ içerikleri kullanılarak hazırlanan Brown besiyerleri, mikroorganizma gelişimi ve lipaz aktivitesinin takibinin yapılması, maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü zaman ve şartların tespiti amacıyla, inkübasyon süresi boyunca iki günde bir düzenli olarak gözlemlenmiş ve aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Ekim işleminden sonra inkübatöre alınan besiyerlerinden, ekim işlemini takiben 48 saat sonra her iki günde bir aynı saatte numune alınarak düzenli olarak enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Bu işleme her bir besiyeri için 60 gün süre devam edilmiştir.

#### 4.1 Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler

Enzim aktivitesine besiyeri ortamının etkisinin araştırılması amacıyla, farklı kültür ortamı koşullarında Brown besiyerleri hazırlanmıştır. Besiyerlerinde değiştirilen parametreler, tuz konsantrasyonları, bitkisel yağ cinsi, yağ oranları ve kültür ortamına eklenen farklı yağ asidi ve esterleridir. Herbir parametrenin lipaz aktivitesine etkisi ayrı ayrı incelenmiş, aşağıdaki tablo ve grafiklerde gösterilmiştir.

##### 4.1.1 Tuz Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim üretimine ve aktivitesine tuz konsantrasyonu etkisinin incelenmesi amacıyla, tuz konsantrasyonu 3M, 4M ve 5M olacak şekilde üç adet %1 oranında zeytinyağı içeren besiyeri hazırlanmış, besiyerleri 100 rpm ve 40°C'de inkübe edilmiş, her biri için lipaz aktivitesi 60 gün boyunca takip edilmiştir. Elde edilen veriler çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1 Besiyeri tuz konsantrasyonlarının lipolitik aktiviteye etkisi (Ünite/mL enzim)

Gün	Lipaz Aktivitesi (U/mL)		
	3M NaCl	4M NaCl	5M NaCl
2	0,15	0,15	0,18
4	0,39	1,14	1,58
6	0,79	0,79	2,37
8	1,58	1,58	3,16
10	2,37	1,42	2,75
12	2,37	1,58	3,16
14	2,37	2,37	2,75
16	1,58	2,85	2,37
18	2,37	3,16	2,37
20	2,37	3,95	2,37
22	2,57	3,85	2,91
24	2,91	3,50	3,05
26	2,85	3,85	3,15
28	2,95	4,53	3,41
30	3,37	3,75	3,15
32	3,25	4,05	3,14
34	3,57	3,75	3,55
36	3,85	3,75	3,78
38	3,72	3,55	3,85
40	3,85	3,15	3,35
42	3,95	3,15	3,15
44	3,72	3,15	3,28
46	3,55	3,75	4,15
48	3,45	4,23	4,25
50	2,37	1,42	0,79
52	2,96	4,55	1,58
54	3,05	4,65	3,85
56	3,55	4,73	4,34
58	3,45	4,65	4,25
60	3,55	4,73	4,34



Şekil 4. 1 Besiyeri tuz konsantrasyonunun lipolitik aktiviteye etkisi (T=40 °C, N=100 rpm, pH=7,5; karbon kaynağı: zeytinyağı, değişken parametre: tuz konsantrasyonu)

Yapılan aktivite tayinleri sonucunda, tüm örneklerde ikinci günden itibaren lipaz enzimi aktivitesi tespit edilmiştir. İlk 20 gün içinde hızlı bir aktivite yükselmesi gözlenmiş, 30-45 gün arasında en yüksek değerlere ulaşılmış; 50. günden sonra önemli bir artış gözlenmemiştir. En yüksek lipaz aktivitesine 4.73 U/mL ile 4 M NaCl içeren besiyerinde 56. günde ulaşılmıştır. Bunu 4,34 U/mL ile 5 M'lık besiyeri, 3,85 U/mL ile 3 M izlemiştir. Optimum besiyeri tuz konsantrasyonu olarak 4 M belirlenmiştir.

#### 4.1.2 Karbon Kaynaklarının Etkisi: Farklı Yağlar

Enzim üretimine ve aktivitesine karbon kaynakları etkisinin incelenmesi amacıyla, karbon kaynağı olarak farklı yağlar içeren besiyerleri hazırlanmıştır. 7 adet farklı yağ kullanılmış, ayrıca kontrol amacıyla yağsız bir besiyeri hazırlanmıştır ve toplam 8 adet besiyerinden 60 gün süre ile numune alınmış, lipaz aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite tayinlerinde titrimetrik yöntem kullanılmıştır.

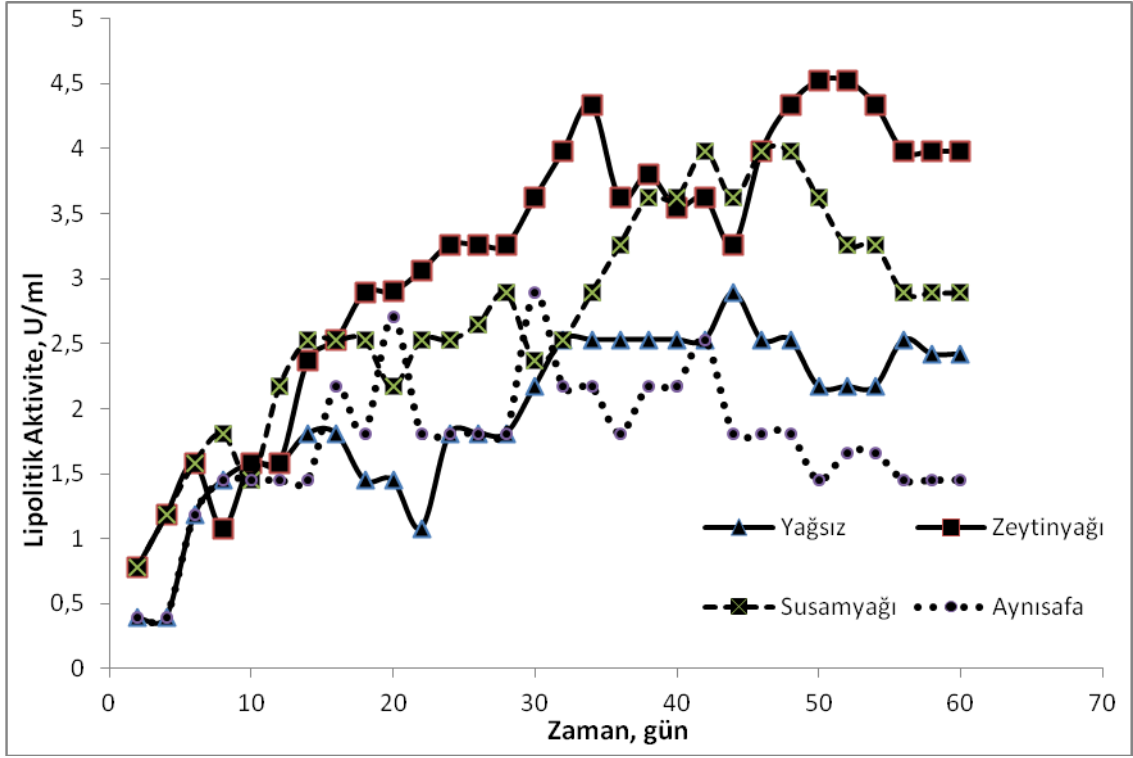
Kullanılan bitkisel yağlar; zeytinyağı, susam yağı, ayınsafa yağı, kudretnarı yağı, çuha çiçeği yağı, balık yağı ve ceviz yağıdır.

Farklı yağlar içeren besiyerlerinde titrasyonla yapılan lipaz aktivite tayin sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

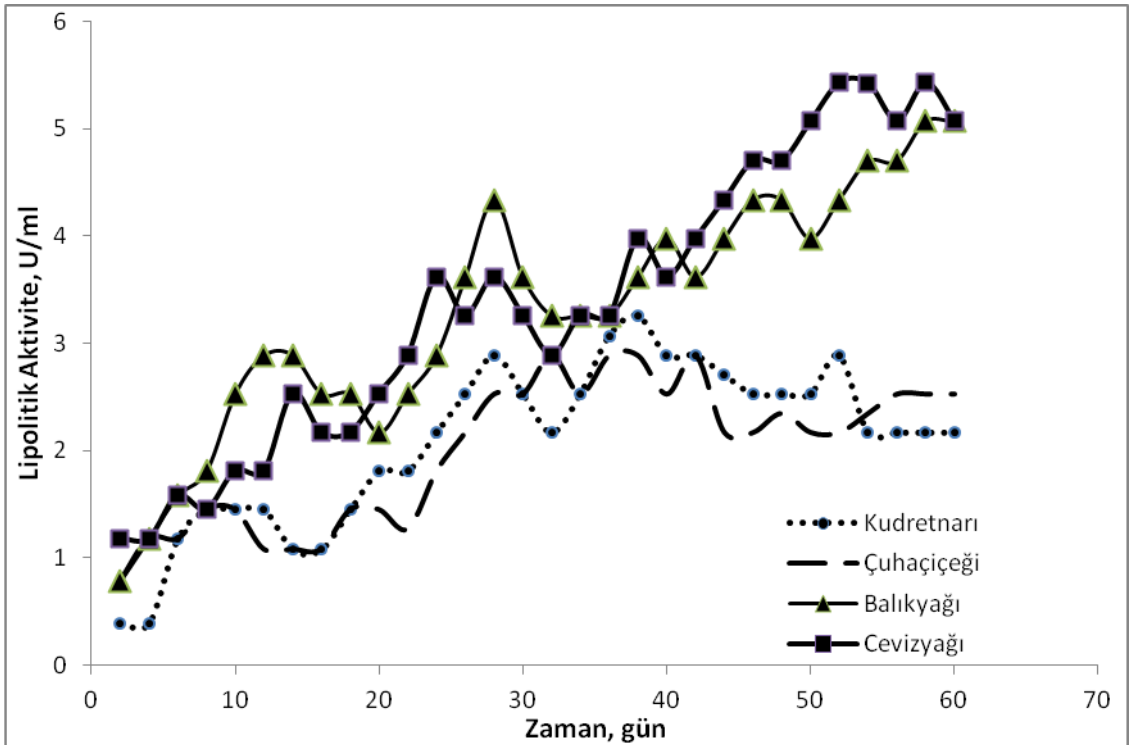
Çizelge 4. 2 Besiyerine katılan farklı karbon kaynaklarının (yağların) lipolitik aktiviteye etkisi (Ünite/mL enzim)

