

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

***Streptomyces* TEM İLE LİPAZ ÜRETİMİ**

**Erkan KAYTANKAŞ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu:401.01.04**

**Sunuş tarihi: 08.12.2006**

**Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.İhsan YAŞA**

**Bornova-İZMİR**



Erkan KAYTANKAŞ tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “İMMOBİLİZE *Streptomyces* TEM İLE LİPAZ ÜRETİMİ ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : .....

Raportör Üye: .....

Üye : .....



**ÖZET*****Streptomyces* TEM İLE LİPAZ ÜRETİMİ****KAYTANKAŞ, Erkan****Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı****Tez yöneticisi: Yrd.Doç.Dr. İhsan YAŞA****Aralık 2006, 97 sayfa**

Lipazlar (EC 3.1.3.3) geniş bir pH ve sıcaklıkta stabil ve bir çok substratı enatiyoselektif olarak katalizleyebilmeleri nedeniyle biyoteknolojinin bir çok alanında uygulamaları bulunmaktadır. En yüksek miktarda deterjan katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca gıda endüstrisinde peynir olgunlaştırılmasında ve aroma üretiminde; zirai kimyada, insektisit ve diğer pestisitlerin üretiminde ve ilaç endüstrisinde ibuprofen ve naxopren gibi ilaçların sentezinde de uygulama alanları mevcuttur. Bunlara ilave olarak biosüperfektanların sentezinde, yağların modifiye edilmesinde de kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, toprak ve yağ işletme tesisi atıklarından izole edilen 52 Aktinomiset izolatının ilk taraması tribütirin içeren katı ortamlarda gerçekleştirilmiştir. İzolatlar arasında 11 tür (% 21,15) lipolitik aktivite göstermiştir ancak 3 izolat (F6, F10 ve F11 olarak adlandırılan) lipolitik aktivitenin belirlenmesi amacıyla batık kültür yöntemiyle üretilmiştir. Lipaz aktivitesi, pNPP (p-nitrofenil palmitat) ile belirlenmiştir. *Streptomyces* TEM olarak tanımlanmış yabani bir *Actinomiset* izolatı % 1 zeytin yağı içeren

bir fermantasyon ortamında batık kültürde, 0,19 U/mg protein lipaz aktivitesi göstermiştir. Çalışmalar lipaz üretimini geliştirmek için sürdürülmüştür. Azot kaynaklarının etkisi fermantasyon ortamına kazein, pepton, et ekstraktı, maya ekstraktı, mısır ıslatma sıvısı, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve amonyum klorür katılarak araştırılmıştır. 96 saatlik inkübasyon sonrasında en iyi verim 0,23 U/mg protein ile maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmiştir. Zeytin, mısır, soya, balık, ayçiçeği, fındık yağı ve tween 80 aynı ortamda karbon ve lipaz indükleyicisi olarak test edilmiş, %1 zeytinyağı ile test edilmiş 96 saat sonunda 0,25 U/mg protein lipaz aktivitesi ölçülmüştür.

Çalışmamızda, alginatla immobilize edilip kitosanla kaplanmış *Streptomyces* TEM ile batık kültürde lipaz üretiminin iyileştirilebileceği de test edilmiştir. Bir ml kültür sıvısında immobilize hücrelerin sadece 0,18 U/mg protein lipaz aktivitesi oluştururken, serbest hücrelerle üretilen lipaz aktivitesi 0,23 U/mg proteindir. Düşük lipaz üretimine ilave olarak immobilize hücreler dört günlük inkübasyon sonunda boncukları hidrolizlemiştir.

*Streptomyces* F11 16S rRNA dizi analizine göre *Streptomyces sampsonii* türünün bir suşu olarak tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler :** *Streptomyces*, Lipaz Üretimi, İmmobilizasyon, Moleküler Karakterizasyon

**ABSTRACT****LIPASE PRODUCTION BY *Streptomyces* TEM****KAYTANKAS, Erkan****Master of Science Thesis Biology Department****Supervisor: Assos.Prof.Dr. İhsan YAŞA****November, 2006, 97 pages**

Lipases (glycerol ester hydrolases (E.C.3.1.1.3)) find applications in many areas of biotechnology due to their ability to catalyze enantioselective reactions with a wide range of substrates and their stability over wide variations of temperature and pH. Their major application in terms of quantity is as additives for laundry detergents. However, they also find applications in the food industry, in the production of aromas and the maturing of cheeses, in agrochemistry, in the production of insecticides and other pesticides, and in the pharmaceutical industry, in the synthesis of drugs such as naxopren and ibuprofen. Further, they can be used to modify fats and oils and in the synthesis of biosurfactants.

In this study, primary screening of 52 Actinomycetes strain isolated from soil and waste of Oil Processing Unit was carried out on solid media using tributyrin, as current substrates. Among them, eleven representative strains (21.15 %) show lipolytic activity but only three isolates of them selected and grown in submerged cultures for evaluating their lipolytic activity. Lipase activity was determined by the *p*NPP (*p*-nitrophenyl palmitate) method.

## VIII

A wild Actinomycetes strain preliminary identified as *Streptomyces TEM* initially presented a lipase activity of 0,19 U/mg protein in submerged culture in a fermentation medium containing 1 % olive oil. Studies were undertaken to improve lipase production. The effect of nitrogen source was studied by adding casein, peptone, meat peptone, yeast extract, corn steep liquor, ammonium sulfate, ammonium nitrate, and ammonium chloride to the fermentation medium. The best yield, of 0.23 U/mg protein after 96 h, was obtained with the medium supplemented with yeast extract. Olive, corn, soy, fish, cotton, sunflower, nut oils and tween 80 were tested as carbon sources and lipase inducer in this medium, with olive oil at 1 % giving a lipolytic activity of 0,25 U/mg protein after 96 h.

In our study, we also examined that the production of lipase by *Streptomyces TEM* would be improved with calcium alginate immobilization followed coated with chitosan in submerged fermentation. Results showed that in 1-mL culture broth, immobilized cells produced only lipase activity of 0,18 U/mg protein, whereas free cells produced lipase activity of 0.23 U/mg protein. In addition to low lipase production, immobilized cells hydrolyzed beads after four days incubation.

*Streptomyces F11* was identified as a strain of *Streptomyces sampsonii* according to 16S rRNA sequence analysis.

**Key words:** *Streptomyces*, Lipase Production, Immobilization, Molecular Characterization

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan başta sayın Yrd. Doç. Dr İhsan YAŞA ve Araő Gör. Bilge Hilal ÇADIRCI olmak üzere tüm Biyoloji Bölümü çalışanlarına, çalışmalarım esnasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Makro A.Ő. çalışanlarına ve beni her konuda daima destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (2004/Fen/033).



**İÇİNDEKİLER**

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>IX</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>XIX</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Lipazların Genel Özellikleri .....	1
1.1.1. Lipaz ve Esterazlar .....	2
1.1.2. Spesifiklikleri .....	2
1.1.3. Fizikokimyasal Özellikleri .....	4
1.1.4. İnhibitör ve Aktivatörleri.....	5
1.2. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar .....	6
1.3. Lipaz Üreticisi Mikroorganizmalar .....	7
1.4. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları .....	9
1.5. Lipaz Üretimi.....	11
1.5.1. Hücre İçindeki Lokasyon.....	11
1.5.2. Üretim Kaynağının Seçilmesi.....	12
1.5.3. Fermentasyon Tipi.....	13
1.5.4. Fermentasyon Ortamı ve Şartları.....	16

## İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
1.6. Streptomyces Genusu .....	22
1.6.1. <i>Streptomyces</i> izolasyonu .....	30
1.6.2. İzolasyon için pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi .....	31
1.6.3. Kültivasyon .....	32
1.6.4. Oksijen Gereksinimi.....	32
1.6.5. <i>Streptomyces</i> Türlerinin Karakterizasyonu .....	33
1.6.5.1. Biyokimyasal kriterler.....	33
1.6.5.2. Makroskobik özellikler .....	34
1.6.5.3. Mikroskobik özellikler.....	34
1.6.5.4. Fizyolojik testler.....	35
1.7. Bakterilerin Karakterizasyon Yöntemleri .....	36
1.7.1. Morfolojik Yöntemler .....	36
1.7.2. Fenotipik Yöntemler .....	36
1.7.3. Genotipik Yöntemler.....	37
1.7.3.1. Plazmid Tiplendirme.....	38
1.7.3.2. Kromozal DNA Restriksiyon Endonükleaz Analizi .....	38
1.7.3.3. Ribotyping.....	39
1.7.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) Dayalı Yöntemler.....	39
1.7.3.4.1. PZR-Ribotyping.....	39

**İÇİNDEKİLER (Devamı)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
1.7.3.4.2. PZR-16 S rRNA Bölgesinin Dizi Analizi .....	40
1.7.3.4.3. PZR-RFLP .....	43
1.7.3.5. RFLP'ye dayalı genomik DNA .....	43
1.8. İmmobilizasyon .....	44
1.8.1. Tutuklama Yöntemleri.....	45
1.8.1.1. Jelde Tutuklama.....	46
1.8.2. Jelde tutuklamada kullanılan Kullanılan Doğal Polimerler .....	46
1.8.2.1. Aljinat.....	46
1.8.2.2. Kitosan.....	48
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>50</b>
2.1. Materyal.....	50
2.2. Yöntem .....	52
2.2.1. Örneklerin toplanması ve hazırlanması .....	52
2.2.2. Aktinomyces İzolasyonu .....	53
2.2.3. Lipaz Üreticisi <i>Aktinomiset</i> 'lerin Saptanması .....	53
2.2.3.1. Kalitatif Yöntem ile Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	54
2.2.3.2. Kantitatif Yöntem ile Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	54

**İÇİNDEKİLER (Devamı)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.3. Protein Tayini.....	56
2.4. İmmobilize Sporlar ile Lipaz Üretimi.....	57
2.4.1. Sporların Aljinat ile İmmobilizasyonu .....	57
2.4.2. Kitosanla Kaplama .....	57
2.5. Batık Kültür Yöntemi ile Lipaz Üretimi.....	58
2.5.1. Farklı Karbon Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi....	58
2.5.2. Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi.....	58
2.5.3. Farklı pH Değerlerinin Lipaz Üretimine Etkisi .....	58
2.5.4. İzolatın Büyüme Eğrisinin Çıkarılması.....	59
2.6. İzolatın Tanılanması.....	59
2.6.1 Diamopimelik Asit (DAP) Analizi .....	59
2.7.2. Moleküler Tanılama .....	60
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>67</b>
3.1. Kalitatif ve Kantitatif Lipaz Aktiviteleri.....	67
3.2. İzolatların Lipaz Aktiviteleri.....	68
3.3. Karbon Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi .....	70
3.3. Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi .....	72
3.4. Ortam pH'ının Lipaz Üretimine Etkisi .....	73
3.5. Büyüme Eğrisi.....	74
3.6. İmmobilize Sporlar ile Lipaz Üretimi.....	75