Gün	Yağsız besiyeri	Zeytin y.	Susam y.	Aynısafa	Kudretnarı	Çuha ç.	Balık y.	Ceviz y.
2	0,39	0,78	0,78	0,39	0,39	0,78	0,78	1,18
4	0,39	1,18	1,18	0,39	0,39	1,18	1,18	1,18
6	1,18	1,58	1,58	1,18	1,18	1,18	1,58	1,58
8	1,45	1,08	1,81	1,45	1,45	1,45	1,81	1,45
10	1,58	1,58	1,45	1,45	1,45	1,45	1,58	1,81
12	1,58	1,58	2,17	1,45	1,45	1,08	2,89	1,81
14	1,81	0,36	2,53	1,45	0,72	0,36	2,89	2,53
16	1,81	2,53	2,53	2,17	1,08	1,08	2,17	2,17
18	1,45	2,89	2,53	1,81	1,45	1,45	2,53	2,17
20	1,45	1,81	1,81	2,71	1,81	1,45	2,17	2,53
22	1,08	0,36	1,45	1,81	0,72	1,27	0,36	1,08
24	1,81	3,26	2,53	1,81	2,17	1,81	2,89	3,62
26	0,36	1,08	1,45	1,45	1,08	1,27	1,81	3,26
28	1,81	3,26	2,89	1,81	2,89	2,53	4,34	3,62
30	2,17	1,45	2,37	2,89	1,63	2,53	1,81	2,53
32	2,53	3,98	2,53	2,17	2,17	2,89	2,89	2,89
34	2,53	4,34	2,89	2,17	2,53	2,53	3,26	3,26
36	2,53	3,62	3,26	1,81	3,07	2,89	2,89	3,26
38	1,81	3,80	3,62	2,17	3,26	2,89	3,62	3,98
40	2,53	3,55	3,62	2,17	2,89	2,53	3,98	3,62
42	2,53	3,62	3,98	2,53	2,89	2,89	3,62	3,98
44	2,89	3,26	3,62	1,81	2,71	2,17	3,98	4,34
46	2,53	3,98	3,98	1,81	2,53	2,17	4,34	4,70
48	2,53	4,34	3,98	1,81	2,53	2,35	4,34	4,70
50	1,81	4,52	3,62	1,45	1,81	2,17	3,98	5,07
52	2,17	4,52	3,26	1,66	2,89	2,17	4,34	5,43
54	2,17	4,34	3,26	1,66	2,17	2,35	4,70	5,42
56	2,53	3,98	2,89	1,45	1,81	2,53	4,70	5,07
58	2,42	2,89	2,89	1,45	2,17	2,53	5,07	5,43
60	2,42	2,89	2,89	1,45	2,17	2,53	5,07	5,07



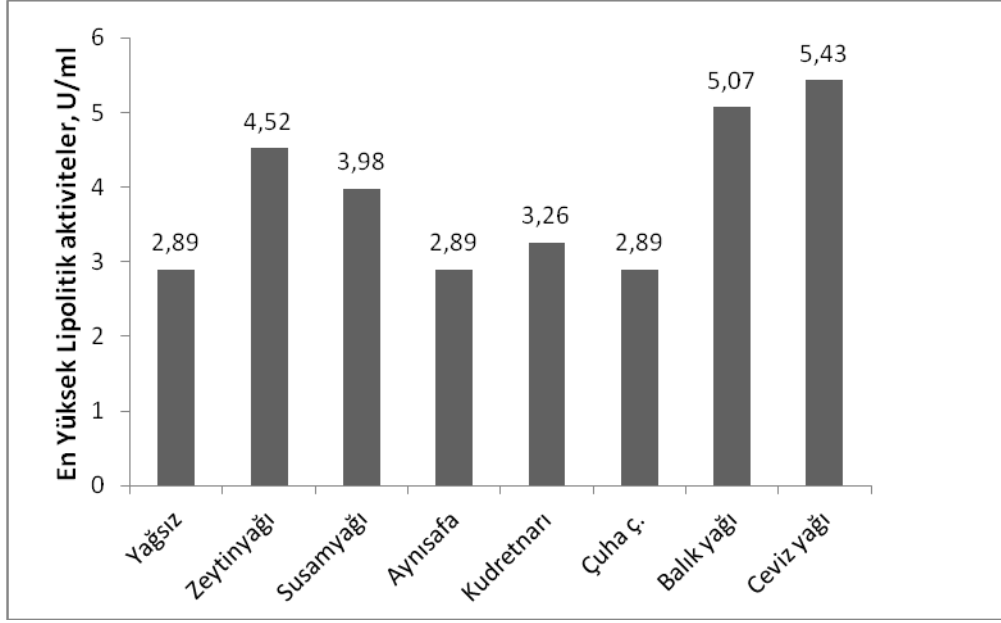


Şekil 4. 2 Besiyerine katılan farklı yağların lipolitik aktiviteye etkisi [T=40 °C, N=100 rpm, pH:7,5 ; Tuz konsantrasyonu: 4 M, değişken parametre: karbon kaynağı (yağlar)]



Şekil 4. 3 Besiyerine katılan farklı yağların lipolitik aktiviteye etkisi (devamı)

#### Karbon kaynağı olarak yağların lipolitik aktiviteye etkisinin karşılaştırılması



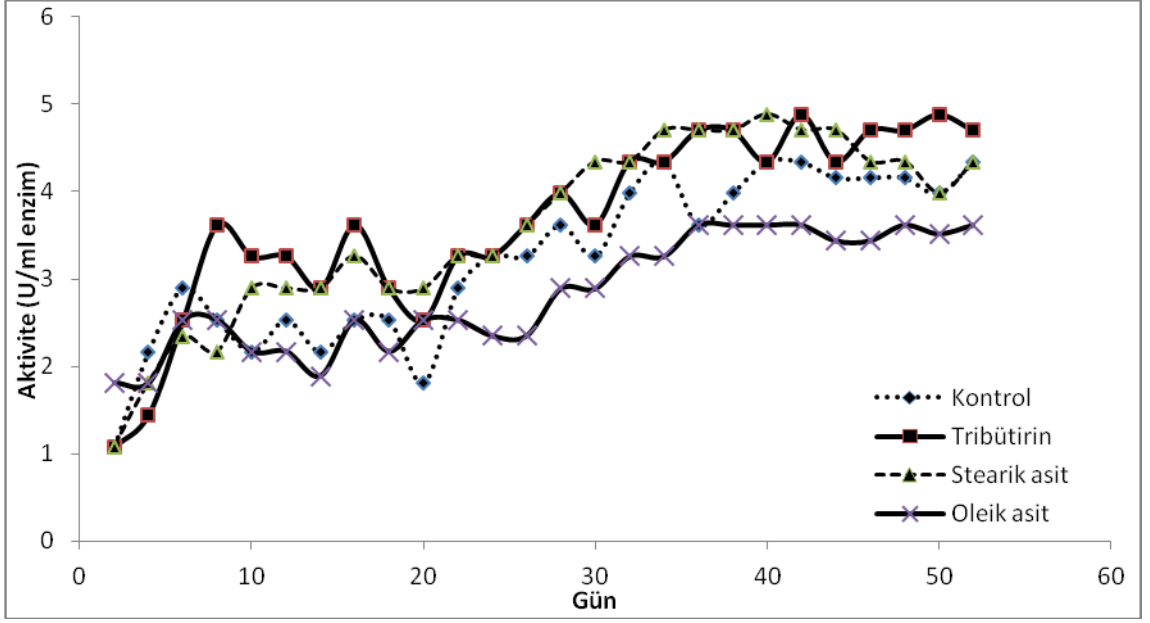
Şekil 4. 4 Besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan farklı yağlar ile elde edilen en yüksek lipaz aktiviteleri (U/mL) (T=40°C, N=100 rpm, pH=7,5 , 4M NaCl)

Her iki aktivite tayin yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre, en yüksek lipaz aktivite değerlerine besiyerinde karbon kaynağı olarak sırasıyla ceviz yağı, balık yağı ve zeytinyağı kullanıldığında ulaşılmıştır. Balık yağı ve ceviz yağı içeren besiyerlerinde 55. güne kadar önemli aktivite artışı kaydedilmiştir. Aynısafa ve çuha çiçeği yağlarının ise, yağsız kontrol numunesi ile karşılaştırıldığında, lipaz üretimini indüklediği anlaşılmakta, önemli bir inhibisyon etkisi gözlenmemektedir. Kudretnarı da önemli bir indükleyici etki yapmamıştır. En yüksek aktiviteye ceviz yağında 52. ve 56. günlerde ulaşılmıştır.

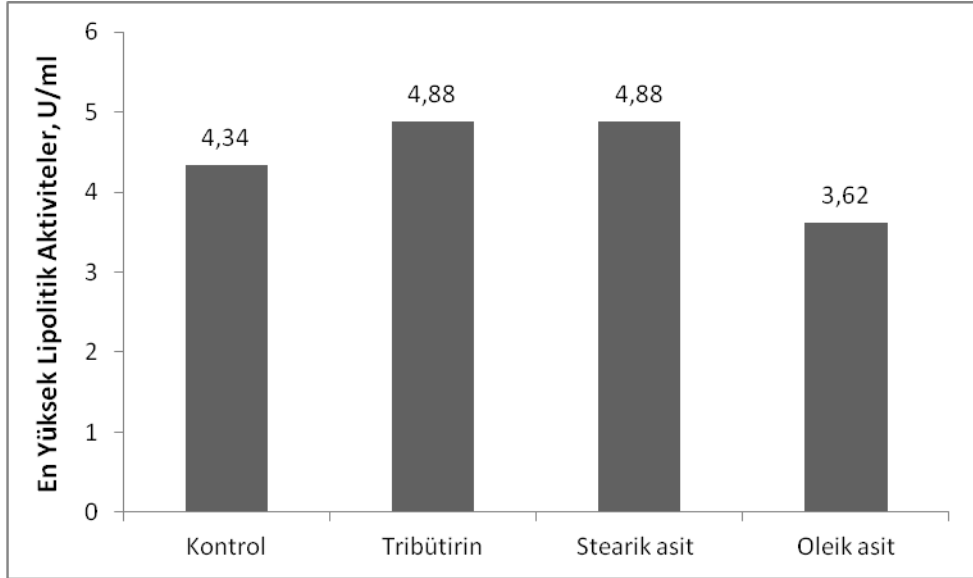
#### 4.1.3 Karbon Kaynaklarının Etkisi: Farklı Yağ Asitleri ve Yağ Asidi Esterleri

Çizelge 4. 3 Karbon kaynağı olarak yağ asidi ve esterlerinin lipaz aktivitesine etkisi (Ünite/mL enzim)

Gün	Kontrol	Tribütirin	Stearik asit	Oleik asit
	Aktivite, U/mL enzim			
2	1,08	1,08	1,08	1,81
4	2,17	1,45	1,81	1,81
6	2,89	2,53	2,34	2,53
8	2,53	3,62	2,17	2,53
10	2,17	3,26	2,89	2,17
12	2,53	3,26	2,89	2,17
14	2,17	2,89	2,89	1,89
16	2,53	3,62	3,26	2,53
18	2,53	2,89	2,89	2,17
20	1,81	2,53	2,89	2,53
22	2,89	3,26	3,26	2,53
24	3,26	3,26	3,26	2,35
26	3,26	3,62	3,62	2,35
28	3,62	3,98	3,98	2,89
30	3,26	3,62	4,34	2,89
32	3,98	4,34	4,34	3,26
34	4,34	4,34	4,70	3,26
36	3,62	4,70	4,70	3,62
38	3,98	4,70	4,70	3,62
40	4,34	4,34	4,88	3,62
42	4,34	4,88	4,70	3,62
44	4,16	4,34	4,70	3,44
46	4,16	4,70	4,34	3,44
48	4,16	4,70	4,34	3,62
50	3,98	4,88	3,98	3,52
52	4,34	4,70	4,34	3,62



Şekil 4. 5 Besiyerine katılan farklı yağ asidi ve esterlerinin lipolitik aktiviteye etkisi, (T=40 °C, N=100 rpm, pH:7.5, 4M NaCl, Karbon kaynağı: %1 ceviz yağı; değişken parametre: karbon kaynağı olarak yağ asidi ve esterleri)



Şekil 4. 6 Besiyerlerinde karbon kaynağı olarak kullanılan farklı yağ asidi ve esterleri ile elde edilen en yüksek lipaz aktivite değerleri (U/mL) (T=40°C, N=100 rpm, pH=7.5 , 4M NaCl, %1 Ceviz yağı)

Elde edilen lipaz aktivitesi değerlerine göre, besiyeri içersine eklenen yağ asidi esteri tribütirinin ve yağ asidi stearik asidin lipaz aktivitesini arttırıcı etki yaptığı, oleik asitin ise lipaz üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. En yüksek aktiviteye tribütirinli besiyerinde 40. günde stearik asitli besiyerinde ise 42. günde ulaşılmıştır.