**İÇİNDEKİLER (Devamı)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.7. DAP Analizi .....	76
3.8. Moleküler Tanılama .....	77
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>87</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>97</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 1.1</b>	Lipaz tarafından gerçekleştirilen hidroliz ve ester sentezi reaksiyonları .....1
<b>Şekil 1.2</b>	Farklı pozisyon spesifikliğine sahip lipazlar .....3
<b>Şekil 1.3</b>	Sulu ve susuz ortamlarda lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar .....7
<b>Şekil 1.4.</b>	4 farklı ddNTP ve dNTP’li bazların bulunduğu karışım ile PCR reaksiyonunun ve ddTTP’nin şematize hali.....41
<b>Şekil 1.5.</b>	a)Tek kapiller sistemi ile çalışan sekanslama cihazı. b)Kapiller içinde fragment uzunluklarına göre sıralanan dizilerin başındaki farklı dalga boyundaki flouresans boyayla işaretli bazlar lazer önünden geçerken ışımaya yapmakta ve bu ışık mercekler aracılığıyla CCD kamera üzerine düşürülmektedir. Daha sonra bilgisayar aracılığıyla istenilen DNA bölgesinin nükleotid dizisi belirlenmektedir.....42
<b>Şekil 1.6.</b>	Aljinik asidin yapısı.....47
<b>Şekil 1.7.</b>	Kitin ve Kitosanın Yapısı .....48
<b>Şekil 1.8.</b>	Deasetilasyon işlemi .....49
<b>Şekil 3.1.</b>	pNP standart grafiği.....67
<b>Şekil 3.2.</b>	BSA ile hazırlanan protein standart grafiği .....68

**ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)**

<b><u>Şekil</u></b>		<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 3.3.</b>	İzolatların batık kültür fermentasyon tekniği ile yapılan üretim ortamındaki lipaz aktiviteleri.....	69
<b>Şekil 3.4.</b>	Karbon kaynaklarının lipaz üretimi üzerine etkisi.....	71
<b>Şekil 3.5.</b>	Azot kaynaklarının lipaz üretimi üzerine etkisi .....	72
<b>Şekil 3.6.</b>	Ortam pH'ının lipaz üretimi üzerine etkisi .....	73
<b>Şekil 3.7.</b>	Büyüme eğrisi .....	75
<b>Şekil 3.8.</b>	PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	77
<b>Şekil 3.9.</b>	PZR protokolü 1'e göre <i>Streptomyces</i> TEM izolatının elde edilen baz dizisi .....	78
<b>Şekil 3.10.</b>	PZR protokolü 2'ye göre <i>Streptomyces</i> TEM izolatının elde edilen baz dizisi .....	80
<b>Şekil 3.11.</b>	PZR protokolü 3'e göre <i>Streptomyces</i> TEM izolatının elde edilen baz dizisi .....	82

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Mikrobiyal lipaz kaynakları.....	8
Çizelge 1.2. <i>Aspergillus niger</i> 'den elde edilen lipaz için ortam şartları .....	21
Çizelge 1.3. <i>Rhizopus arrhizus</i> 'dan lipaz üretimi için ortam şartları .....	21
Çizelge 1.4. Havasal miselyumda bulunan <i>Streptomyces</i> ve bazı <i>Actinomycete</i> genuslarına ait anahtar biyokimyasal özellikler .....	24
Çizelge 1.5. <i>Streptomyceteaceae</i> üyeleri ile diğer bazı <i>Actinomyces</i> 'lerin morfolojik kriterleri .....	26
Çizelge 1.6. Bazı <i>Streptomyces</i> türlerinin büyüme sıcaklık aralığı.....	29
Çizelge 1.7. <i>Streptomyces</i> izolasyonu ve kültürasyonunda kullanılan karbon ve azot kaynakları.....	31
Çizelge 2.1 Lipaz aktivitesi ölçüm yöntemi .....	55
Çizelge 2.2 Bradford yöntemi.....	56
Çizelge 2.3. PZR protokolü 1 .....	62
Çizelge 2.4. Thermalcyclers protokolü 1 .....	62
Çizelge 2.5. PZR protokolü 2 .....	62
Çizelge 2.6. Thermalcyclers protokolü 2 .....	63

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Çizelge 2.7.</b> PZR protokolü 3 .....	63
<b>Çizelge 2.8.</b> Thermalcycler protokolü 3 .....	63
<b>Çizelge 2.9.</b> Cycle sequencing PZR karışımı .....	65
<b>Çizelge 2.10.</b> Cycle sequencing PZR protokolü.....	65

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Lipazların Genel Özellikleri

Lipazlar (triacilgliserol ester hidrolazlar, EC 3.1.1.3) gliserin ester bağlarının parçalanmasını sağlayan hidrolaz grubu enzimlerdir. Sulu ortamlarda yağları hidrolizleyerek monogliserid, digliserid, serbest yağ asitlerinin ve gliserol oluşumunu katalizlerken, su miktarının sınırlı olduğu hidrofobik organik çözümlerde gliserol ve yağ asitlerinden açilgliserol oluşumunu katalizlemektedir (Gjellesvik et al., 1992) (Şekil 1.1).

Hidroliz:



Ester sentezi:



Şekil 1.1 Lipaz tarafından gerçekleştirilen hidroliz ve ester sentezi reaksiyonları

Çoğu lipaz, molekül kütlesi 20-60 kDa arasında değişen ekstraselüler asidik glikoproteinlerdir. Birçoğu % 2-15 oranında karbohidrat içerir. Aktif bölgelerine göre serin hidrolazlar olarak sınıflandırılırlar. Lipazlar amino asit dizilişleri itibarı ile farklılık gösterebilirler de onbir lipaz çeşidinin her birinin üç boyutlu yapıları birbirlerine benzer. Bu yapısal karakteristik  $\alpha/\beta$  katlanması olarak adlandırılır ve gösterilir. Sekiz paralel  $\beta$  yaprak yapısı ve

bunların çevresini saran  $\alpha$ -helikslerden oluşan bir yapıdır. Lipazların katalitik bölgeleri nükleofilik serin, aspartat yada glutamata hidrojenle bağlı histidinden oluşmaktadır (Godtfredsen, 1990).

### 1.1.1. Lipaz ve Esterazlar

Esterazlarla karşılaştırıldıklarında lipazlar çok farklı substrata etki etmelerinin yanında aktiviteleri substrat konsantrasyonu ile değil substrat yüzeyi ile ilişkilidir.

Protein yapısı hakkında artan bilgiler, enzimlerin üç boyutlu yapılarına göre sınıflandırma çalışmalarını desteklemektedir. Hidrolazlar,  $\alpha/\beta$  hidrolaz katlanması gösteren protein grubuna dahildirler. Tüm lipazlar (fungal, bakteriyel ve pankreatik) ve esterazların büyük çoğunluğu bu katlanmayı gösterirler (Godtfredsen, 1990).

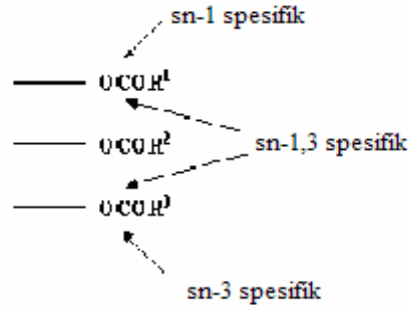
Lipazlar ve esterazlar oldukça geniş substrat spesifikliği gösterirler, bu nedenle fonksiyonları göz önüne alınarak sınıflandırılmazlar.

Esterazlar için optimum pH 5,5-6,5 iken, lipazlar için pH 8,0-9,0 civarındadır.

### 1.1.2. Spesifiklikleri

Lipazlar gliseritleri hidrolizleme yeteneklerine göre üç ana gruba ayrılırlar. İlk grup (örneğin; *Rhizopus* ve *Rhizomucor* lipazları) 2. pozisyondan parçalayamaz, terminal gruplardan parçaladığından 1,3 spesifik olarak adlandırılırlar. İkinci grup lipazlar spesifik değildir, hem primer hem sekonder esterleri parçalayabilirler. Üçüncü grup ise pozisyon olarak

nonspesifik fakat yağ asidi seçimli birkaç lipazın oluşturduğu gruptur. Sadece özel bir tip yağ asidinin bulunduğu ester bağına parçalarlar (*Geotrichum candidum* ve çimlenmemiş yulaf tohumları öncelikle 9-10 doymamış yağ asitlerinin esterlerini parçalarlar) (Godtfredsen, 1990).



Şekil 1.2 Farklı pozisyon spesifikliğine sahip lipazlar.

Lipazlar ayrıca zincir uzunluğu spesifikliğı de gösterebilirler (peynir yapımında kullanılan lipazlar, kısa zincirli esterleri parçalarken, orta ve uzun zincir uzunluğuna sahip esterleri parçalamazlar).

Lipazlar, birçok enzimin aksine oldukça geniş substrat spesifikliğı ve organik çözenlere karşı toleranslarından dolayı geniş sentetik potansiyele sahiptirler. Çözücü sisteme bağılı olarak hidroliz ya da sentetik reaksiyonlardan birini katalizleyebilirler. Trigliseritlerden başka alifatik, bisiklik ve aromatik esterler hatta organometalik bileşiklerin esterleri lipazlar tarafından substrat olarak kabul edilir. Rasemik esterler ya da birden fazla hidroksil grubuna sahip substratlar kullanıldığında, lipazlar yüksek enantiyo ve bölge seçimlilik ile aktivite gösterirler. Ayrıca oldukça fazla tiyoester ve aktif aminler de lipazların substratları olabilirler (Kamini et al., 2000).

### 1.1.3. Fizikokimyasal Özellikleri

Genellikle enzimler suda çözünürdürler. Hayvanlara ait çoğu lipazın optimum pH'sı alkali bölgededir (pH 8,0-9,0). Ancak kullanılan substrata, tuz varlığına ve emülsifiye edicilerin türüne bağlı olarak asidik bölgeye kayabilir. Asidik lipazlar çeşitli memeli dokularının lizozomlarında bulunur. Çoğu mikrobiyal lipaz pH 5,6-8,5 civarında maksimum aktivite gösterir ve nötral pH' da en yüksek kararlılığa sahiptir. Birçok lipaz 30-40 °C'de optimum aktivite gösterirken, *R. miehei* (70°C) ve *C. antarctica* (60°C) çok daha yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite gösterirler. Termostabiliteleri kaynaklarına bağlı olarak değişir, bitki ve hayvan lipazları ekstraselüler mikrobiyal lipazlara oranla daha az termal kararlılığa sahiptir. *Pseudomonas*'ın oldukça termofilik bir suşunun 100 °C sıcaklığa dayanıklı lipaz ürettiği rapor edilmiştir (Sharma et al., 2001). Lipazın sıcaklığa dayanıklılığı substrat varlığına dayanmaktadır (muhtemelen substratın enzim etrafındaki aşırı suyu uzaklaştırması sonucu enzim hareketinin sınırlanmasına bağlı olarak). Sığır pankreatik lipazının tribütirin ve heptanol içeren, su içeriği %0.4'ün altında olan reaksiyon ortamında yüksek sıcaklıklarda (yaklaşık 100 °C) birkaç saat kararlılığını koruduğu bildirilmiştir. Bu kararlılığın nedeni, düşük su içeriği durumunda protein katlanmasının açılmasına neden olacak olan konformasyonel hareketliliğin azalmasıdır. Termal inaktivasyon için protein katlanmasının açılması (üç boyutlu yapının bozulması) ilk adımdır (Sharma et al., 2001).

#### 1.1.4. İnhibitör ve Aktivatörleri

Serbest yağ asitleri ve alkollerin, lipaz katalizli hidroliz reaksiyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Serbest yağ asitlerinin, ara yüzeyde birikerek enzimin trigliserit moleküllerine ulaşmasını önlemek yoluyla, düşük molekül ağırlıklı alkollerin ise enzimin üç boyutlu yapısına zarar vermek yoluyla etki gösterdiği düşünülmektedir (Balcao et al., 1998).

Safra tuzları bazı lipazların (*Phycomyces nitens* lipazı) aktivitesini arttırmaktadır (Krishna and Karanth, 2002). *Rhizopus arrhizus* lipazı safra tuzları tarafından inhibe olurken pankreatik lipaz (Lairon et al., 1978), *Pseudomonas* (Beher and Lin , 1975), *Chromobacterium* (Sugiura and Isobe, 1974), *Streptococcus* (Tanaka et al, 1999) ve *Rhizomucor* lipazları safra ile inhibe olmaz. İnsan pankreatik lipazı, pankreasın ekzokrin salgısında yer alan spesifik bir protein (kolipaz) ile bağlanır ve çözülmüş trigliseritlere karşı yüksek spesifiklik gösterir (van Tilbeurgh et al.,1993).

Bazı hafif metal katyonları substratları üzerine etki ederek lipaz aktivitesini etkilerler. Kalsiyum iyonları genellikle reaksiyon hızını artırır (Garcia et al., 1991). Sodyum iyonları çözümler pankreatik ve *Aspergillus wentii* lipazının aktivitesini artırırken, bu iki iyon *Aspergillus niger*'in iki lipazını inhibe eder (Garcia et al., 1991). İyon konsantrasyonu ve maruz kalma süresine bağlı olarak ağır metal katyonları dönüşümlü ya da dönüşümsüz inhibisyona neden olabilir. Fe<sup>+3</sup> iyonları *A. niger* lipazı (Garcia et al., 1991) ve *Streptococcus faecalis* (Chander et al.,1979) lipazı hidrolitik aktivitelerini artırırken, Fe<sup>+2</sup> iyonları *A. niger* (Chander et al.,1979), *Chromobacterium*, *Pseudomonas* (Sugiura and Isobe, 1974) ve *S. faecalis* (Chander et al.,1979) lipazı aktivitelerini inhibe etmektedir. Metal

iyonlarının aktivite üzerindeki pozitif etkisi iyonize yağ asitleri ile kompleks oluşturarak ara yüzeydeki çözünürlük ve davranışlarını değiştirmesi yoluyla olabilir, negatif etkisi ise aktif merkeze yarışmalı olarak bağlanmalarından kaynaklanabilir (Sugiura and Isobe, 1974). Kaybedilen aktivite metal şelatlayıcı ajanların eklenmesi ile geri kazanılabilir.

Susuz çözümlerin enzimler üzerine çok çeşitli etkileri vardır: Spesifik olarak bağlanabilir, substrat bağlanmasıyla yarışabilir, heliks yapısını değiştirebilir, enzimle etkileşebilir yada katalitik reaksiyon hızına çok değişik yolla etki edebilirler. Zeytinyağının lipaz katalizli hidrolizi, çözümlerinin ara yüzeye adsorpsiyon için trigliserit molekülleri ile yarışmaları nedeniyle organik çözümler varlığında inhibe olmaktadır (Sugiura and Isobe, 1974).

## **1.2. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar**

Lipazların biyolojik fonksiyonu ester hidrolizidir, ayrıca susuz organik çözümlerde, bifazik sistemlerde, miselli çözeltilerde, denge ters yöne kayar ve esterifikasyon, transesterifikasyon (asidoliziz, interesterifikasyon, alkoliziz), aminoliziz reaksiyonlarının katalizini gerçekleştirir (Kulkarni, 2002). Hidroliz ve ters yöndeki sentez reaksiyonlarının kontrolü reaksiyon karışımındaki su aktivitesi ile kontrol edilir.

Hidroliz:



Ester sentezi:



Asidoliziz:



İnteresterifikasyon:



Alkoliziz:



Aminoliziz:



Şekil 1.3 Sulu ve susuz ortamlarda lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar

### 1.3. Lipaz Üreticisi Mikroorganizmalar

Pek çok bakteri, maya ve küf türleri lipaz üretebilmektedir (Çizelge 1.1). Tek bir strain tarafından birden fazla enzim üretilir ve bunlar farklı genetik orijine sahip olabilirler ya da bir amino asidin modifikasyonu sonucu üretilirler. Örneğin *Rhizopus delemar*'ın kültür filtratından 3 farklı lipaz (A, B, C) elde edilmiştir. Bu enzimler saflaştırıldıktan sonra, Lipaz B ve C'nin tek bir proteinin farklı formları olduğu, ancak Lipaz A'nın farklı bir protein olduğu görülmüştür. Bunun yanında *Penicillium crustosum*'dan fermantasyon ile elde edilen 2 lipaz, zeytinyağı ve tribütirin üzerinde farklı aktiviteler göstermelerine rağmen, bunların değiştirilebilir oldukları gösterilmiştir. Taksonomik olarak yakın strainler farklı tiplerde

lipaz üretebilirler. Toprakta, alkali lipaz üreten 2 *Pseudomonas* straini izole edilmiştir ve *P. nitroreducens* ve *P. fragi*'den elde edilen lipazların çok farklı termal stabilitelerde oldukları bulunmuştur (Kulkarni, 2002).

**Çizelge 1.1.** Mikrobiyal lipaz kaynakları

Türler	Fermentasyon	Aktivite (EU.m/L)	Deney Ortamı
<b>BAKTERİ</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Çalkalamalı kültür	4.5	Zeytin yağı,37°C,pH 8.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Çalkalamalı kültür	17	Tributirin,37°C ,pH 8.0
<i>Chromobacterium viscosium</i>	30 L-fermentör	10.8	Domuz yağı,40°C,pH 7.0
<i>Micrococcus caseolyticus</i>	Çalkalamalı kültür	15	Zeytin yağı,40°C pH 9.5
<i>Bacillus licheniformis</i>	Çalkalamalı kültür	6	Zeytin yağı 45°C pH 8.5
<i>Pseudomonas fragi</i>	20 L-fermentör	75	Zeytin yağı,37°C pH 9.0
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	20 L-fermentör	500	Zeytin yağı,37°C pH 9.0
<i>Alcaligenes sp.</i>	15 L-fermentör	800	Zeytin yağı,37°C pH 8.7
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Çalkalamalı kültür	-	Tributirin,55°C ,pH 8.8
<b>MAYA</b>			
<i>Candida cylindracea</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytin yağı,30°C pH 7.0
<i>Candida cylindracea</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytin yağı,37°C pH 7.0©
<i>Torulopsis ernobii</i>	30 L-fermentör	110	Zeytin yağı,37°C pH 6.5
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Çalkalamalı kültür	40	Zeytin yağı,30°C pH 9.5
<i>Candida lipolytica</i>	2 L-fermentör	1	Zeytin yağı,37°C pH 8.2
<b>KÜF</b>			
<i>Aspergillus luchuensis</i>	Katı substrat		Zeytin yağı,40°C pH 7.0
<i>Aspergillus niger</i>	Çalkalamalı kültür	4	Zeytin yağı,37°C pH 6.5
<i>Rhizopus delemar</i>	Batık kültür	60	Zeytin yağı,37°C pH 7.5
<i>Rhizopus arrhizus</i>	100 L-fermentör	350	Zeytin yağı,37°C pH 8.5
<i>Geotrichum candidum</i>	Yüzey kültür	6	Zeytin yağı,32°C pH 58.5
<i>Geotrichum candidum</i>	Çalkalamalı kültür	170	Zeytin yağı,30°C pH 5.6
<i>Mucor lipolyticus</i>	Çalkalamalı kültür	90	Zeytin yağı,37°C pH 8.0
<i>Humicola lanuginosa</i>	600 L-fermentör	55	Zeytin yağı,45°C pH 8.0
<i>Myricum sp.</i>	20 L-fermentör	4	Zeytin yağı,55°C pH 8.0
<i>Phycomyces spp.</i>	Fermentörler	160	Zeytin yağı,37°C pH 7.0
<i>Penicillium funiculosum</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytin yağı,37°C pH 8.0
<i>Byssochlamys fulva</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytin yağı,37°C pH 8.0
<i>Fusarium solani</i>	Çalkalamalı kültür	-	Zeytin yağı,37°C pH 8.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	Çalkalamalı kültür	220	Tributirin,30°C pH 7.0

#### 1.4. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

Endüstriyel uygulamalardaki potansiyelinden dolayı mikrobiyal lipaz üretimine ilgi son on yıldır giderek artmıştır. Protein ekstraksiyonu ve saflaştırma metotları, genetik mühendisliği ve buna bağlı olarak klonlama çalışmalarının ilerlemesi ile lipaz katalizli reaksiyonların klasik kimyasal yöntemlere kıyasla, ticari açıdan daha uygun alternatif oluşturacağı düşünülmektedir. Ekolojik kaygılar da lipaz kullanımını desteklemektedir, lipaz katalizli reaksiyonlar canlı metabolizmasında gerçekleşen metabolik yollara eşdeğer olduğundan bu reaksiyonlar, kimyasal katalizli reaksiyonlara göre çevre açısından sorun oluşturmamaktadır (Falch, 1991).

Bu uygulamalara örnek olarak; gıda katkısı (lezzet artırıcı) (Downey, 1980), kaliteli kimyasallar (ester sentezleri), deterjanlar (yağların hidrolizi) (Falch, 1991), atık su arıtımı (yağ kalıntılarının uzaklaştırılması ve ayrılması), kozmetik (lipidlerin uzaklaştırılması) (Macrae, 1990), eczacılık (gıdalardaki katı ve sıvı yağların sindirimi) (Ghosh, 1996), dericilik (hayvan derisindeki yağların uzaklaştırılması), medikal (kan trigliserit tayini) (Elibol ve Özer, 2000; Kamini, 2000) verilebilir. Bunun yanı sıra lipazların diğer avantajları;

1) Sterospesifiklik, seçimlilik ve substrat seçimliliği gibi özellikleri sayesinde kimyasal katalizatörlere göre daha kaliteli ürün üretimine imkan tanınması,

2) Düşük aktivasyon enerjisine gereksinim duymalarından ve ılımlı koşullarda (düşük ısı ve pH) reaksiyon vermelerinden dolayı, reaksiyon için

ihtiyaç duyulan enerjinin azalması ve reaksiyon ürünlerinin ortam ısısından dolayı görecekleri zararın indirgenmesidir.

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

Süt endüstrisinde peynirin olgunlaştırılma sürecinin hızlandırılmasında, peynir benzeri ürünlerin (krema, sos, çorba) üretimi amacıyla sütün içerdiği yağın hidrolizinde lipazlar kullanılmaktadır (Downey, 1980).

Ayrıca lipazlar, katalizledikleri reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin saflığından dolayı katı ve sıvı yağların hidroliz ve interesterifikasyonu için önemli potansiyele sahiptirler. Enzim kullanımında, enzimatik olmayan reaksiyonların gerektirdiği yüksek sıcaklık gibi sert koşullara gerek duyulmadığından, reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin ısı nedeniyle bozulması (koku, renk kaybı) söz konusu olmaz (Sharma et al., 2001).

Lipaz teknolojisi ayrıca katı ve sıvı yağlara istenen fonksiyonel ve besinsel özellikler kazandırılarak yeniden yapılandırılmalarına, düşük kalite yağlardan yüksek kalitedeki yağların üretimine olanak sağlar (örneğin kakao yağı, anne sütü benzeri çocuk gıdaları ve çoklu doymamış yağ asitlerince zengin yağ üretimi).

Diğer bir endüstriyel uygulama alanı, ilaç ve kimyasal üretiminde optikçe aktif ve saf polimerlerin (rasemik karışımları yerine) lipaz katalizli sentezidir. Lipaz katalizi ile üretilen monogliseritler, gıda ve kişisel bakım ürünlerinin (cilt, güneş kremleri, banyo yağları) üretiminde emülsifiye edici olarak görev alırlar. Tedavi edici krem olarak kullanılan yağ asidi ve yağ

alkollerinin esterlerinin ve biyosümfaktan olarak kullanılan şeker esterlerinin sentezi yine lipaz katalizli reaksiyonlarla gerçekleştirilir (Antonian, 1988).

## 1.5. Lipaz Üretimi

Lipazların uygulama alanları günden güne artmakta ve dolayısıyla enzim üretiminde daha ekonomik ve etkin tekniklerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Ticari olarak satılan bütün lipazlar biyolojik materyallerden izole edilmektedir (Bormann et al., 1993).