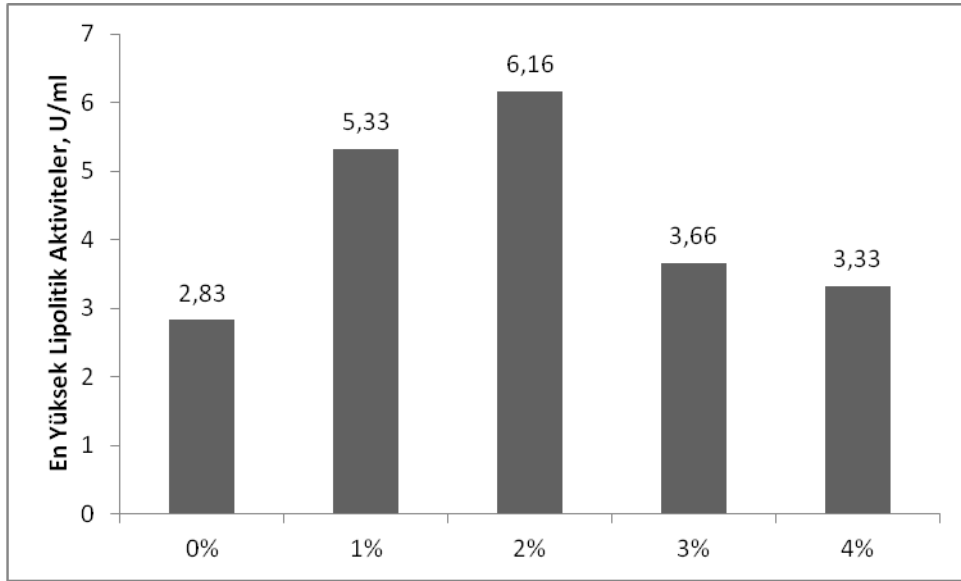
#### 4.1.4 Yağ Derişiminin Lipaz Aktivitesine Etkisi

Çizelge 4. 4 Yağ derişiminin lipaz aktivitesine etkisi, (Ünite/mL enzim)

Gün	%0	%1	%2	%3	%4
	Aktivite, U/mL enzim				
2	0,33	0,83	0,66	0,83	0,82
4	0,33	1,16	0,83	1,16	1,16
6	1,16	1,16	1,16	1,83	1,83
8	1,83	1,33	2,16	2,33	2,16
10	2,16	1,5	2,83	3,00	2,50
12	2,33	2,16	3,16	3,33	2,83
14	2,33	2,16	3,33	3,16	3,33
16	2,66	2,33	3,16	2,50	2,83
18	2,33	2,33	3,33	3,66	3,50
20	2,50	2,50	3,66	3,50	3,33
22	2,33	1,83	3,00	3,00	3,33
24	2,50	2,83	3,33	3,16	3,16
26	2,66	1,66	2,83	2,83	2,16
28	2,66	1,75	2,91	1,75	1,91
30	2,50	2,50	2,83	2,83	2,83
32	2,50	2,83	3,50	3,16	2,50
34	2,33	3,33	3,16	3,33	2,83
36	2,83	3,33	3,83	3,50	2,83
38	2,83	3,83	4,16	3,50	3,00
40	2,50	3,55	4,33	3,33	3,33
42	2,50	3,83	4,50	3,33	3,33
44	2,50	4,33	4,33	3,50	3,50
46	2,83	4,16	4,50	3,66	3,33
48	2,83	4,50	4,16	3,66	3,50
50	2,33	4,66	4,83	3,66	3,50
52	2,50	5,16	5,83	2,66	2,85
54	2,50	5,33	6,00	3,50	3,00
56	2,33	5,16	5,83	3,33	2,66
58	2,50	5,50	6,16	3,33	3,00
60	2,66	5,33	6,16	3,50	3,33



Şekil 4. 7 Yağ derişiminin lipolitik aktiviteye etkisi (T=40°C, N=100 rpm, pH=7,5 , 4M NaCl, Karbon kaynağı: Ceviz yağı)



Şekil 4. 8 Farklı yağ derişimleriyle elde edilen en yüksek lipaz aktivite değerleri (T=40 °C, N=100 rpm, pH=7,5 , 4M NaCl, Karbon kaynağı: ceviz yağı)

Elde edilen lipaz aktivitesi sonuçlarına bakıldığında, en yüksek lipaz aktivitesine %2 (w/v) cevizyağı içeren besiyerinde 60. günde ulaşıldığı tespit edilmiştir. %3 ve %4 (w/v) yağ içeren besiyerlerinde ise lipaz aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir.

Besiyeri parametrelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deneyler sonucunda, optimum lipaz üretim parametreleri 4 M NaCl derişimi, karbon kaynağı olarak %2 oranında ceviz yağı ile tribütürin veya stearik asit olarak belirlenmiştir.

#### 4.2 Lipazın Kısmi Saflaştırılması

Lipaz üretim ortamındaki proteinlerin kısmi saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından ultrafiltrasyon uygulanmıştır. Amonyum sülfat çöktürülmesi için optimum doyumluk değeri deneme yanılma yöntemiyle %40 (w/v) olarak bulunmuştur. Her çöktürmeden sonra çökmeyen fraksiyonlarda protein miktar tayini ve aktivite tayini gerçekleştirilmiş ve lipaz enziminin hangi fraksiyonda yoğunlukla kaldığı tespit edilmiştir. %40 doyumlukla çöktürme sonucunda lipaz enziminin çökmeyen faz içerisinde kaldığı tespit edilmiştir. Kısmi safleştırmada amonyum sülfat çöktürmesinden sonra uygulanan ultrafiltrasyon işlemi ile moleköl ağırlığı 10.000'in altında olan protein ve diğler safsızlıklar uzaklaştırılmış, ayrıca hacim 200-250 mL'den 25-40 mL'ye düşürölerek konsantre enzim çözeltilisi elde edilmiştir.

Ultrafiltrasyon işleminden sonra elde edilen konsantre protein çözeltilisinin protein içeriğı Bradford protein miktar tayini yöntemi ile belirlenmiş ve aktivite tayini gerçekleştirilerek spesifik aktivite değeri saptanmıştır. Kısmi safleştırmada sonucunda lipolitik aktivite değeri yaklaşığ 8 – 10 katına çıktığı görölmektedir. Safleştırmada bir diğler avantajı da, ortam besiyeri içerikleri ve metabolik atıklardan arındığı için aktivite tayin yöntemlerinde sıkça yaşanan bulanıklık problemi ortadan kalkmıştır.

Çizelge 4. 5 Kısmi safleştırmada öncesi ve sonrası lipaz aktivite değeri ile kısmi safleştırmada sonrası protein derişimleri

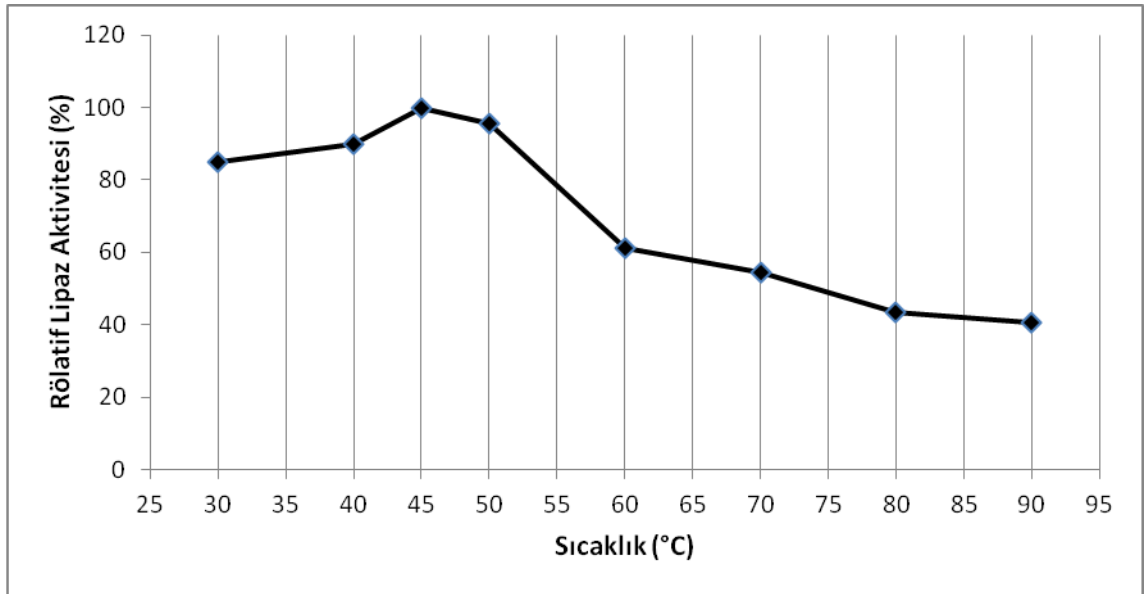
Kültür ortamı	Safleştırmada Öncesi Aktivite (U/mL)	Safleştırmada Sonrası Aktivite (U/mL)	Protein derişimi (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)
Besiyeri 5	0,0127	0,119	0,379	0,31
Besiyeri 9	0,00827	0,061	0,891	0,19
Besiyeri 14	0,015	0,099	1,126	0,25
Besiyeri 16	0,015	0,117	1,227	0,26
Besiyeri 17	0,0173	0,175	1,546	0,32

### 4.3 Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması

Maksimum enzim aktivitesinin gözlemlendiği sıcaklık değerinin saptanması amacıyla, en yüksek lipaz aktivitesine sahip besiyerlerinden biri olan %1 zeytinyağı içerikli Besiyeri 5'ten kısmi saflaştırılan enzim ile 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C sıcaklık değerlerinde titrimetrik aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4. 6 Farklı sıcaklıklar için aktivite tayini sonuçları ve rölatif aktivite değerleri

Sıcaklık Değeri (°C)	Lipaz Aktivitesi (U/mL)	Rölatif Aktivite (%)
30	18,53	85
40	19,66	90
45	21,75	100
50	20,83	95,7
60	13,33	61,3
70	11,86	54,5
80	9,50	43,6
90	8,83	40,6



Şekil 4. 9 Sıcaklık parametresinin lipolitik aktiviteye etkisi



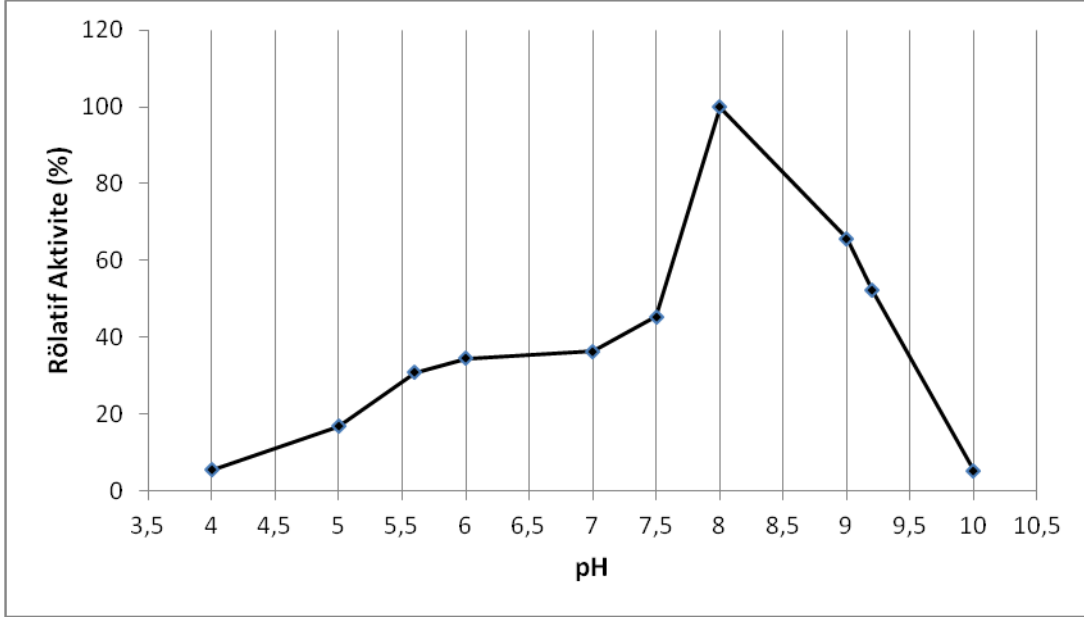
Lipaz enziminin sıcaklığa bağlı aktivite tayini sonuçları incelendiğinde, 30 - 90°C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında lipaz enziminin aktivite gösterdiği görülmektedir. En yüksek enzim aktivitesi 45°C'de gerçekleşmiş, 50°C'den sonra aktivitede belirgin bir düşüş görülmüştür. Ayrıca 80, 90°C gibi proteinler için çok yüksek olan sıcaklıklarda dahi lipaz aktivitesinin %40'ının korunduğu görülmüştür. Lipaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olarak en yüksek aktivitenin gerçekleştiği 45°C tespit edilmiştir.

#### 4.4 Optimum pH Değerinin Saptanması

Maksimum enzim aktivitesinin gözlemlendiği pH değerinin saptanması amacıyla, aktivite deneyleri spektrofotometrik yöntemle farklı pH değerlerinde tampon çözeltileri içerisinde, optimum sıcaklık değeri olarak saptanan 45°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4. 7 Farklı pH değerlerinde spektrofotometrik yöntem ile elde edilen lipaz aktivite sonuçları (U/mL)

pH	Abs (404nm)	Lipaz aktivitesi (U/mL)	Rölatif Aktivite (%)
4	0,0921	0,00596	5,45
5	0,2838	0,01837	16,80
5,6	0,5192	0,03362	30,78
6	0,5810	0,03761	34,44
7	0,6121	0,03963	36,29
7,5	0,7650	0,04953	45,35
8	1,6865	0,1092	100
9	1,1070	0,07167	65,63
9,2	0,8808	0,05703	52,20
10	0,0897	0,00580	5,30



Şekil 4. 10 pH parametresinin lipolitik aktiviteye etkisi

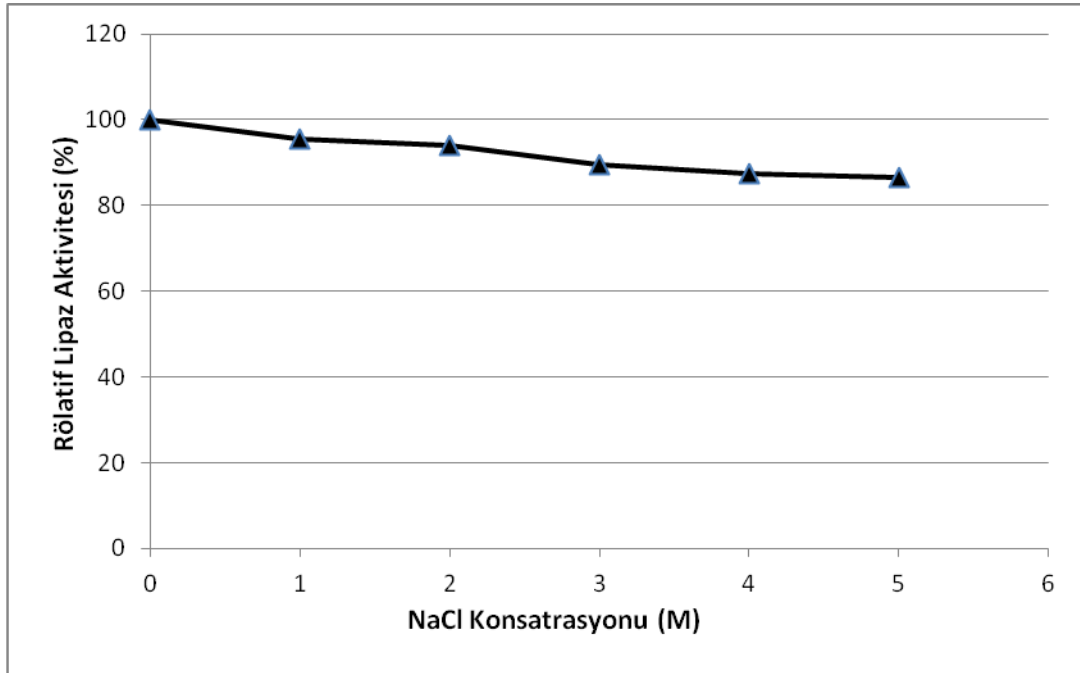
En yüksek lipaz aktivitesinin görüldüğü pH 8 optimum pH değeri olarak belirlenmiştir. Üretilen lipaz enziminin en iyi pH 7,5 – 9,2 aralığında çalıştığı, bunun dışında kalan pH değerlerinde ise aktivitenin büyük oranda kaybedildiği belirtilmiştir.

#### 4.5 NaCl Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisi

Enzimin NaCl içeren ortamdaki aktivitesini takip etmek amacıyla, farklı tuz konsantrasyonlarında titrimetrik aktivite protokolü uygulanmıştır. Aktivite deneylerinde 1 – 5 M aralığında NaCl içerecek şekilde hazırlanan fosfat tampon çözeltileri kullanılmıştır.

Çizelge 4. 8 Farklı tuz konsantrasyonlarında titrimetrik yöntem ile ölçülen lipaz aktivite değerleri ve rölatif aktiviteler

NaCl konsantrasyonu	Lipaz aktivitesi (U/mL)	Rölatif Aktivite (%)
0	22,33	100
1 M	21,33	95,5
2 M	21	94
3 M	20	89,5
4 M	19,50	87,3
5 M	19,33	86,5



Şekil 4. 11 Farklı tuz konsantrasyonlarının lipaz aktivitesine etkisi

Üretilen lipaz enziminin tuzlu ortamda az da olsa aktivite kaybı yaşadığı tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamındaki tuz konsantrasyonu arttıkça lipaz aktivitesi düşmüştür. Gerçekleşen aktivite kaybı %15'i geçmediğinden, enzimin 5 M gibi yüksek tuz konsantrasyonlarında da aktivitesini büyük oranda koruduğu söylenebilir.

## 4.6 Yüzey Aktif Kimyasallarının Lipaz Aktivitesine Etkisi

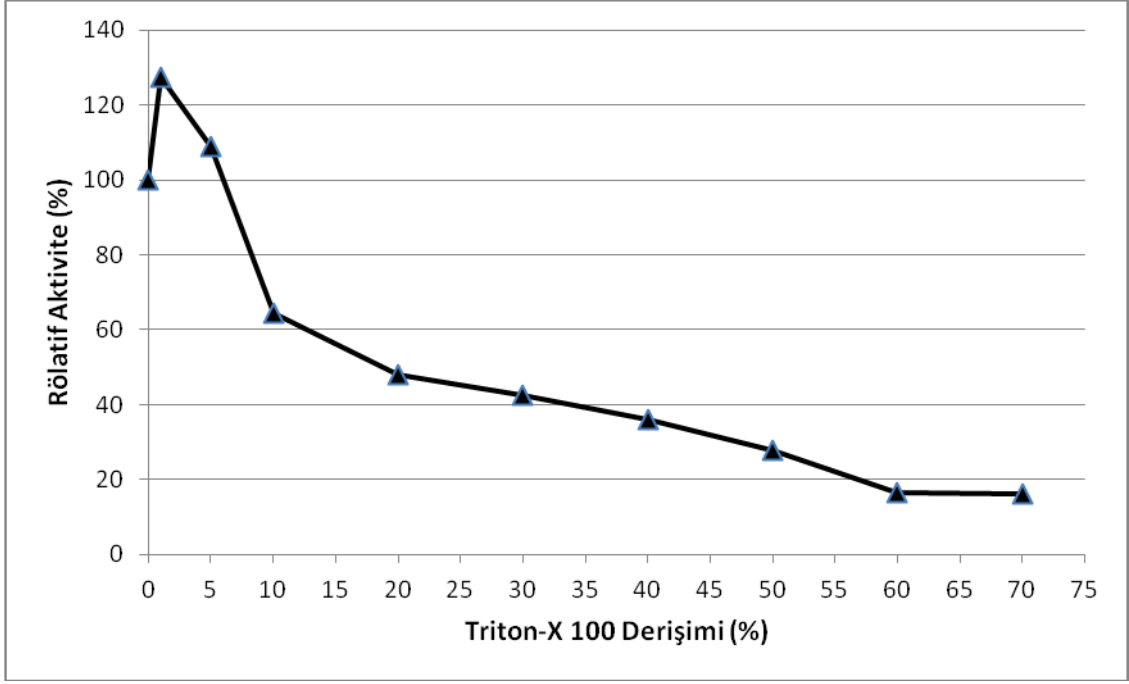
### 4.6.1 Triton X-100 Varlığında Lipaz Aktivitesi

Triton X-100 yüzey aktif maddesinin lipaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla, reaksiyon ortamına % 1 – 70 (v/v) oranlarında Triton X-100 eklenerek spektrofotometrik aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler optimum sıcaklık ve pH olarak saptanan 45°C ve pH 8’de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4. 9 Farklı Triton-X 100 derişimlerinde spektrofotometrik yöntem ile ölçülen lipaz aktiviteleri ve rölatif aktiviteler

<b>Triton-X 100 Derişimi (%) (v/v)</b>	<b>Abs(404nm)</b>	<b>Lipaz Aktivitesi (U/mL)</b>	<b>Rölatif aktivite (%)</b>
0	0,9846	0,06375	100
1	1,2570*	0,08134	127,50
5	1,0750*	0,06954	109,00
10	0,6342	0,04106	64,40
20	0,4739	0,03068	48,12
30	0,4186	0,0271	42,50
40	0,3540	0,02292	35,95
50	0,2744	0,01777	27,87
60	0,1628	0,01054	16,53
70	0,1594	0,01032	16,18

\* Örnekler ½ oranında seyreltilmiş, sonuçlar seyreltme faktörü ile çarpılmıştır.