### 1.5.1. Hücre İçindeki Lokasyon

Lipidler suda çözülemezler ve eğer hücre için nutrient olarak kullanılacaksa, absorpsiyonlarının kolaylaştırılması için ekstraselüler olarak polar komponentlerine parçalanmaları gerekmektedir. Lipazlar, biyolojik polimerleri parçalayan ve aynı zamanda yüksek oranda üretilebilen ekstraselüler özellikteki enzimlerdendir. Ticari açıdan önemli çoğu lipaz, kültür süpernatantların test edilmesiyle, ya da sadece ekstraselüler enzimlerin belirlenebildiği katı substrat fermantasyonlarından elde edilen sıvı ekstraktlarla test edilmelidir. Örneğin katı substrat fermantasyonu ile en yüksek oranda lipaz üreticilerini bulmak için 800 *Aspergillus niger* straini incelenmiştir. *Geothricum candidum*'da ise lipazın hücre zarında oluşturulduğu ve sentezlenmeden önce bir süre tutulduğu gösterilmiştir (Frost and Moss, 1987).

Bazen hücreye bağlı lipazlar da bulunabilir. Örneğin; *Candida lipolytica*'daki yapısal enzim ve *Bacillus subtilis*'in mutant strainlerindeki membrana bağlı enzimi içerir (Brocca et al., 1998).

### 1.5.2. Üretim Kaynağının Seçilmesi

Yağ metabolizmasındaki rolünden dolayı lipazlar, hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunurlar. Son 35-40 yıldır enzimler için mikroorganizmalar en önemli ve ekonomik kaynak durumuna gelmiş ise de hayvansal ve bitkisel kaynaklar özel uygulamalar için hala önemli bir rol oynamaktadır. Mikroorganizmalarda bugüne kadar tespit edilmemiş veya bitki ve hayvan dokularında ekonomik üretime olanak sağlayacak yüksek konsantrasyonda bulunan enzimler bu kaynaklardan elde edilirler. Fakat mikrobiyal lipazlar hücre içinde sentezlenip hücre dışına salgılanmasından, genetik manipülasyonlarla enzim üretiminin artırılabilir olması ve bitki ve hayvan lipazına kıyasla daha stabil olmasından dolayı endüstrilerde ve yağların tanınmasında enzimatik olarak geniş kullanım alanları bulmaktadırlar (Elibol ve Özer, 2000).

Hayvansal kaynaklı lipaz eldesi, genel olarak lipaz enzimi bakımından zengin olan pankreastan elde edilir. Yağ içeriği yüksek olan bütün bitkilerde ise (zeytin, ayçiçeği, fındık vb.) lipaz enzimi mevcuttur. Fakat enzim içeriği mevsime bağımlılık gösterdiğinden üretimde bu durumun dikkate alınması gerekmektedir. Mikrobiyal lipaz üretiminde ise bakteri (*Bacillus megaterium* (Godtfredsen, 1990), *Burkholderia glumae* (El Khattabi et al., 2000) vb.), fungus (*A. niger* (Hsiao et al, 1996), *R. arrhizus* (Elibol ve Özer, 2000), *Mucor circinelloides* (Balcao et al, 1998) vb.), mayalar (*Candida rugosa*, (Brocca et al, 1998), *Yarrowia lipolytica* (Merek and Bednasski, 1996) vb.) ve Aktinomisetler (*Sterptomyces cinnamomeus* (Sommer et al., 1997) vb.) kullanılmaktadır.

Lipaz üretimi için seçilecek olan mikroorganizma türünde aranması gereken ilk şart lipazı bol miktarda ürettiyor olmasıdır. Bunun yanında mikroorganizma tür seçimini aşağıda belirteceğimiz başka parametreler de etkiler.

- Kısa bir fermentasyon süresi sonunda organizma yüksek verimle lipaz üretmelidir.

- Ekstrasellüler enzim üretimi tercih edilir. Çünkü hücre membranı parçalama işlemi gerektirmeden enzim izolasyonu kolaydır.

- Seçilecek mikroorganizma türü, toksik madde ve antibiyotik üretmemeli, ucuz besi ortamında çoğalıp faaliyet göstermeli ve gerek üretilen enzime zarar verecek gerekse izolasyon ve saflaştırma adımlarında problem yaratabilecek yan ürünleri (renkli ve sümüksü maddeler, proteazlar vb.) de salgılamamalıdır.

- Mikroorganizma kültür ortamı koşullarında enzim verimliliği açısından kararlı olmalıdır.

- Kültürler filtrasyon veya santrifüjleme ile berraklaştırma sırasında olabildiğince az problem çıkarmalıdır. İntrasellüler enzimler durumunda hücreler kolay parçalanmalıdır.

### 1.5.3. Fermentasyon Tipi

Küflerden elde edilen lipazlar, hem katı kültür (KKF) hem de derin kültür metodu (SmF) kullanılarak üretilmektedir. Ezilmiş buğday kepeği ortamında *Aspergillus luchuensis*'i kullanarak katı kültür yöntemi (KKF) başarı ile uygulanmıştır. Ayrıca *Aspergillus niger* ile bran-koji ortamı da

kullanılmıştır. *Rhizopus delemar*'ın katı kültür yönteminde, buğday kepeği üzerinde, belirlenebilir miktarda lipaz üretmedikleri, ancak sulu kültürler içinde üretebildikleri gösterilmiştir. Bu olay sıvı kültürlerde değil de yarı katı kültürlerde ekstraselüler olarak üretilen proteazın, lipazı dejenere etmesinden kaynaklanır. Araştırmacılar, *Aspergillus* türleri için, katı-substrat ya da deri kültür yöntemlerinden hangisinin kullanılacağına strainlere göre değişebileceğini öne sürmüşlerdir (Falony et al., 2006).

Sıvı kültürlerinin havalandırılmalı veya çalkalamalı kültür yöntemlerinin de olduğu gibi metodlarla havalandırılması, tek hücreli organizmalardan veya birçok filamentöz küften lipaz eldesinde fayda sağlamıştır. Statik kültürün havalandırılmalı veya çalkalamalı kültüre değiştirilmesi ile lipaz verimindeki artışlar literatürde mevcuttur (Falony et al., 2006).

*S. aureus* için çalkalamalı kültür tekniğinin kullanılması sonucunda, verim 1,2 ila 6 kat oranında artmış ve fermantasyon süresi 4 günden 1-2 güne kısalmıştır. Bu durumda kullanılan ortam tipinin etkisinin çok büyük olduğu söylenebilir. Bununla birlikte lipazların sadece havalandırılan ortamlarda üretildiği ve çalkalama yöntemi ile ortama hava püskürtme yönteminin aynı etkide olduğu gösterilmiştir. *Rhizopus nigricans* için, havalandırma sonucunda büyüme oranı ile beraber, lipaz aktivitesinin de arttığı gösterilmiştir. *Mucor mucedo* fermantasyonunda, çalkalamalı ortamların, çalkalamalı olmayanlara kıyasla, lipaz aktivitesinin %40 etkilendiği ancak miselyum ağırlığının etkilenmediği gözlenmiştir. Guiseppin (1984) *R. delemar*'dan lipaz üretiminde oksijenin sınırlayıcı etkisi olduğunu bulmuştur. Hem filamentöz kısımda hem de pellet içinde,

litrede 47  $\mu\text{mol}$ 'un altında  $\text{O}_2$  olduğunu bulmuş ve çalkalamalı kültürde oksijenin nutrienti sınırladığı sonucunu çıkarmıştır. (Frost and Moss, 1987)

*Geothricum candidum* için düşük hızda çalkalama ile lipaz veriminin %60 azaldığı rapor edilmiştir. *S. aureus* için yapılan aynı çalışma, çalkalama yönteminin faydalı olduğunu göstermiştir. *G. candidum*'daki büyümenin ve lipaz üretiminin, çalkalama ve havalandırma sonucunda indirgendiği rapor edilmiş ancak daha sonra, çalkalanmış kültürlerin büyüme ve aktivite üzerindeki düşük etkisinin, stasyonere kültürdekinden daha fazla olduğu bulunmuştur. *Mucor racemosus* için statik kültür kullanımı tercih edilmiştir. Ayrıca, *Syncephalotrium racemosum*'un statik kültürde, çalkalamalı kültüre oranla daha yüksek spesifik aktivitede lipaz ürettiği bulunmuştur.

*Rhizopus delemar*'dan lipaz üretimi için sürekli kültür yöntemi kullanılmıştır. Sürekli kültürde lipaz üretimi *Candida lipolytica* için de uygulanmış ve kültür 734 saat boyunca lipaz üretmiştir (Guisseppin, 1984).

Laboratuvar fermentörlerinden daha büyük fermentörler içinde gerçekleşen fermantasyonlarla ilgili raporlar patent korumasında olması nedeniyle çok azdır. *Rhizopus arrhizus* 'la üretim için 100L-fermentör ve 3L-inokulum fermentör kullanılmıştır (Guisseppin, 1984).

*Humicola lanuginosa* için, çalkalamalı kültürde, 30L ve 600L ölçekli fermentör kullanılmıştır. Her iki fermentörün de aynı performansta olduğu ve çalkalamalı yöntemde daha iyi sonuç alındığı belirtilmiştir (Cihangir ve Sarikaya, 2004).

Nielsen (1984), *Fusarium oxysporum*'la, havalandırılmalı-karıştırmalı tanklarda gerçekleşen 2 basamaklı fermantasyonların örneğini ortaya

koymuştur. En geniş skala, 2500L'lik fermentörler içindeki 1400L'lik kültürü içermektedir. Çalkalama şişelerinden, fermentörlerdeki 300L ve 1400 L'lik ortamlara geçmede, ürün oluşumunda herhangi bir kayıp yoktur. (Frost and Moss, 1987)

#### 1.5.4. Fermantasyon Ortamı ve Şartları

Bazı lipaz üreten organizmalar, enzimi ancak indükleyici varlığında üretebilirler. Bu indükleyiciler; trigilserid yağı, uzun zincirli yağ asidi esterleri ya da serbest yağ asitleri olabilirler. Kerosen de *Candida lipolitica*'nın lipaz üretiminde indükleyici olabilir ancak burada en etkili indükleyicinin zeytin yağı olduğu görülmüştür. *Candida cylindracea* tarafından en yüksek oranda lipaz üretiminin gerçekleşmesi için, ortamda sterol ve yağ asidinin ya da türevinin, bir arada bulunması gerektiğı bulunmuştur. Bunun yanında, yağ ya da yağ asidinin varlığı lipaz üretimi için şart değıldir. Ancak bu tür materyallerin eklenmesi, lipaz üretim seviyesini artırır. Bazı küf strainleri için, ortama yağ eklenmesinin lipaz üretimini azalttığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, *Mucor mucedo*, *Byssachlomyes fulva* ve *Geotrichum candidum* için, kompleks nitrojen kaynakları ve şeker bulunan ortama, hayvansal veya bitkisel kökenli yağların eklenmesi sonucunda enzim üretiminin %20-50 oranında azaldığını göstermişlerdir. *G. candidum* hariç, diğer iki tür için ortama tribütirin eklenmesinin lipaz üretimine etki ettiği not edilmiştir. Iwai ve arkadaşları *G. candidum* tarafından lipaz üretimi için mutlaka bir indükleyiciye ihtiyaç olduğunu göstermişlerdir ve bu görüş enzimin yapısal olduğuna dair raporlarla uyuşmamaktadır. Araştırmacılar *G. candidum*'un farklı strainlerinin farklı indüksiyon represyon davranışları gösterdiklerini düşünmüşlerdir.