Şekil 4. 12 Reaksiyon ortamındaki Triton X-100'ün lipaz aktivitesine etkisi

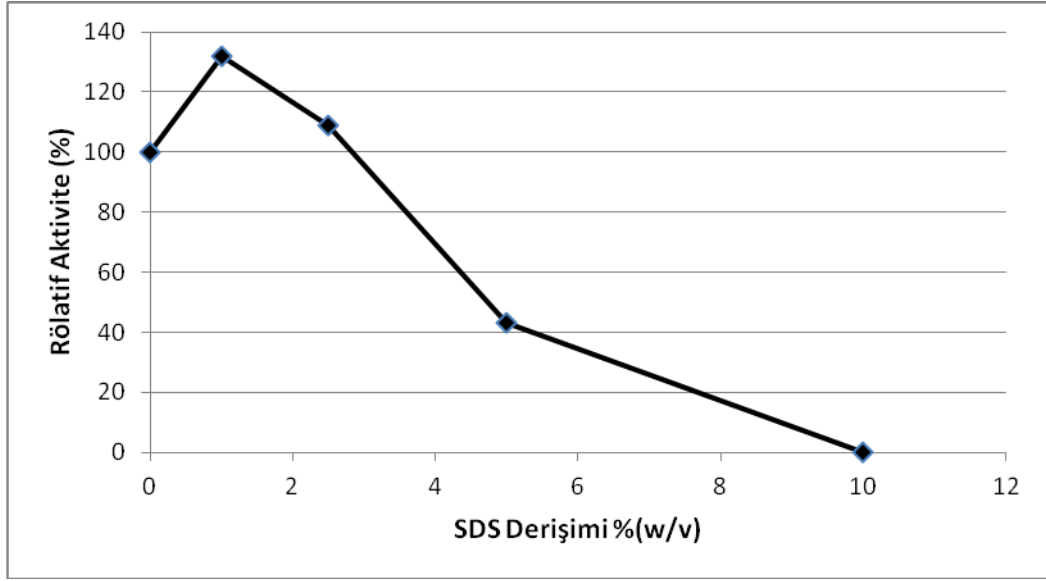
Reaksiyon ortamına katılan %1 oranındaki Triton X-100'ün lipaz aktivitesinde %27,5; %5 oranındaki Triton X-100'ün ise %9 oranında bir artış sağladığı görülmüştür. %10 ve üzerindeki Triton X-100 derişimlerinde ise lipaz aktivitesinin büyük oranda düştüğü tespit edilmiştir. %20 oranına kadar enzim aktivitesinin % 50'si korunmaktadır. %70 Triton X-100 derişimine çıkıldığında enzim aktivitesinin devam ettiği, ancak aktivitede % 84'lük önemli bir kayıp olduğu görülmektedir.

#### 4.6.2 SDS Varlığında Lipaz Aktivitesi

Çizelge 4. 10 Farklı SDS derişimlerinde spektrofotometrik yöntem ile ölçülen lipaz aktiviteleri ve rölatif aktiviteler

SDS Derişimi (%)	Abs(404nm)	Lipaz Aktivitesi, U/ml	Rölatif aktivite (%)
0	1,3621*	0,0881	100
1	1,7971*	0,1163	132
2,5	1,4916*	0,0965	109
5	0,0383	0,0383	43
10	0	0	0

\* Örnekler ½ oranında seyreltilmiş, sonuçlar seyreltme faktörü ile çarpılmıştır.



Şekil 4. 13 Reaksiyon ortamındaki SDS'nin lipaz aktivitesine etkisi

Reaksiyon ortamına katılan %1 oranındaki SDS'nin lipaz aktivitesini %32 yükselttiği, %2,5 oranındaki SDS'nin ise %9 oranında yükselttiği görülmüştür. SDS oranı %5'e çıkarıldığında enzim aktivitesinde %57'lik kayıp olduğu, %10 derişimde ise enzimin aktif olmadığı tespit edilmiştir.

### SONUÇ ve ÖNERİLER

Ekstremofilik organizmalar, evrim sürecindeki moleküler adaptasyonları ve biyoteknolojik potansiyelleri nedeniyle bilimsel açıdan büyük ilgi çekmektedirler. Ekstremofiller, evrimsel süreç içerisinde karşılaşılan çevresel zorluklar nedeniyle fizyolojik modifikasyonlar geçirmiş, ekstrem koşullar altında stabil ve aktif olan makromoleküller sentezleyebilir hale gelmişlerdir. Bu makromoleküller, diğer mezofilik organizmalar tarafından sentezlenenlere göre belirgin yapısal farklılıklar göstermektedirler [72].

Lipazlar, çözünmeyen trigliserit substratlarına etki göstererek arayüzey aktivasyonunu katalizleyen çözünür enzimlerdir. Biyoteknolojik uygulamalarda önemli olan biyokatalizörlerin başında gelmektedirler. Endüstriyel prosesler genel olarak zor şartlar altında gerçekleştiklerinden, ekstrem sıcaklıklar ve pH, ekstrem tuz konsantrasyonları ve organik çözücülerin varlığı gibi enzimatik reaksiyonlar için elverişsiz koşullarda da aktivitelerini sürdürebilen enzimler elde edebilmenin önemi büyüktür. Bu bakımdan, ekstremofillerden elde edilen lipazlar, endüstriyel proseslere önemli alternatif çözümler sunmaktadırlar [72].

Halofilik mikroorganizmalar, tuzu seven ekstremofilik organizmalardır ve sitoplazmadaki ozmotik basıncı dengeleyerek, yüksek tuz konsantrasyonlarına adaptasyon sağlama yeteneğine sahiptirler. Hipersalin ortamlar proteinler arasında elektrostatik etkileşimler oluşturarak agregasyonla çökmelerine, bu şekilde proteinlerin denatürasyonuna neden olurken, halofilik proteinler böyle ortamlarda üç boyutlu

yapılarını koruyarak çözünürlüklerini ve konformasyonlarını kaybetmeden aktivitelerini sürdürürler. Bu nedenle, ekstrem tuzlu ortamlarda stabil ve aktif olan lipolitik enzimler üzerine yapılan karakterizasyon çalışmalarının önemi son zamanlarda artmaktadır [72].

*Archaea* domaini ekstrem ortamlardaki dominant habitatlarda yaşayabilen birçok aşırı termofil ve halofili kapsar. Çoğu mezofilik orijine sahip ökaryotik ve bakteriyel domainlerin üyelerindeki çok sayıda lipolitik enzimin karakterize edilmesinin aksine ekstremofilik arkeonlardaki lipazların potansiyel avantajlarına rağmen *Archaea*'daki lipazların araştırılması üzerine oldukça az miktarda çalışma bulunmaktadır. *Archaea*'daki lipolitik aktivite ile ilgili Gonzalez ve Gutierrez [73], Tween 20–80 ve CaCl<sub>2</sub> içeren agar-jelatin petrilerinde *Halobacterium* izolatlarının lipolitik aktivitesini göstermiş fakat daha ileri karakterize etmemişlerdir. Lipaz aktivitesine ait diğer iki rapor ise substrat olarak uzun zincirli triaçilgliseritlerin kullanılmaması üzerinedir: *S.acidocaldarius*'tan klonlanan enzimin triolein yerine tribütirin ve pNPP hidrolize etmesi [74] ve *A.fulgidus*'tan klonlanan enzimin daha kısa zincirli substratlar olan tribütirin, trikaprilin ve p-nitrofenil kaproat [75] hidrolize etmesi gibi. Hipersalinite gibi ekstrem koşullarda aktif ve kararlı olan bazı lipolitik enzimler son yıllarda bildirilmiştir [76], [77]. Böylelikle, Hotta ve arkadaşlarının [78] “*Archaea* için henüz bir lipaz tanımlanmamıştır” gözlemi hala doğrudur [77].

Bu çalışmada, 2004 yılında Türkiye Tuzköy Tuz Madeni'nden izole edilen (Birbir ve ark., 2004) ve halofilik bir arkea olduğu bilinen *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşundan lipaz enziminin üretimi, enzim üretimini tetikleyen parametrelerin etkisinin araştırılması, elde edilen lipaz enziminin optimum çalışma koşullarının (pH ve sıcaklık) tespiti, yüksek tuz konsantrasyonu ve yüksek sıcaklık gibi ekstrem koşullara dayanıklılığının ve yüzey aktif kimyasallara karşı direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

### **Lipaz üretimi için uygun besiyeri koşullarının belirlenmesi**

*Haloarcula hispanica*'dan lipaz üretiminde en uygun ortam koşulların belirlendiği çalışmada, mikroorganizmanın temel besin kaynakları olan farklı tür ve derişimdeki karbon kaynakları ile mikroorganizma için yaşamsal önem taşıyan farklı tuz konsantrasyonları denenmiştir. Öncelikle tuz konsantrasyonunun lipolitik aktiviteye etkisi incelenmiş, bu amaçla 3M, 4M ve 5M NaCl içeren Brown besiyerlerinde



mikroorganizmanın gelişimi ve ürettiği enzimin lipolitik aktivitesi izlenmiştir. Bu tuz konsantrasyonu aralığı literatüre paralel olarak seçilmiştir. Oren (2000), *Halobacteriales* üyelerinin üremeleri için en az 1,5 M NaCl'ye ihtiyaç duymakta olup suşların çoğunluğunun 3,5-4,5 M NaCl konsantrasyonunda en iyi üreme gösterdiğini belirtmiştir [8]. De la Haba ve arkadaşları (2011), Avusturalya'da bulunan tuzlanmış deri örneklerinden izole ettikleri gram pozitif halofilik bakterilerin aerobik koşullarda %3-25 [w/v] (0,5 – 4,3 M) NaCl bulunan ortamda yaşayabildiklerini ve optimum koşulun %7.5–12.5 [w/v] (1,3 – 2,14 M) NaCl olduğunu belirtmiştir [79]. Bu çalışmada yapılan deneyler sonucunda, en fazla lipolitik aktiviteye 4M NaCl içeren kültür ortamında ulaşılmıştır. 4M üzerindeki NaCl konsantrasyonu lipolitik aktivite ve hücre gelişimini olumsuz etkilememekle birlikte, lipaz üretimine önemli bir etksinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *Haloarcula hispanica*'nın besiyeri pH'ı 7,5 olarak seçilmiştir. Boutaiba ve arkadaşları da, 2006'da aşırı halofilik arkeon *Natronococcus* sp. strain TC6 üzerinde yaptıkları çalışmada besiyeri ortamının pH'ını 7,5 olarak seçmiştir [77]. De la Haba ve arkadaşları (2011) tuzlanmış deri örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmadan elde ettikleri halofillerin pH 5 ile 10 arasında yaşayabildiğini, optimal büyümenin pH 7,5 olduğunu belirtmiştir [79]. Daoud ve arkadaşları (2013) halotolerant bir *Staphylococcus* türünde yaptıkları çalışmada ortam pH'ını 7,5 olarak belirlemiştir [72].

60 gün boyunca takip edilen lipaz üretim ortamlarında, hücre yoğunluğunun sürekli arttığı, hücre yoğunluğundan kaynaklı olarak ortam renginin gün geçtikçe koyulaştığı ve 20. günden itibaren yoğun turuncu bir renge sahip olduğu morfolojik olarak gözlenmiştir. Çoğu halofilik arkea C50 karetenoidlerin varlığından dolayı kırmızı veya turuncu pigmentlidir [80]. Çalışmada kullanılan *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşu da bu özelliğinden dolayı pastel portakal izolatu olarak adlandırılmıştır [39].

İnkübasyonun ikinci günü itibariyle, lipaz üretim ortamından alınan numunelerde lipaz aktivitesine rastlanmıştır. Genellikle ilk 20. güne kadar lipaz aktivitelerinde ciddi bir artış gözlenmiş, 20. günden sonra bu artış yavaşlamış, 45 – 50. günlerde en yüksek lipaz aktivite değerlerine ulaşılmıştır. 50. günden sonra enzim aktivitesindeki artış durmuştur.

Lipaz üreten diğer mikroorganizmlara kıyasla, *Haloarcula hispanica*'nın inkübasyonu ve kararlı hale gelme süresi çok daha uzundur. En uzun inkübasyon süresine sahip organizmalar 5 gün ile *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.*'dir. Lipaz kaynağı olarak en sık kullanılan mikroorganizmalardan *Bacillus sp.*, 96 saatlik bir inkübasyon süresine sahip olup en yüksek lipaz aktivitesine 48-72. saatler arasında ulaşmaktadır. *Haloarcula hispanica* için inkübasyon süresinin uzun olması, yüksek enzim aktivitelerine ulaşılması için en az 45 güne ihtiyaç olması ekonomik açıdan bir dezavantaj iken, üretilen enzimin stabilitesi açısından bir avantajdır.

Mikrobiyal lipazların üretiminde çoğunlukla zeytinyağı, ayçiçek yağı, soya fasulyesiyağı, susam yağı, pamuk yağı, mısır yağı, yer fıstığı yağı ve palmye yağı gibi bitkisel kaynaklı yağlar denenmektedir. Yağlı bir ortamda çoğalan mikroorganizmalar, lipaz üretme potansiyeline sahiptir. Mikroorganizmalar yağları karbon kaynağı olarak kullanırken bir yandan da sindirimi sağlamak için lipaz üretmektedir.

Sugihara 1991'de *Bacillus sp.*'den %1 zeytinyağı içeren kültür ortamında lipaz üretmiştir. *Rhodotorula glutinis*'ten elde edilen hücre dışı lipazın üretiminde palmyağı en iyi lipid kaynağı olarak belirlenmiştir [64].

Karbon kaynaklarının lipolitik aktiviteye etkisini incelemek amacıyla farklı yağ asidi içeren bitkisel yağlar ve balık yağı eklenerek Brown besiyerleri hazırlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda en yüksek lipaz aktivitesi sağlayan zeytinyağı ve susam yağı ile, daha önce denenmemiş aynısafa, çuha çiçeği, kudret narı, ceviz yağı ve alabalık yağı kullanılmıştır. En yüksek lipaz aktivitesine ceviz yağı ve balık yağı içerikli kültür ortamlarında ulaşılmış (5,07 ve 5,43 U/mL), bunu 4,52 U/mL ile zeytinyağı izlemiştir. *Candida rugosa*'dan lipaz üretiminde yağ etkisini spektrofotometrik yöntem ile inceleyen farklı bir çalışmada, en yüksek lipaz aktivitesine %1 soya yağı (0,012 U/mL) ve %1 susam yağı (0,01 U/mL) ile ulaşılmıştır. Zeytinyağı ile elde edilen en yüksek lipolitik aktivite 0,004 U/mL olmuştur [81]. *Candida rugosa* ile yapılan bu çalışmada da en yüksek lipaz aktivitesine %1 zeytinyağı varlığında (0,0254 U/mL) rastlanmıştır [82].

Uçucu bir yağ olan aynısafa yağının lipaz üretimini tetiklemediği, hücre gelişimine olumsuz etki yaptığı gözlenmiştir. 20. günden sonra aynısafa yağı içeren besiyerinin sarı

renk verdiği gözlemlenmiştir. Aynı şekilde çuha çiçeği yağının da lipaz üretimini tetiklemediği, ancak hücre gelişiminin devam ettiği tespit edilmiştir.

En düşük lipaz aktivitesine yağ eklenmeyen besiyerinde rastlanmıştır (2,89 U/mL). Mikroorganizmanın yağsız ortamda da lipaz enzimi ürettiği, ancak kültür ortamına eklenen yağları karbon kaynağı olarak kullanmak amacıyla mikroorganizmanın yağ sindirimine yönelik lipaz enzimini daha fazla salgıladığı söylenebilir. Lipazın ceviz yağı ve balık yağı içeren ortamda maksimum aktiviteyi göstermesine dayanarak, *Haloarcula hispanica* 'nın Omega-3 yağ asitleri içeren ortamda daha aktif olarak enzim ürettiği söylenebilir.

Besiyerlerine katılan yağ derişiminin etkisini incelemek amacıyla, en yüksek lipolitik aktivitenin gözlendiği tuz konsantrasyonu olan 4 M NaCl ve en yüksek aktivitenin görüldüğü karbon kaynağı olan ceviz yağı kullanılarak, %1, %2, %3 ve %4 ceviz yağı içeren ve bir de kontrol amacıyla yağ içermeyen Brown besiyerleri hazırlanmış, 2 ay boyunca lipolitik aktivitesi analiz edilmiştir. En yüksek lipaz aktivitesine %2 ceviz yağı içeren besiyerinde ulaşılmış (6,16 U/mL), daha yüksek yağ derişimlerinin ise lipaz üretimini daha fazla tetiklemediği tespit edilmiştir. %3 ve %4 ceviz yağı derişimiyle ulaşılan en yüksek lipolitik aktiviteler sırasıyla 3,66 ve 3,33 U/mL'dir. %1 yağ oranı ise, %3 ve %4 'e göre daha yüksek bir aktivite sağlamaktadır (5,33 U/mL). En düşük lipaz aktivitesine yağsız besiyerinde rastlanmıştır (2,83 U/mL). *Debaryomyces hansenii* mayasıyla yapılmış ve bitkisel yağların derişimlerinin lipaz üretimine etkisinin spektrofotometrik yöntemle incelendiği bir çalışmada, %0.5, %1 ve %2 derişimlerinde susam yağı kullanılmış, en iyi lipolitik aktiviteye %1 susam yağı içeren üretim ortamında rastlanırken (0,01 U/mL), %1.5 yağ derişiminin substrat inhibisyonuna neden olarak aktiviteyi düşürdüğü (0,002 U/mL) tespit edilmiştir [81].

Karbon kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla yağ asidi esteri tribütirin ile yağ asitleri stearik asit ve oleik asit besiyerlerinde kullanılmıştır. %1 ceviz yağı derişimi ile optimum tuz konsantrasyonu olan 4M NaCl içeren Brown besiyeri içinde üretim yapılmıştır. Kontrol amacıyla içersine yağ asidi ve esteri eklenmeyen %1 ceviz yağlı numunede ulaşılan en yüksek lipaz aktivitesi 4,34 U/mL iken, tribütirin ve

stearik asidin lipaz üretimine önemli bir etkide bulunmadığı (4,88 U/mL), oleik asidin ise inhibisyon etkisi yaptığı (3,62 U/mL) tespit edilmiştir.

### **pH faktörünün lipaz aktivitesine etkisi**

Lipaz enzimlerinin aktivite gösterdikleri pH bakteriyel, maya ve fungi kaynaklı olup olmadıklarına göre farklılık göstermektedir. Bakteriyel kaynaklı olan lipazlardan *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* lipazlarının aktif olduğu pH değeri 8 ile 6.5 arasındadır. *Chromobacterium* ve *Bacillus* lipazlarının aktivitesinin olduğu pH değeri ise yaklaşık 7'dir. Maya kaynaklı olan lipazlardan *Candida* türlerinin lipaz aktivitesi gösterdiği pH değeri 6.1 ile 7.5 arasındadır. Fungal kaynaklı olan lipazlardan *Penicillium* lipazlarının aktif olduğu pH değeri 4'tür [83]. *Haloarcula hispanica* 2TK2'den saflaştırılan lipaz enziminin pH kararlılığı incelendiğinde ise, en yüksek aktivitenin görüldüğü pH 8 optimum pH değeri olarak belirlenmiştir. Üretilen lipaz enziminin en iyi pH 7,5 – 9,2 aralığında çalıştığı, bunun dışında kalan pH değerlerinde ise aktivitenin büyük oranda kaybedildiği tespit edilmiştir. pH 8-9 aralığında 15 dakika inkübasyon sonrasında aktivitesinin %50'den fazlasını koruduğu görülmüştür. Ancak pH 6 ve 7'de bu oran %30'lara düşerken pH 5 ve 4'te büyük oranda aktivitesini yitirerek sırasıyla %16,8 ve %5,45'e düşmüştür. Enzimin optimum pH'ının 8 olmasına rağmen pH 5,6'da 15 dakika inkübasyon sonrasında aktivitesinin %69,22'sini kaybetmesi dikkat çekicidir. Liu ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada *Burkholderia* sp. C20 suşundan elde edilen lipazın optimum aktivite koşullarının 55 °C'de pH 9,0'da 12 dakikalık inkübasyon sonrasında elde edildiğini belirtmiştir [84]. Daoud ve arkadaşları (2013) halotolerant bir *Staphylococcus* üzerindeki çalışmalarında maksimum aktivitenin zeytinyağında 45°C'de pH 8,0'da gerçekleştiğini rapor etmesi sonuçlarımızla paralellik göstermektedir [72].

Gutarra ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları mezofilik bir fungus olan *Penicillium simplicissimum*'den lipaz üretimi çalışmasında ham lipazın pH 5-6 aralığında maksimum aktivite gösterdiği; optimum sıcaklığında (50°C) aktivitesinin %50'sini koruduğu görülmüştür [85]. Bu sonuç *Haloarcula hispanica* 2TK2'den saflaştırılan lipaz enzimi ile karşılaştırıldığında; enzimin 45°C'de yapılan inkübasyon sonrasında pH 8-9 aralığında

aktivitesinin %50'den fazlasını koruduğu pH 8'de maksimum bağıl aktivite göstererek alkali pH'ı tercih ettiğini göstermektedir.

#### **Sıcaklık faktörünün lipaz aktivitesine etkisi**

Çalışmada kullanılan lipaz enzime sıcaklığın etkisini incelemek üzere, en yüksek lipaz aktivitesine sahip besiyerlerinden biri olan %1 zeytinyağı içerikli Besiyeri 5'ten kısmi saflaştırılan enzim ile 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C sıcaklıklarda titrimetrik aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 30 - 90°C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında lipaz enziminin aktivite gösterdiği görülmektedir. En yüksek enzim aktivitesi 45°C'de gerçekleşmiş, 50°C'den sonra aktivitede düşüş görülmüştür. Ayrıca 80, 90°C gibi proteinler için çok yüksek olan sıcaklıklarda dahi lipaz aktivitesinin %40'ının korunduğu görülmüştür. Lipaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olarak en yüksek aktivitenin gerçekleştiği 45°C tespit edilmiştir. Daoud ve arkadaşları (2013) halotolerant bir *Staphylococcus* ile yaptıkları çalışmada lipaz enziminin 25-55°C arasında aktif olduğu ve maksimum aktiviteye 50°C'de ulaştığını belirtmiştir. Çalışmalarında kullandıkları mikrobiyal lipaz 25-35°C arasında %100 rölatif aktiviteye sahipken 35°C üzerinde aktivite kaybına uğrayarak 60°C'de tüm aktivitesini yitirmiştir [72]. Bhatnagar ve arkadaşlarının (2005) bir *Natronococcus* türünün identifikasyonu için yaptıkları çalışmada, bu halobakterinin optimum lipolitik özelliğini 40°C'de gösterdiğini rapor etmiştir [86]. *Haloarcula hispanica* 2TK2'den saflaştırılan lipaz, 70°C'de %54,5, 80°C'de %43,6 ve 90°C'de %40,6 rölatif aktiviteye sahiptir ve bu özelliğiyle literatürde belirtilen diğer lipazlara göre daha kararlı bir yapı sergilemektedir.