Çoğu araştırmacı, lipaz üretimi için kullanılan ortamı, yağ içeren bir ortam olarak düşünmüşlerdir. Ancak bunun avantajının olduğuna dair bir kanıt yoktur. Lipid materyali içermeyen ortamlardaki 60 küfün lipaz üretimleri incelendiğinde, bunların içinden *Rhizopus nodosus* strainlerinin yüksek oranda lipaz ürettikleri görülmüştür.

Nutrientlerin tipi ve konsantrasyonlarının, lipaz üretimi üzerindeki etkilerini görmek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Ortamda, genelde karbon kaynağı olarak basit ya da kompleks karbohidratlar bulunur ama mayalar hidrokarbonları da kullanabilirler ve bunlar, bu ortamda ya da yağ içeren ortamlarda daha yüksek lipaz aktivitesi gösterdiği çalışmalar mevcuttur. Lipaz üretiminde, karbon kaynağı olarak kullanılan karbohidratların, doğal yapılarına karşı çok az hassasiyet gösterildiği gözlenmiştir. *Mucor mucedo*, *Humicola lanuginosa*, *Byssochlamys fulva* ve *Geotrichum candidum* basit şekerli ortamlarda büyürler ve ürettikleri lipaz oranı ortamdaki şeker tipine bağlı değildir. Bununla birlikte *Mucor lipolytica* çalkalamalı ortamlarda, monosakkarit, disakkarit, suksinat üzerinde düşük aktivite, gliserol, dekstran, zeytin yağı ve çözülebilir nişasta üzerinde yüksek aktivite göstermişlerdir. Tween 20, orta düzeyde bir indükleyici olarak bulunmuştur. Çözünür nişasta ile elde edilen verimin %11'i kadar verim elde edilmiştir. Bu ortamlar aynı zamanda soya da içermektedir. *Mucor racemosus*, ortamda karbon kaynağı olarak glukoz varlığında hem biokütle olarak hem de lipaz üretimi açısından yüksek verim göstermiştir. Diğer 8 şekerin varlığında ise glukozu göre %55-85'lik lipaz aktivitesi elde edilmiştir.

Bununla beraber, diğer bazı şekerlerin kullanımı, düşük biyokütle verimi sağlamıştır, dolayısıyla biyokütle fonksiyonu olarak lipaz üretimi,

glukozla daha yüksektir. *Aspergillus niger*'in çalkalamalı fermantasyonlarda, sükröz varlığında, glukoz veya diğer bazı basit şekerlere oranla, lipaz veriminin 2 kattan fazla arttığı bulunmuştur. Tüm bu maddeler, küflerin daha iyi büyümesini sağlarlar. Bazı şekerler ve karboksilik asitler ise daha yavaş büyümeyi sağlarlar ve lipaz üretimi bu ortamlarda görülmez veya çok azalır.

*Rhizopus delemar*'ın lipaz üretimi için, pepton-glukoz-tuzlu ortamda, optimum nitrojen/karbon oranı bulunmuştur. Düşük pepton glukoz oranlarında, yüksek proteaz aktivitesi elde edilmiştir. Bu nedenle ortamdaki optimum pepton miktarı lipaz üzerine etki eden proteaz ile kontrol edilmektedir.

*Mucor lipolytica* kullanılan nitrojen kaynağına karşı yüksek spesifikite gösterir. Soya, diğer kompleks nitrojen kaynaklarına oranla daha yüksek aktivite vermektedir. Aynı zamanda amonyum sülfat da diğer amonyum tuzları, üre ve sodyum nitrata zıt olarak yüksek verim sağlamaktadır. Ayrıca ortama kükürt kaynağının ilavesinin de gerekli olduğu tespit edilmiştir ve sodyum sülfat ve amonyum klorid karışımlarının, amonyum sülfat ile benzer etki yaptıkları görülmüştür.

*Humicola lanuginosa* mısır ıslatma sıvısı (MIS) bulunan ortamda, nitrojen kaynağı olarak soya ve peptonun olduğu ortama göre daha yüksek oranda lipaz üretimi gösterir; ancak pepton da mısır ıslatma sıvısı gibi iyi büyümeyi sağlar. Araştırmacılar aynı zamanda lipaz üretiminin antifoam yağları ile de uyarıldığını göstermişlerdir. Ayrıca, *Aspergillus niger*'in lipaz verimini, nitrojen kaynağının da çok fazla etkilediğini ve nitratin en iyi sonucu verdiğini bulmuşlardır. Pepton ve tripton ise iyi sonuçlar vermemiştir.

Test edilmiş bütün tuzlar ve asparaginin, üre ve peptonun, biomass üretimini değiştirmedeği ancak lipaz aktivitesini 7 kat arttırdığı gözlenmiştir. Tripton, aspartik asit ve glutamik asit orta derecede lipaz verimi sağlarken, yalnızca 6g/L biomass eldesini sağlar. *Rhizopus nodosus*, kompleks nitrojen kaynağının bulunduğu ortamda büyütüldüğünde, üre ya da inorganik nitrojenli ortama oranla daha yüksek lipaz aktivitesi gösterir. Eklenen materyallerin verim sıralaması şu şekildedir: Pepton > kazeiton > yeast extract > mısır ıslatma sıvısı > buğday kepeği. Eklenen maddelerin oranı, optimize edilmemiştir. *Mucor mucedo*, *Byssochlamys fulva* ve *Geotrichum candidum*'un nitrat ve amonyum iyonunu içeren pek çok kompleks nitrojen kaynağı ve inorganik nitrojen kaynağı varlığında çok az farklı davranış gösterdikleri görülmüştür. Ancak *Mucor mucedo*'nun ortamda üre varken az verim gösterdiği ve *M. mucedo* ve *Geotrichum candidum* için ortama pepton konulduğunda, diğer kaynaklara oranla %25 daha fazla aktivite gösterdikleri görülmüştür. *Mucor racemosus* da peptonlu ortamda en iyi lipaz aktivitesi gösterir ama mısır ıslatma sıvısı ve diğer 3 kaynaktan hemen hemen pepton etkisine yakın etki göstermektedir. *Rhizopus nigricans* ise diğerlerine göre farklı sonuçlar vermektedir. Ortama pepton konduğunda, buğday kepeğine oranla daha yüksek verim görülür ama yeast extract, kaziton, mısır ıslatma sıvısına oranla daha düşük verim görülür.

Iwai ve Tsujisaka (1984), küf lipaz eldesi için fermantasyon ortamında, diğer enzimlerin elde edilişindeki fermantasyon ortamına oranla, daha fazla nitrojen konsantrasyonuna ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir.

*Bacillus stearothermophilus*'un 9 çeşit nitrojen içeren tuzların bulunduğu ortamda veya 4 organik nitrojen kaynağı içeren ortamda büyütüldüğünde lipaz üretme kapasitesinde olduğu ancak farklı oranlarda

verim gösterdikleri bulunmuştur. Amonyum asetat test edilen en iyi tuzlardandır; soya da ona benzer sonuçlar verir ve o da test edilen organik kaynakların en iyisidir.

Lipaz üretilen fermantasyonlarda gereksinim duyulan diğer nutrientler bulunmamıştır. Araştırmacılar gerekli ortamları, C ve N kaynağına ek olarak nutrient olarak kullanılan bazı tuzları içeren ortamlar olarak açıklamışlardır. Ortamların çoğu yeast ekstrakt ve mısır ıslatma sıvısı gibi doğal nutrientler içermesine rağmen, bunlar bazen gerekli olmayabildiği de tespit edilmiştir.

Çalkalamalı kültür veya fermantörlerdeki işlemlerde pH şartları kontrol edilmez ve son pH değeri nadiren kaydedilir. Başlangıç pH'sının fonksiyonuna bağlı olan verimler, sık sık rapor edilir.

*Aspergillus niger*'den lipaz üretiminde pH'nın etkileri araştırılmıştır. Maksimum lipaz ve biomass pH 7'de oluşmuş ancak pH 4'te her bir kg biyomasstan elde edilen lipaz aktivitesi pH 7'ye göre daha yüksektir.

Mezofilik organizmalarla yapılan lipaz fermantasyonlarının çoğunda büyüme ısısı genelde 30°C'de test edilir ve ısı çoğunlukla 25-37°C arasındadır. Büyüme ısısının optimizasyonu ile ilgili birkaç rapor hazırlanmıştır. Pol ve ark. (1978), *Aspergillus niger* için, optimum büyüme ısısının 35°C olduğunu bulmuştur. Nielsen (1984), *Fusarium oxysporum* için optimum ısısının 34°C olduğunu bulmuş. Chander ve arkadaşları (1979) 20-30-37°C'de 6 küf türünün lipaz üretimini karşılaştırmışlardır. Sonuçların tümünün 30°C'de 20 ve 37°C'ye göre daha iyi olduğu ancak sadece *Penicillium funiculosum*'un 20°C'de daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. (Frost and Moss, 1987).

20, 30 ve 37°C’de lipaz üretimi için kullanılan küf türleri :*Rhizopus nigricans*, *Penicillium funiculosum*, *Mucor mucedo*, *Byssoschlamys fulva*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Syncephalastrum racemosum*’ dir.

**Çizelge 1.2.** *Aspergillus niger*’den elde edilen lipaz için ortam şartları (Frost ve Moss 1987)

<b>Ortam</b>	
Amonyum nitrat	1,0 g- L <sup>-1</sup>
Potasyum dihidrojen fosfat	2,0 g-L <sup>-1</sup>
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,4 g-L <sup>-1</sup>
Ferröz sülfat heptahidrat	0,1 g-L <sup>-1</sup>
Sükroz	0,1 g-L <sup>-1</sup>
Zeytin yağı	10 g-L <sup>-1</sup>
<b>Ortam Şartları</b>	
Sıcaklık	35 °C
Süre	96 saat
Başlangıç pH’sı	7,0

**Çizelge 1.3.** *Rhizopus arrhizus*’dan lipaz üretimi için ortam şartları

<b>Çalkalamalı kültür (150 mL ortamda 50 mL) : 18-24 saat 30 °C</b>	
$\alpha$ -Amilaz’lı nişasta	40,0 g- L <sup>-1</sup>
Mısır ıslatma sıvısı	50,0 g- L <sup>-1</sup>
Amonyum sülfat	10,0 g- L <sup>-1</sup>
Kalsiyum karbonat	15,0 g- L <sup>-1</sup>
<b>İlk fermentör basamağı (3L) : 22-26 saat, 29°C</b>	
$\alpha$ -Amilaz’lı nişasta	20,0 g- L <sup>-1</sup>
Kazein hidrolizat	5,5 g- L <sup>-1</sup>
Amonyum sülfat	5,0 g- L <sup>-1</sup>
Kalsiyum karbonat	10,0 g- L <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile başlangıç pH’sı 7,0’a ayarlanmıştır	
Köpük kırıcı : Rhodorsil 426 R	
<b>Esas fermentasyon (100 L)</b>	
Ortam şartları 3 L basamağındaki gibi, 40-45 saat devam eden enzim titrasyonu. pH yavaşça 6.5 civarına düşürülür.	

## 1.6. Streptomyces Genusu

*Streptomyces* genusu, aerobik, gram pozitif bakterilerdir. Üreme, havasal hiplerde bulunan hareketsiz sporların çimlenmesi ile sağlanır. *Streptomyces* kolonileri başlangıçta düzgündür fakat sonra pamuğumsu, granüler, tozumsu veya kadifemsi görünüşte olan havasal hipler oluşur. Üretilen pigmentlerin çeşitliliği vejetatif ve havasal miselin renginden sorumludur. Renkli yayılabilen pigmentler de oluşturulabilir. Çoğu strain optimum 25-35°C'de ve pH 6,5-8 arasında iyi gelişirler. Bazı strainler psikrofilik ve termofilik bölgelerde gelişebilirken diğerlerinin asit veya alkali pH'a ihtiyacı vardır.