#### **Tuz konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisi**

*Haloarcula hispanica* 2TK2'den kısmi olarak saflaştırılan lipaz aktivitesine tuz konsantrasyonunun etkisini belirlemek için 0-5 M NaCl konsantrasyonlarında hazırlanan fosfat tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilen titrimetrik aktivite protokolü kısmi saflaştırılan enzimin canlılar için lethal olan tuz konsantrasyonlarında aktif olduğunu göstermiştir. En yüksek aktiviteyi tuz içermeyen ortamda gösteren enzim 1M NaCl varlığında %95,5, 2M NaCl varlığında %94, 3M NaCl varlığında %89,5, 4M NaCl varlığında %87,3 ve 5M NaCl varlığında ise %86,5 rölatif aktivite göstermiştir.

Daoud ve arkadaşları (2013) da 0-5M arasındaki tuz konsantrasyonlarında inceleme yapmış, inceledikleri halotolerant *Staphylococcus*'un ekstraselüler lipazının optimal aktivitesinin tuzsuz ortamda olduğunu ve 5M NaCl konsantrasyonunda rölatif aktivitesinin %25'ten fazla olduğunu rapor etmiştir [72]. Bu bulguların aksine Boutaiba ve arkadaşları (2006) aşırı halofilik archaeon *Natronococcus* sp. TC6 suşuna ait lipaz üzerinde yaptıkları çalışmada tuz bulunmayan ortamda lipaz aktivitesi elde edemezken tuz miktarı arttıkça rölatif aktivite artmış ve 4M NaCl varlığında en yüksek rölatif aktiviteye ulaşılmış, 5M NaCl varlığında ise enzim %25 aktivite kaybına uğramıştır [77]. Sonuçlar göstermektedir ki *Haloarcula hispanica* 2TK2 lipazı tuz konsantrasyonu açısından daha kararlı bir yapıya sahiptir. Bu özellik, biyoteknolojik olarak ilgi çekicidir ve farklı tuz konsantrasyonlarında gerçekleştirilen endüstriyel prosesler söz konusu olduğunda bu lipazın kullanılabilceğini göstermektedir.

#### **Lipazın yüzey aktif maddelere karşı direnci**

Çalışmada kısmi olarak saflaştırılan lipaz enzimine yüzey aktif ajanların etkisini belirlemek üzere noniyonik bir yüzey aktif madde olan Triton X-100 ve anyonik bir yüzey aktif madde olan SDS ile çalışılmıştır. *Haloarcula hispanica* 2TK2'den kısmi olarak saflaştırılan lipazın; %1'lik Triton X-100 varlığında aktivitesinde %27,5 artış gözlenmiştir. %20'lik Triton X-100 varlığında enzimin aktivitesinin yaklaşık %50'sini koruduğu, oldukça düşük olan %70 Triton X-100 varlığında ise %16,18 aktivite gösterebildiği analiz edilmiştir. Reaksiyon ortamında %1 oranındaki SDS varlığında lipaz aktivitesinin %32 arttığı, %2,5 oranındaki SDS varlığında %9 arttığı görülmüştür. SDS oranı %5'e çıkarıldığında ise enzimin aktivitesinin %43'ünü koruduğu, %10 derişimde ise enzimin aktivitesini kaybettiği tespit edilmiştir.

Daoud ve arkadaşlarının (2013) halotolerant bir *Staphylococcus* türünün ekstraselüler lipazı üzerinde yaptıkları çalışmada Triton X-100'ün lipaz aktivitesini güçlü biçimde inhibe ettiği gösterilmiştir [72]. Bu verilere göre *Haloarcula hispanica* 2TK2 lipazı yüzey aktif madde karşısında literatürdeki benzerlerinden daha kararlı olduğunu göstermiştir. Literatürde bazı lipazların ortamda deterjan bulunmazken substrat olarak trigliseritler kullanıldığında aktivitelerini yitirdiğini belirtmektedir [87], [88], [89], [90]. Bu geri dönüşsüz denatürasyona yağ/su arayüzeyindeki yüksek enerji sebep olmaktadır [87].

Ortama Triton X-100 gibi deterjanların (amfofil) eklenmesiyle yağ/su yüzeyindeki gerilim düşer ve bazı durumlarda lipazların yüzeyler arası denatürasyonu engellenmiş olur [87]. Deterjanların birçok türden lipazı güçlü biçimde inhibe ettiği bildirilmiştir [87]. Bu çalışmada kullanılan halofilik lipaz %1'lik Triton X-100 varlığında aktivitesini arttırması ve %70 Triton X-100 konsantrasyonunda bile aktivite göstermeye devam etmesi nedeniyle literatürde bildirilen lipazlardan daha kararlı bir yapı göstermiştir. Deterjan gibi temizlik maddelerinin bileşiminde kullanılmaya güçlü bir adaydır.

### **Gelecek perspektifleri, öneriler**

Tüm sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda *Haloarcula hispanica* 2TK2'den kısmi olarak saflaştırılan lipazın termostabil ve halotolerant olduğu, mikrobiyal kaynaklı türlerine göre daha üstün özellikler gösterdiği görülmüştür. Bu doğrultuda başta deterjan ve diğer temizlik ürünlerinin üretimi olmak üzere sanayide birçok alanda kullanılabileceği öngörülmektedir. İleriki çalışmalarımızda enzimin saflaştırılması ile molekül ağırlığı ve izoelektrik noktası gibi enzim karakterizasyonunda gerekli diğer unsurların da belirlenmesi ve enzimin immobilizasyonu planlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

---

- [1] Attar, A., (2010). DNA'nın Arkeozomlarla Formülasyonu, In vitro Karakterizasyonu ve Memeli Hücre Kültürlerinde Taşıyıcı Olarak Kullanılması, Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı, İstanbul.
- [2] Wikipedia, Arkea, <http://www.tr.wikipedia.org/wiki/Arkea>, 18 eylül 2013.
- [3] Hedrick, D.B., Guckert, J.B. ve White, D.C., (1991). "Archaeobacterial Ether Lipid Diversity Analyzed by Supercritical Fluid Chromatography: Integration with a Bacterial Lipid Protocol", Journal of Lipid Research, 659-666.
- [4] Kates, M., Kushwaha, S.C. ve Sprott, G.D., (1982). "Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic Bacteria", Methods in Enzymology, 88:98-111.
- [5] Bilim ve Teknik, Canlılar Dünyası, Aşırı Halofilik Achaea, <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/halofilik.htm>, 12 Aralık 2002.
- [6] Woese, C.R. ve Wolfe, R.S., (1985). The Bacteria, VII., Academic Press, USA, ISBN: 0-12-307208-5.
- [7] Tindall, B.J., (1992). The Family Halobacteria, In: The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications, Springer Verlag, New York, 768-808.
- [8] Oren, A., (2000). Life at High salt Concentrations, In: The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications, 3rd Ed., Springer Verlag, New York (electronic publication).
- [9] Kushwaha, S.C., Gochnauer, M.B., Kushner, D.J. ve Kates, M., (1974). "Pigments and Isoprenoid Compounds in Extremely and Moderately Halophilic Bacteria", Canadian Microbiology, 17:402-404.
- [10] Kushner, D.J., (1978). Life in High Salt and Solute Concentrations: Halophilic Bacteria, In: Kushner D.J. (ed) Microbial Life in Extreme Environments, Academic Press, London, 317-368.



- [11] Lodwick, D., Mc Genity, T.J. ve Grant, W.D., (1994). "The Phylogenetic Position of the Haloalkaliphilic Archaeon *Natronobacterium magadii*, Determined from it's Ribosomal RNA Sequence", *Systematic and Applied Microbiology*, 17: 402-404.
- [12] Madern D., Ebel C. ve Zaccai G.,(2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4, 91-98.
- [13] Kushner, D.J., (1993). "Growth and Nutrition of Halophilic Bacteria, In: Vreeland R.H., Hochstein L. (eds): *The Biology of Halophilic Bacteria*, Boca Raton: FL CRC Press, 87-103.
- [14] Oren, A., (2002). Cellular Origin and Life in Extreme Habitats, Halophilic Microorganisms and Their Environments, Joseph Seebach (ed) Kluwer Academic Publishers, 5: 357.
- [15] Oren, A., (2002). "Diversity of Halophilic Microorganisms: Environments, Phylogeny, Physiology and Applications", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 56-63.
- [16] Horikoshi, K., ve Grant, W.D., (1998). *Extremophiles*, Wiley-Sons Inc., New York, 93-133.
- [17] Jones, W.J., Nagle, D.P. ve Whitman, W.B., (1987). "Methanogens and the Diversity of Archaeobacteria", *Microbiological Reviews*, 135-177.
- [18] Madigan, M.T., Martinko, J.M., ve Parker, J., (2006). Prokaryotic Diversity: Archaeobacteria, In: *Brock Biology of Microorganisms*, 10th Edition, Prentice Hall International, Inc. New Jersey, 546-552.
- [19] Ventosa, A., Marquez, M.C., Garabito, M.J. ve Arahall, D.R., (1998). "Moderately Halophilic Gram-positive Bacterial Diversity in Hyper Saline Environments", *Extremophiles.*, 2: 397-304.
- [20] Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M.C., Ventosa, A. ve Schleifer, K.H., (1996). "*Halobacillus* gen. nov., with Descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov., *Halobacillus trueperi* sp. nov. and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus comb. nov.*", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 492-496.
- [21] Marquez, M.C., Ventosa, A. ve Cormenzana, R., (1992). "Phenotypic and Chemotaxonomic Characterization of *Marinococcus halophilus*", *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 63-69.
- [22] Birbir, M. ve Ilgaz, A., (1996). "Isolation and Identification of Bacteria Adversely Affecting Hide and Leather Quality", *Journal of the Society of Leather Technologist and Chemist*, 80: 147-153.
- [23] Adams, M.W.W. ve Kelly, R.M., (1995). "Enzymes in Extreme Environments", *Chemical Engineering Newsletter*, 73: 32-42.
- [24] Aguilar, A., Ingemansson, T. ve Magnien, E., (1998). "Extremophile Microorganisms as Cell Factories: Support from the European Union", *Extremophiles.*, 2: 367-373.

- [25] Banat, I.M., Makkar, R.S. ve Cameotra, S.S., (2000). "Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 495-508.
- [26] Jones, G., Ewing, C.M. ve Melvin, M.V., (1981). "Biotechnology of Solar Saltfield", *Hidrobiologia*, 82: 391-406.
- [27] Grant, W.D., Gemmell, R.T. ve McGenity, T.J., (1998). "Halobacteria, The Evidence for Longevity", *Extremophiles*, 2: 279-287.
- [28] Litchfield, C.D., (2002). "Halophiles", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 21-22.
- [29] Kushner, D.J., (1985). The Halobacteria. In: C.R. Woese and R.S. Wolfe (Eds), *The Bacteria-A Treatise on Structure and Function, Archaeobacteria*, Academic Press, Orlando.
- [30] Hough, D.W. ve Danson, M.J., (1989). "Archaeobacteria: Ancient Organisms with Commercial Potential", *Letters in Applied Microbiology*, 9: 33-39.
- [31] Margesin, H. ve Schinner, F., (2001). "Potential of Halotolerant and Halophilic Microorganisms for Biotechnology", *Extremophiles*, 5: 73-83.
- [32] Ventosa, A. ve Nieto, J.J., (1995). "Biotechnological Applications and Potentialities of Halophilic Microorganisms", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 85-94.
- [33] Parolis, H., Parolis, L.A.S., Boan, I.F., Rodriguez-Valera, F., Widmalm, G., Manca, M.C., Jansson, P.E. ve Sutherland, I.W., (1996). "The Structure of the Exopolysaccharide Produced by The Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* Strain R4 (ATCC 33500)", *Carbohydrate Research*, 295: 147-156.
- [34] Chaga, G., Porath, J. ve Illeni, T., (1993). "Isolation and Purification of Amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*", *Biomedical Chromatography*, 7: 256-261.
- [35] Danson, M.J. ve Hough, D.W., (1997). "The Structural Basis of Protein Halophilicity", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117A(3): 307-312.
- [36] Seltek, G.A., ve Chaudhuri, J.B., (1999). "Biocatalysis in Organic Media Using Enzymes From Extremophiles", *Enzyme and Microbial Biotechnology*, 25: 471-482.
- [37] Bertrand, J.C., Almallah, M., Acquaviva, M. ve Mille, G., (1990). "Biodegradation of Hydrocarbons by an Extremely Halophilic Archaeobacterium", *Letters in Applied Microbiology*, 11: 260-263.
- [38] Emerson, D., Chauhan, S., Oriol, P. ve Breznak, J.A., (1994). "Haloferax sp. D1227, A Halophilic Archaeon Capable of Growth on Aromatic Compounds", *Archives of Microbiology*, 161: 445-452.
- [39] Birbir, M., Ogan, A., Calli, B. ve Mertoglu, B., (2004). "Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:613-621.