Çoğu *Streptomyces* kemoorganotroftir. Bunlar oksitativ tip metabolizmaya sahiptirler. Tek karbon ve enerji kaynağı olarak organik bileşikleri kullanırlar. Bazı termofilik strainler obligat kemolitotroftur. Hidrojeni oksitler ve kompleks ortamlar ile hetotrofik substratlar üzerinde büyüyemezler. Ayrıca bazı termofilik strainler karbonmonoksit veya metanol üzerinde büyüyebilirler.

*Streptomyces* büyük oranda LL-diaminopimelik asit içeren peptidoglikan hücre duvarına sahiptir ve hücre duvarları A3γ tipindedir. Ayrıca hücre duvarlarında n-asetillenmiş formda muramik asit içerirler. Çoğu suş büyük oranda doymuş, izo- ve antiizo- yağ asitlerine sahiptirler. Ancak mikolik asit içermezler.

*Streptomyces* türleri; aerobik, gram pozitif bakterilerdir. *Streptomyces* üyeleri özellikle toprakta geniş bir dağılıma sahip olması, morfolojileri ve sahip oldukları uzun tarihleri ile *Actinomycetales* ordosunun

en iyi tanımlanan grubudur. Bunun yanında bu genus, antibiyotik ve diğer ikincil metabolitlerin en önemli üreticilerinin büyük bir kısmını barındırmaktadır (Korn-Wendish and Kutzner 1992).

*Streptomyces* üyelerinin diğer bakterilerden ayırt edilmesinde onların bazı özellikleri öne çıkmaktadır. *Streptomyces* ve *Streptomycetaceae* ailesinin diğer genuslarının peptidoglikanlarında (Hücre duvarı Tip 1) LL-diaminopimelik asit (LL-A<sub>2</sub>pm) bulunduğunu göstermiştir. Oysaki şimdiye kadar tanımlanan diğer *Actinomycetes* türlerinde meso-A<sub>2</sub>pm bulunmaktadır. *Streptomycetaceae* ailesinin tanımlanmasında en iyi kimyasal kriter olarak LL-A<sub>2</sub>pm'nin tespiti gösterilse de *Actinomycetales* arasında LL-A<sub>2</sub>pm içeren diğer bazı genuslar da bulunmaktadır. Bunlar; *Arachnia*, *Pimelobacter*, *Sporichthya*, *Kineosporia*, *Nocardioides*, *Kitasatosporia* ve *Intrasporangium* genuslarıdır.

Genel olarak günümüzde *Streptomycetaceae* ailesinin üyeleri başlıca peptidoglikan yapısı ile ayırt edilmektedir, fakat bu ayırım sadece yukarıda belirtilen LL-A<sub>2</sub>pm ile sınırlandırılmamalıdır. Aynı zamanda peptidoglikan yapısını oluşturan diğer özelliklerde göz önünde bulundurulmalıdır. Tip A3 $\gamma$ , glisin artığından oluşan bir interpeptid köprüsü içermektedir. Çizelge 1.4'de görüldüğü gibi *Streptomycetaceae* üyeleri aynı zamanda çeşitli diğer biyokimyasal kriterler açısından oldukça homojen bir gruptur. Ayırımda kullanılan bu özellikler; tüm hücre hidrolizatlarındaki şeker örnekleri, fosfolipitler yağ asitleri, menaquinonlar ve asetillenmiş muramik asit artıklarıdır.

**Çizelge 1.4.** Havasal miselyumda bulunan *Streptomyces* ve bazı *Actinomycete* genuslarına ait anahtar biyokimyasal özellikler (Korn-Wendish and Kutzner 1992):

Familya ve genus	Diaminopimelik acid (A <sub>2</sub> pm)	IPB'deki Glisin	Peptidoglikan	Şeker Tipi	Fosfolipid tipi	Mikolik asit	Yağ asitleri	GC oranı
<i>Streptomycetaceae</i>								
<i>Streptomyces</i>	LL	+	A3 $\gamma$	-	PII	-	2c	69-78
<i>Streptoverticillium</i>	LL	+	A3 $\gamma$	-	PII	-	2c	69-73
<i>Pseudonocardia</i> ceae								
<i>Amycolata</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	A	PIII	-	3e	71-75
<i>Amycolatopsis</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	A	PII	-	3f	66-69
<i>Kibdelosporangium</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	A	PII	-	3f	66
<i>Pseudonocardia</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	A	PIII	-	2f	79
<i>Saccharopolyspora</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	A	PIII	-	2c/3e	70-72
<i>Saccharomonospora</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	A	PII	-	2a	69-74
<i>Actinopolyspora</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	A	PIII	-	2c	64
Kesin grubu olmayan genuslar								
<i>Sporichthya</i>	LL	+	A3 $\gamma$	-	ND	-	3a	ND
<i>Kineosporia</i>	LL/Meso	+	ND	C	PIII	-	1	69
<i>Nocardioides</i>	LL	+	A13 $\gamma$	-	PI	-	3c	66-73
<i>Actinomadura</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	B	PI	-	3a	66-72
<i>Microtetraspora</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	B	PIV	-	3c	66-69
<i>Glycomyces</i>	Meso	+	ND	D	PI	-	2c	71-73
<i>Kitasatosporia</i>	LL/Meso	+	ND	C	PII	-	2c	66-73
<i>Saccharothrix</i>	Meso	-	ND	C/E	PII	-	3f	70-76
<i>Nocardia</i>	Meso	-	A1 $\gamma$	A	PII	+	1b	64-72
<i>Nocardioopsis</i>	Meso	-	ND	C	PIII	-	3d	64-69
<i>Streptoalloteichus</i>	Meso	-	ND	C	PII	-	ND	ND

IPB: İnterpeptid köprüleri

Şeker tipi sembolleri: A; arabinoz ve galaktoz, B; maduroz, C; tanılayıcı şeker tipi yok, D; arabinoz ve ksiloz, E; ramnoz ve galaktoz, -; LL-A<sub>2</sub>pm için uygun değildir.

Fosfolipid tipi: PI; fosfatidilgliserol, PII; sadece fosfatidiletanolamin, PIII; fosfatidilkolin, PIV; glukozamin içeren fosfolipidler

Ayrıca *Streptomyces* türlerinin sahip oldukları yüksek GC içeriği (% mol 69-78) ayırt edilmelerinde önem kazanmaktadır ve eubakteri aleminin % GC oranı en yüksek filogenetik kolunda yer alırlar (Kroppenstedt et al., 1981).

Ayrıca karakterizasyonda morfolojik özelliklerde önem kazanmaktadır. Genel olarak havasal miselyumun morfolojik şekli, vejetatif miselyumkine göre daha önemli kabul edilmektedir. Bu özellikler arasında; dallanma şekli, spor zincirinin biçimi (düz, spiral veya kıvrımlı olması gibi) ve spor yüzeyi (düz, yumrulu, dikenli veya tüylü olması gibi) sıralanabilir. *Streptomyces* grubundaki spor zincirleri, yukarıda listelenen çeşitli yüzey yapılarının oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen lifli kılıf tarafından çevrelenir. Sporlar tek başına fungal spora benzedikleri için konidia ya da arthrospor olarak adlandırılırlar.

**Çizelge 1.5.** *Streptomyceteaceae* üyeleri ile diğer bazı *Aktinomyces*'lerin morfolojik kriterleri (Williams ve ark 1989)

Aile ve genusları	Substrat miselyum tipi				Vertisil	Havasal miselyum tipi				Sporangia benzeri keseler
	Çubuk kokkoid elementlerin dağılımı	Spor zincir-leri	Sporangia benzeri keseler	Sporların zincir uzunluğu <sup>a</sup>		Spor yüzey tipi				
					Düz	Yumrulu	Dikenli	Tüylü		
<i>Streptomyceteaceae</i>										
<i>Streptomyces</i>	-	v	-	+	(+) <sup>b</sup>	+	+	+	+	-
<i>Streptomyces (Elytro)</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Streptomyces (Kitasatoa)</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Streptomyces (Microellob)</i>	-	+	+	(+)	-	+	-	-	-	+
<i>Streptoverticillium</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudonocardiaaceae</i>										
<i>Amycolata</i>	v	-	-	v	-	+	-	-	-	-
<i>Amycolatopsis</i>	v	-	-	v	-	+	d	-	-	-
<i>Kibdelosporangium</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Pseudonocardia</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Saccharopolyspora</i>	v	v	-	v	-	+	-	+	+	-
<i>Saccharomonospora</i>	-	Tek	-	(+)	-	+	+	-	-	-
<i>Actinopolyspora</i>	Nadir	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Üyeliği kesin olmayan türler</i>										
<i>Sporichthya</i>	Substrat miselyumu yok			- <sup>c</sup>	-	BY	BY	BY	BY	-
<i>Kineosporia</i>	+	-	+ <sup>c</sup>			Havasal miselyumu yok				
<i>Nocardioides</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Actinomadura</i>	-	v	-	v	(+) <sup>b</sup>	+	+	+	-	(+)
<i>Microtetraspera</i>	-	-	-	(+)	-	+	+	-	-	-
<i>Glycomyces</i>	-	-	-	(+)	-	BY	BY	BY	BY	-
<i>Kitasatosporia</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Saccharothrix</i>	+	-	-	+	-	BY	BY	BY	BY	-
<i>Nocardia</i>	+	v	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Nocardioopsis</i>	v	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Streptoalloteichus</i>	-	-	+ <sup>c</sup>	+	-	+	-	-	-	-

+ : var, - : yok, v : bazı türler pozitif, d : şüpheli, BY : bilgi yok a için; (+) : kısa zincirler, v : bazı türler pozitif b : bazı türlerde Pseudovertisiller bulunmaktadır.

c : hareketli spor (*Sporichthya*'da 1-3 flagel, *Kineosporia*'da demet halinde flagel, *Streptoalloteichus*'ta tek polat flagel bulunmaktadır.)

*Streptomyces* üyeleri zor gelişen türler değildir, onların üremeleri için bir inorganik azot kaynağı yeterlidir. Vitamin ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duymazlar. *Streptomyces*'ler toprağın misel büyümesini destekleyecek yüzeylerinde bulunurlar. Büyüme döngüleri (spor→ miselyum→ spor) ile hava ve mevsime bağlı olarak kısa sürede değişebilen nem ve havalandırma gibi habitatın fiziksel koşullarına adapte olabilirler. *Streptomyces*'ler bakteriyal endosporlar kadar olmasa da onların uzun süren kuraklık, donma, hidrostatik basınç ve su doygunluğu sonucu oluşan anaerobik koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olan sporlar (arthrospor, konidia) oluştururlar.

Türlerinin ekolojilerine bakıldığında *Streptomycetaceae* ailesi üyeleri her yerde bulunabilir ve üyelerinin büyümeleri ve çoğalmaları için en uygun koşulların bulunduğu doğal habitatları ise topraktır. Toprakta yaygın olarak bulunmasının nedenlerine bakıldığında aşağıda sıralanan özellikleri ile diğer mikroorganizmalara ile yarışta başarıya ulaşırlar. Bu özellikler; *Streptomyces* üyeleri aromatik bileşiklerin yanında dayanıklı ve kompleks hayvan ve bitki atıkları olan polisakkaritleri (nişasta, pektin, kitin gibi), proteinleri (keratin, elastin gibi) ve hatta lignoselülozları parçalayabilmeleridir.