- [40] Vreeland, R.H., (1993). "Taxonomy of Halophilic Bacteria", In: The Biology of Halophilic Bacteria, Vreeland, R.H., Hochstein, L.I. (Eds), FI: CRS Press, Baco Raton, 105-134.
- [41] Birbir, M., (2003). "Biotechnological Potentials of Extremely Halophilic Bacterial Community Isolated From Tuz Lake, Turkey", *Microbiologia Balkanica*.
- [42] University of California Museum of Paleontology, Introduction to the Archaea, <http://www.ucmp.berkeley.edu/archaea/archaea.html>, 5 Mayıs 2010.
- [43] Gözüaçık, A., (2004). Aşırı Halofil Archaea'nın Çeşitli Polimerik Destek Maddelerine İmmobilizasyonu ve Selüloz Aktivitelerinin Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji programı, Marmara Üniversitesi.
- [44] Pekin, B., (1980). Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler). Ege Üniversitesi, Kimya Fakültesi Yayınları, No 3., İzmir.
- [45] Aehle, W., (2004). Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484.
- [46] John, F.K., (1987). Enzyme Technology. Biotechnology, New York, 7:37-62.
- [47] Demain, A.L. ve Solomon N. A., (1981). In: Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, Scientific American, Freeman&Comp., San Francisco.
- [48] Catoni, E., (1999). Overexpression and Protein Engineering of Lipase A and B from *Geotrichum candidum* CMICC335426, Doctorate Thesis, Department of Chemistry, University of Stuttgart.
- [49] Jaeger, K.E. ve Reetz, M.T., (1998). "Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology", *Tibtech*, 16:396-403.
- [50] Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. ve Gulati, R., (1999). "Microbial Lipases: Potential Biocatalyst for the Future Industry", *Current Science*, 77:101-115.
- [51] Jaeger, K.E., Ransac S., Dijkstra W.B., Colson C., Margreet H. ve Misset O., (1994). "Bacterial Lipases", *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 29-63.
- [52] Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. ve Reetz, M.T., (1999). "Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases", *Annual Review of Microbiology*, 53:315-351.
- [53] Nardini, M. ve Dijkstra, B.W., (1999). "Alpha/Beta Hydrolase Fold Enzymes: The Family Keeps Growing", *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6):732-737.
- [54] Gandhi, N.N., Patil, N.S., Sawant, S.B. ve Joshi J.B., (2000). "Lipase-catalyzed Esterification", *Catalysis Reviews-Science and Engineering*, 42(4):439-480.
- [55] Raza, S., Fransson L. ve Hult, K., (2001). "Enantioselectivity in *Candida antarctica* Lipase B: A Molecular Dynamics Study", *Protein Science*, 10:329-338.

- [56] Gupta R., Gupta N. ve Rathi P., (2004). "Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification and Biochemical Properties", *Applied Microbiology and Biotechnology*,64: 763–781.
- [57] Beisson F., Tiss A., Rivière C. ve Verger R., (2000). "Methods For Lipase Detection and Assay: A Critical Review", *European Journal of Lipid Science and Technology*,133–153.
- [58] Chaplin, M. F. ve Bucke, C., (1990). *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, Cambridge-Great Britain, 139-143.
- [59] Godfrey, T. ve West, S., (1996). "Introduction to Industrial Enzymology" In: In: Godfrey, T., West, S. editors. *Industrial Enzymology*, 2nd ed., Macmillan Press, London.
- [60] Erdoğan, D., (2012). Lipaz Geninin Termofilik *Geobacillus kaustophilus*'tan Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze.
- [61] Sharma R., Chisti Y. ve Banerjee U.C., (2001). "Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases", *Biotechnology Advances*, 19:627-662.
- [62] Pandey A., Benjamin S., Soccol C. R., Nigam P., Krieger N. ve Soccol V. T., (1999). "The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29:119-131.
- [63] Cortez J., (2000). Properties of Enzymes and Their Use in the Textile Industry, Chapter 1 Last updated; <http://science.ntu.ac.uk/research/EnzyTex/EnzRep1.html>, 11 Mart 2008.
- [64] Brune A.K. ve Gotz, F., (1992). Degradation of lipids by bacterial lipases, Winkelman G (ed) *Microbial degradation of natural products*, VCH, Weinheim, 243–266.
- [65] Sugiura M., Oikawa T., Hirano K. ve Inukai T., (1977). "Purification, Crystallization and Properties of Triacylglycerol Lipase from *Pseudomonas fluorescens*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 488(3):353-358.
- [66] Sugihara A., Tani T. ve Tominaga Y., (1991). "Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus sp*", *Biochem*, 109:211-216.
- [67] Lee Y.P., Chung G.H. ve Rhee J.S., (1993). "Purification and Characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK WI Lipase Expressed in *Escherichia coli*.", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1169:156-164.
- [68] Janssen P.H., Monk C.R. ve Morgan H.W., (1994). "A Thermophilic, Lipolytic *Bacillus sp.*, and Continuous Assay of its P-nitrophenyl-palmitate Esterase Activity", *FEMS Microbiol Letters*, 120:195-200.
- [69] Wang Y., Srivastava K.C., Shen G.J. ve Wang H.Y., (1995). "Thermostable Alkaline Lipase from a Newly Isolated Thermophilic *Bacillus* Strain, A30-1 (ATCC 53841)", *J Ferment Bioeng*, 79:433-438.

- [70] Bradford, M., (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- [71] Ertan, H., Arda, N., (1999). *Protein Elektroforezi*, Nobel Tıp Kitabevleri, 226, İstanbul.
- [72] Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M.B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., Gargouri, Y., Ali, Y.B. ve Aloulou, A., (2013). "Purification and Biochemical Characterization of a Halotolerant *Staphylococcus sp.* Extracellular Lipase", *International Journal of Biological Macromolecules*, 57: 232-237.
- [73] Gonzalez, C. ve Gutierrez, C., (1970). "Presence of Lipase Among Species of Extremely Halophilic Bacteria", *Canadian Journal of Microbiology*, 16(12): 1165-1166.
- [74] Arpigny, J.L., Jendrossek, D. ve Jaeger, K.-E., (1998). "A Novel Heat-stable Lipolytic Enzyme from *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 Displaying Similarity to Polyhydroxyalkanoate Depolymerases", *FEMS Microbiology Letters*, 167: 69-73.
- [75] Kim, H.K., Jung, Y.J., Choi, W.C., Ryu, H.S., Oh, T.K. ve Lee, J.K., (2004). "Sequence-based Approach to Finding Functional Lipases from Microbial Genome Databases", *FEMS Microbiology Letters*, 235(2): 349-355.
- [76] Rohban, R., Amoozegar, M.A. ve Ventosa, A., (2009). "Screening and Isolation of Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 333–340.
- [77] Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D.A. ve Baratti, C.J., (2006). "Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon *Natronococcus sp.*", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41: 21–26.
- [78] Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H. ve Imanaka, T., (2002). "Extremely Stable and Versatile Carboxylesterase from a Hyperthermophilic Archaeon", *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3925.
- [79] De la Haba, R.R., Yılmaz, P., Sanchez-Porro, C., Birbir, M. ve Ventosa, A., (2011). "*Salimicrobium salexigens sp. nov.*, A Moderately Halophilic Bacterium from Salted Hides", *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 435-439.
- [80] Cohen, S., Oren, A. ve Shilo, M., (1983). "The Divalent Cation Requirement of Dead Sea Halobacteria", *Archives of Microbiology*, 136: 184-190.
- [81] Şengel, B.Ş., (2007). *Deterjan Katkı Maddesi Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Lipaz Üretim Koşullarının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim dalı, Ankara.
- [82] Erdem, B., (2008). *Candida rugosa'dan Lipaz Üretiminde Biyoproses Parametrelerinin Enzim Aktivite ve Seçimliliğine Etkisi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim dalı, Ankara.

- [83] Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B. Ve Davidson, W.S., (2003). "Review: Purification Strategies for Microbial Lipases", *Journal of Microbiological Methods*, 52: 1-18.
- [84] Liu, C.-H., Chen, C.-Y., Wang, Y.-W. ve Chang, J.-S., (2001). "Fermentation Strategies for the Production of Lipase for an Indigenous Isolate *Burkholderia* sp. C20", *Biochemical engineering Journal*, 58-59: 96-102.
- [85] Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., Freire, D.M.G. ve Castilho, L.R., (2009). *Bioresource Technology*, 100: 5249-5254.
- [86] Bhatnagar, T., Boutaiba, S., Hacene, H., Cayol, J.-L., Fardeau, M.-L., Ollivier, B. ve Baratti, J.C., (2005). "Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and Hydrolase Production", *FEMS Microbiology Letters*, 248(2): 133-140.
- [87] Delorme, V., Dhouib, R., Canaan, S., Fotiadu, F., Carriere, F. Ve Cavalier, J.F., (2011). "Effects of Surfactants on Lipase Structure, Activity and Inhibition", *Pharmaceutical Research*, 28: 1831–1842.
- [88] Aloulou, A., Puccinelli, D., De Caro, A., Leblond, Y. ve Carriere, F., (2007). "A Comparative Study on Two Fungal Lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* Shows the Combined Effects of Detergents and pH on Lipase Adsorption and Activity", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 1446–145.
- [89] Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Puccinelli, D., Mouz, N., Leclaire, J., Leblond, Y. ve Carriere, F., (2007). "Purification and Biochemical Characterization of the LIP2 Lipase from *Yarrowia Lipolytica*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771:228–237.
- [90] Gargouri, Y., Pieroni, G., Lowe, P.A., Sarda, L. ve Verger, R., (1986). "Human Gastric Lipase, The Effect of Amphiphiles", *European Journal of Biochemistry*, 156(2): 305–310.

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Melis ÖZGEN  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 25.09.1983, İstanbul  
**Yabancı Dili** : İngilizce, Almanca  
**E-posta** : [melis.ozgen@gmail.com](mailto:melis.ozgen@gmail.com)

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2007
Lise	Fen Bilimleri	Büyükşehir Hüseyin Yıldız Anadolu Lisesi	2001

### İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2015	<b>Astra Medikal Tıbbi Aletler</b> Ltd. Şti.	Ar-Ge Personeli
2005	<b>Carlo Erba</b> İlaç Sanayi A.Ş.	Stajyer
2004	<b>Aromsa</b> Gıda Sanayi A.Ş.	Stajyer
2003	<b>Nestle</b> Türkiye Gıda Sanayi A.Ş.	Stajyer