*Streptomyces*'ler için toprak en önemli habitatıdır. En az orman toprağında bulunmaktadırlar. Organik maddelerce zengin toprakta mineral gübreli ya da hiç olmayan topraklara göre daha fazla bulunurlar. Macaristan topraklarının alkali ve yüksek tuz koşullarına adapte olan bir flora gözlenmiştir. *Streptomyces*'lerin sayısı mevsim ve iklim koşullarından etkilenir. *S. malachiticus* tropikal ve subtropikal iklim bölgelerinde bulunmuştur. Toprak dışında, toprak tarafından kontamine olmuş daha

birçok yerde de *Streptomyces*'ler bulunabilir. Bunların arasında; yem ve diğer organik materyaller en önemlileridir. Mezofilik ve özellikle termofilik *Streptomyces* türleri saman, hayvan yemi, tohum, odun gibi doğal substratları ve pamuk, tekstil, dokuma, kağıt, kauçuk ve plastik gibi biyodegrade sentetik ürünleri kullanabilirler. Bu ürünlerdeki aktiviteleri ve sayıları depolama koşulları ve toz ya da toprak tarafından kontaminasyon derecesine bağlıdır. İçilebilir tatlı su sistemleri kadar ve denizsel ortamlara adapte olduklarında gelişebilirler fakat onlar bu habitatların asıl mikroflorasına ait değildirler. Aynı zamanda içme suyu kaynakları *Streptomyces*'lerle kontamine olabilir ve bazıları suyun bozulmasına yol açan kokular üretirler.

Üyelerin sıcaklık ihtiyaçları incelendiğinde çoğu türün 28-55 °C aralığında geliştiği bulunmuştur ve hatta daha yüksek sıcaklıklarda büyüeyebilen türler de vardır. Aşağıdaki tabloda *Streptomyces* türleri ve onların büyüme sıcaklıkları verilmiştir.

**Çizelge 1.6.** Bazı *Streptomyces* türlerinin büyüme sıcaklık aralığı (Korn-Wendish and Kutzner 1992)

Türler	Strain no	27/28	37/40	45	50	55	60	65
<i>S. albus</i>	DSM 40313	+	+	+	+	(+)	-	-
<i>S. eurythermus</i>	DSM 40014	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. griseoflavus</i>	A77	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. macrosporus</i>	DSM 41449	+	+	+	BY	BY	BY	BY
<i>S. megasporus</i>	DSM 41450	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. species</i>	P 46 + P 107	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. thermodiastaticus</i>	DSM 40573	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. thermoflavus</i>	DSM 40574	+	+	+	+	+	(+)	-
<i>S. thermofuscus</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>S. thermolineatus</i>	DSM 41451	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. therronitrificans</i>	DSM 40579	-	+	+	+	-	-	-
<i>S. thermophilus</i>		+	+	+	+	+	+	+
<i>S. rectus</i>	A 11	+	+	+	+	+	(+)	-
		(+)	+	+	+	(+)	-	-
<i>S. thermoviolaceus</i> <i>subsp.</i> <i>thermoviolaceus</i>	DSM 40443	+	+	+	+	+	(+)	-
		-	+	+	+	(+)	-	-
		(+)	+	+	+	+	(+)	-
<i>S. thermoviolaceus</i> <i>subsp. apingens</i>	DSM 41392	(+)	+	+	+	+	(+)	-
<i>S. thermovulgaris</i>	DSM 40444 R 10	(+)	+	+	+	+	+	-
		(+)	+	+	+	+	(+)	-
<i>S. violaceoruber</i>		(+)	+	+	+	(+)	-	-
		-	+	+	+	+	-	-

+: iyi büyüme, (+): zayıf büyüme, -: büyüme yok, BY: Bilgi yok

Saf kültürdeki toprak izolatlarının pH ihtiyaçlarına bakıldığında nötr ve alkali pH tercih ettikleri görülmüştür. Bazı çalışmalarda düşük sayıda asidik toprakta yaşayan *Streptomyces* üyesi rapor etmişlerdir. Bunun nedeni izolasyon ve sayım işlemlerinde nötr ortamları kullanmalarındır. Diğer yandan, çok az sayıda alkalofilik (asit-duyarlı *Actinomyces*) straini de izole edilmiştir.

Bitki dokularını enfekte edebilen ve hastalığa yol açan sadece birkaç *Streptomyces* vardır. Patates (*Solanum tuberosum*) ve şeker pancarı (*Beta vulgaris* subsp. *esculanta*) lezyonların oluşmasıyla patojenlerle reaksiyona girerek en fazla enfekte olan kültür bitkileridir.

Hayvanlar için patojenik *Streptomyces* türleri ile ilgili birkaç rapor bulunmaktadır. Kediden (Lewis et al., 1972) ve iri burun yunusundan (Jasmin et al., 1972) izole edilen strainler daha sonra *S. griseus* olarak tanılanmıştır (Mishra et al., 1980). Tıbbi literatürde insanlar için kesin patojen olarak sadece *S. somaliensis* gösterilmiştir.

Diğer yandan Mishra ve arkadaşları (1980) bitkisel kaynaklardan ve insanlardan 600'den fazla izolat bulmuş ve bunlardan 110 tanesinin *Streptomyces* olarak tanılanmıştır. Bunlar içinde en fazla *S. griseus* saptanmış ve ayrıca *S. albus*, *S. rimosus*, *S. lavendulae* ve *S. somaliensis* türleri de tespit edilmiştir.

### 1.6.1. *Streptomyces* izolasyonu

Havada kurutulmuş toprak örnekleri CaCO<sub>3</sub> ile 10:1 w/w oranında karıştırılır ve nemli atmosferde 7-9 gün 26 °C'de inkübe edilir. Bu yöntem, uygulamanın yapılmadığı örnek ile karşılaştırıldığında izolasyon yüzeyinde *Streptomyces* kolonilerinin 100 kat artışını sağlamaktadır. Ayrıca bu yöntem ile fungal floranın azalmasını sağlanmaktadır.

Toprağa kitin eklenmesi, *Actinomyces* üyeleri üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptir ve bazı bitki patojeni fungusların gelişmesini baskılamaktadır. Toprağa ısı uygulaması (40-50 °C'de 2-16 saat) *Streptomyces* koloni sayısını etkilemezken bakteri florasını azalttığı

gösterilmiştir. Nemli bir ortamda inkübasyonu gerçekleştirmek *Streptomyces* sayısında 1000 kat gibi çok önemli bir artış sağlamaktadır. Bir toprak süspansiyonuna fenol uygulamasının (10 dakika için %1,4) *Streptomyces* türleri üzerinde zararlı etki oluşturmaksızın bakteri ve fungusların azalttığı, *Streptomyces* izolasyon şansını arttırdığı bulunmuştur.

Aşağıdaki tabloda verilen karbon ve azot kaynakları ile kullanılan ajanlar *Streptomyces*'lerin daha iyi gelişmesi için uygundur. Ayrıca bu şekilde hazırlanan ortamlar bakteri ve fungusların büyümesini engellemekte ya da büyümelerini yavaşlatmaktadır.

**Çizelge 1.7.** *Streptomyces* izolasyonu ve kültürasyonunda kullanılan karbon ve azot kaynakları

C ve N Kaynağı	Ortamdaki seçici ajanlar	
	Antibiyotik	Diğerleri
Kitin		
Nişasta, KNO <sub>3</sub>		
Nişasta, Kazein, KNO <sub>3</sub>		
Gliserol, Kazein, KNO <sub>3</sub>		
Gliserol, Arginin		
Rafinoz, Histidin		
Nişasta, Kazein, KNO <sub>3</sub>	Rifampisin	
Nişasta, Kazein, KNO <sub>3</sub>	Sikloheksimid, nistatin, penisilin, polimiksin	
Gliserol, Arginin	Sikloheksimid, pimarisin, nistatin	
Dekstroz, Arginin	Sikloheksimid	
Asparagin		Propionat
Nişasta, Kazein, KNO <sub>3</sub>	Sikloheksimid	Rose bengal

### 1.6.2. İzolasyon için pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi

Çoğu *Streptomyces* nötrofiliktir ve izolasyon ortamı pH 7,0 ile 7,5 olarak ayarlanır. Zıt olarak asidofilik strainler için pH 4,5 (Khan and

Williams, 1975) ve alkalofilik strainler için ise pH 10-11 (Mikami et al., 1982) olarak ayarlanmalıdır.

İnkübasyon sıcaklığı açısından deniz strainleri 15-20 °C'de büyütülür. Toprak *Streptomyces* türleri mezofiliktir ve ortamlar genellikle 22-37 °C'de (çoğunlukla 28 °C) bırakılmalıdır. Termotolerant ve termofilik strainler sırasıyla 40-45 ve 50-55 °C'de gelişirler. İzolasyon petrileri üzerinde termofilik grupların gelişmesi için 2-5 güne, mezofilik gruplar için 7-14 gün ve deniz ve diğer psikrofilik strainler için ise 10 haftanın üzerinde süre gerekmektedir.

### 1.6.3. Kültivasyon

*Streptomyces* türleri kemoorganotrofik, gelişmesi kolay olan organizmalardır. Bu nedenle büyümeleri için sadece bir karbon kaynağına (nişasta, glikoz, gliserol, laktat), organik veya inorganik azot kaynağına (kazein, yeast ekstrakt,  $\text{NH}_4^+$  veya  $\text{NO}_3^-$ ) ve bazı mineral tuzlara ihtiyaç duyarlar. Bilindiği üzere vitaminlere ya da büyüme faktörlerine gereksinim duymazlar. Böylelikle çok sayıda basit sentetik ortamlar kültürasyonları için uygundur. Ancak daha hızlı büyüme istendiğinde genellikle yulaf ezmesi, malt ve/veya yeast ekstrakt içeren kompleks ortamlar kullanılmalıdır.

### 1.6.4. Oksijen Gereksinimi

*Streptomyces*'ler obligat aerobik mikroorganizmalardır. Yarı katı besiyerinde agar sütununun yüzeyinde büyürler. Fakat fakir veya karbon kaynağı içermeyen yarı katı ortamlarda ise mikroaerofilik olarak gelişirler.

Sabit sıvı kültürde yüzeyde zar oluşturarak gelişirler ve ortam tamamen temiz olarak kalır.

*Streptomyces* üyelerinin havasal miselyumu sıklıkla hidrofobik olduğu için deterjanların eklenmesi daha fazla homojenik spor süspansiyonunun elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Örnek olarak Triton X/100, %0,001; Tween 80, %0,1; Sodyum lauril sülfat, %0,01; Carbowax 400, %0,05-0,1 verilebilir.

### **1.6.5. *Streptomyces* Türlerinin Karakterizasyonu**

Bilinmeyen *Streptomyces* izolatlarının karakterizasyonu için biyokimyası, makroskobik görünümü, morfolojisi, fizyolojisi, faj duyarlılığı, enzim ve protein örnekleri, serolojisi ve moleküler genetiği kullanılmaktadır.

#### **1.6.5.1. Biyokimyasal kriterler**

Biyokimyasal özellikler *Actinomycetales* ordosunun diğer genuslarından *Streptomycetaceae* ailesinin ayrılması için kullanılmaktadır. Bu özellikler;

- 1) LL-A<sub>2</sub>pm
- 2) Şekerlerin karakteristik özelliklerini içermemeleri.
- 3) Fosfatidiletanolamine sahip tip II fosfolipid
- 4) Mikolik asidin bulunmaması
- 5) Yüksek miktarda iso- ve anteiso- dallanması gösteren yağ asitlerinin tipik spektrumu

#### 6) Menaquinonların tipik özelliği

#### 1.6.5.2. Makroskobik özellikler

Makroskobik özellikler olarak ortam içine difüzlenen havasal ve substrat miselyumu ile pigmentlerin renkleri önem kazanmaktadır. Bunlar içersinde en önemli olarak havasal miselyumun rengi öne çıkmaktadır. Havasal miselyumlar için sarı, menekşe, kırmızı, mavi, gri ve beyaz renkleri tespit edilmiştir (Williams et al., 1989). Ayrıca havasal miselyumun yoğunluğu ve de koloni morfolojisi diğer incelenen makroskobik özelliklerdir.

#### 1.6.5.3. Mikroskobik özellikler

*Streptomyces* yaşam döngüsü mikroskobik karakterizasyon için 3 belirleyici özellik göstermektedir.

- 1) Vejetatif miselyum (katı ve sıvı ortamlarda)
- 2) Spor zincirlerini (arthrosporlar ve konidiasporlar) içeren havasal miselyum
- 3) Arthrosporlar

Taksonomistler için yaşam döngüsünün ilk safhası yararlı bulunmamıştır. İkinci ve özellikle üçüncü safha diagnostik kriterler için önem kazanmaktadır.

Havasal miselyum için hiflerin uzunluğu (kısa, orta ve uzun), dallanma şekilleri (monopodial, simpodial), sporogenous hiflerinin

düzenlenişi (vertisil) ve bunların morfolojisi (düz, bükümlü, spiral gibi) önemlidir. Arthrosporların elektron mikroskobu incelemelerinde ise düz, siğilli, tüylü ve dikenli olmak üzere 4 farklı tip tespit edilmiştir (Flaig ve Kutzner, 1960).

#### 1.6.5.4. Fizyolojik testler

Eski çalışmalarda *Streptomyces* için kullanılan çok sayıdaki fizyolojik test günümüzde güvenilir bulunmamaktadır ve çok az taksonomik değere sahiptir. Bu testler arasında sadece melanin pigmentinin oluşumu ve dokuz karbon kaynağının (genellikle şekerlerin) kullanımı ISP'de (International Streptomyces Project) kullanılmaktadır (Shirling ve Gottlieb, 1966). *Streptomyces* karakterizasyonu için yapılan fizyolojik testlerde “+” ve “-” gibi kesin sonuçlar elde edilememektedir. Genellikle; negatif, zayıf, iz, ılımlı, güçlü ve geç gibi sonuçlar elde edilmektedir ve birçok test uzun sürelere ihtiyaç duymaktadır.

*Streptomyces* tanılanmasında kullanılan bazı fizyolojik özellikler şunlardır; büyüme için sıcaklık ve pH aralığı, melanin oluşumu (chromogenicity), karbonhidrat ve benzer bileşiklerin kullanımı (%1 w/v), organik asitlerin (özellikle okzalit, malonat, sitrat) kullanımı, organik asitlerin oluşumu, azot kaynaklarının kullanımı (%1 w/v), nitrat ve nitrit indirgenmesi, eskulin ve arbutin hidrolizi, DNA ve RNA degradasyonu, Adenin, ksantin, hipoksantin hidrolizi, üre ve allantoin degradasyonu, hippurik asit hidrolizi, kitin hidrolizi, egg yolk (Lesitovitellin reaksiyonu), hemoliz,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine duyarlılık, lizozime duyarlılık, sodyum klorite duyarlılık, inhibitör bileşiklere duyarlılık, antibiyotik aktivitesidir.

## **1.7. Bakterilerin Karakterizasyon Yöntemleri**

### **1.7.1. Morfolojik Yöntemler**

Bakterilerin tanımlanmasında morfolojik özellikler, karakterizasyonun ilk adımı olması açısından oldukça önemlidir. Şekil, çap, kolonilerin yüksekliği ve kenar şekli, pigment oluşturması direk olarak gözlemlenebilmektedir. Bir izolatın hücresel morfoloji, Gram özelliği, spor oluşumu ve hareketlilik farklı boyama yöntemleri ile mikroskopta saptanabilmektedir. Ayrıca faz kontrast mikroskobu spor varlığını ve boyamasız hücre morfolojisinin tespitinde kullanılmaktadır.

### **1.7.2. Fenotipik Yöntemler**

Fenotipik metodlar biyotiplendirme, antibiyogram, serotiplendirme, PAGE/immunoblotting ve multilocus enzim elektroforez (MLEE) yöntemlerini içermektedir.

Biyotiplendirmede bir organizma, farklı biyokimyasal reaktanlar ve parametreler kullanılarak genus ve/veya tür düzeyinde tanımlanıp sınıflandırılabilir.

Antibiyogram, strainin antibiyotik varlığında büyümesinin analizini içermektedir. Ancak yöntem çok fazla ayırt edici değildir ve antibiyogram özellikleri plazmidlerin transformasyonu ile değişebilmektedir (Busch and Nitschko, 1999).

Serotiplendirme, mikroorganizmaların verilmiş bir antiseruma gösterdiği reaksiyonun belirlenmesini içermektedir.

Tüm hücre lizatından sağlanmış proteinler SDS-PAGE ile ayrılabilmekte ve protein tabloları strainlerin sınıflandırılmasında kullanılabilir (Busch and Nitschko, 1999).

### 1.7.3. Genotipik Yöntemler

Genotipik metodlar, kromozomal ve ekstrakromozomal (plazmid) DNA analizlerine dayanmaktadır. Ana avantajları şöyle sıralanabilir;

- \* Yakın suşların ayırt edilebilmesi: Yüksek ayırt edebilme gücü
- \* Tüm suşlar, bakteriden DNA ekstrakte edebildiğin sürece tiplendirilebilir.
- \* Analitik stratejiler bakteriden DNA ekstrakte edebildiğin sürece uygulanabilir.
- \* DNA düzenlenişi, kültür koşullarından ve preparat hazırlama metodlarından bağımsızdır.
- \* Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edilebilir (Farber, 1996).

Genotipik yöntemler; plazmid tiplendirmesi, ribotyping, polimeraz zincir reaksiyonlarına (PCR) dayanan yöntemler, nükleotid sekansı, DNA-DNA hibridizasyonu yöntemlerini içermektedir.

### **1.7.3.1. Plazmid Tiplendirme**

Plazmidler; kendisini replike edebilen, ekstrakromozal, süperkoil genetik materyallerdir (Bush and Nitschko,1999; Farber,1996). Plazmidler genellikle hücrenin fenotipini değiştiren ürünleri ve/veya fonksiyonları kodlamaktadır.

Plazmid tiplendirmesinde, bakterial suşlardan plazmid izole edilir ve daha sonra sayı ve moleküler büyüklükleri jel elektroforezi ile saptanır. Ancak farklı plazmidler aynı büyüklükte olabilmektedir. Restriksiyon enzimlerinin kullanımı ile bu sorun çözülebilmektedir. Farklı plazmidler enzim uygulamasından sonra farklı fragment tabloları oluşturacaktır (Farber, 1996). Bu yöntemin dezavantajı ise türler ve suşlar arasındaki plazmid transferidir.

### **1.7.3.2. Kromozal DNA Restriksiyon Endonükleaz Analizi**

Bu yöntemde, DNA sık olarak kesen bir restriksiyon enzimi ile kesilmekte ve fragmentler jelde yürütülmektedir. İzolatlar arasında görülen fragment tablolarındaki farklılıklar, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizminde (RFUP) gösterilmektedir. Farklı tablolar DNA kompozisyonundaki varyasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu yöntem, hızlı, pahalı olmayan, nispeten kolay ve uluslararası uygulanabilirliği olan bir yöntemdir. Fakat fragment tablolarının yorumlanması, sayısız fragmentin oluşması nedeniyle kolay değildir ve yorumlama agaroz jel üzerinde fragmentlerin ayrılabilmesi ile yakından ilişkilidir. Yorumlanabilir sonuçların elde edilebilmesi için çok sayıda restriksiyon enzimi kullanılması gerekmektedir.

### 1.7.3.3. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme, ribozomal genleri tanınması için düzenlenmiş nükleik asit problemlerinin kullanıldığı bir yöntemdir. Bir prokaryotik ribozomda üç RNA tipi bulunmaktadır (23S, 16S ve 5S rRNA). rRNA'yı kodlayan genler yüksek oranda korunmuş bölgelerdir ve bakterilerin çoğunda rRNA operonlarının birçok kopyası bulunmaktadır. Böylece ribozomal bir geni taşıyan kromozomal fragmentler problemlerle hibridizasyondan sonra belirlenebilmektedir. Sonuçlanan hibridizasyon bantları izolatlar arasında karşılaştırılmaktadır. Ribotiplendirme yöntemi bakterilerin gruplandırılmasında kullanılan bir yöntemdir.

### 1.7.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) Dayalı Yöntemler

PZR, DNA'nın ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi ile amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. Spesifik primerlerin kullanılmasına bağlı olarak istenilen bölge amplifiye edilmektedir. Reaksiyon, yüksek sıcaklıkta DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve termostabil DNA polimeraz ile sentez basamaklarının tekrarlanmasından oluşmaktadır. Amplifikasyon döngüsü 25-40 kez tekrar ile hedef DNA bölgesinin  $10^6$  kattan fazla çoğalmasını sağlamaktadır.

#### 1.7.3.4.1. PZR-Ribotiplendirme

Prokaryotların rRNA'yı kodlayan ribozom genleri, cins ve tür düzeyinde farklı uzunluk ve dizideki olan aralıklı bölgelere ayrılmıştır (Farber,1996). Böylece belirli bir suş için farklı rRNA'ların aralıklı bölgelerinin amplifikasyonundan sonra çeşitli bantlar elde edilmektedir.

Bunun yanında 16S-23S veya 23S-5S rRNA arasındaki aralıklı bölgeler amplifiye edilebilir ve amplifikasyon ürünleri agaroz jelde karşılaştırılabilir. Bu yöntemde universal primerlerin kullanılabilmesi en önemli avantajdır.

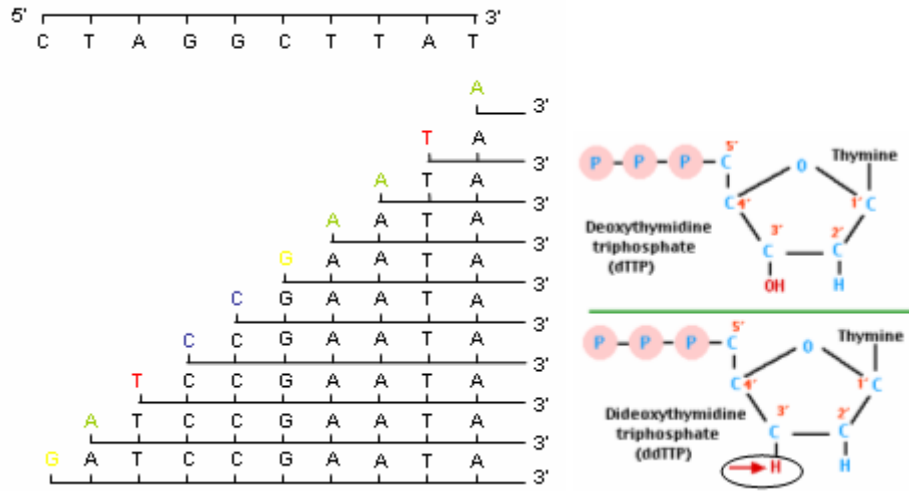
Ribozomal operonlar arasındaki dizi varyasyonu bakterilerin tanılanmasında kullanılmaktadır (Jensen, 1993). Bakteriyal türler arasında ribozomal aralıklı bölgelerinin 16S ve 23S rDNA bölgelerinden daha fazla kararsız olduğu tespit edilmiştir (Barry, 1997). Örneğin oldukça yakın ilişkili *B. subtilis* ve *B. atrophaeus* türleri ribozomal intergenik aralıklı bölgeler ISRs karşılaştırması ile ayırt edilebilmiştir (Nagpal ve arkadaşları, 1998). Flint ve arkadaşları (2001), farklı laktik asit bakteri türleri ve aynı türün suşları arasında bile ISR dizilerinin uzunluklarındaki farklılıkları göstermiştir.

#### **1.7.3.4.2. PZR-16 S rRNA Bölgesinin Dizi Analizi**

Prokaryotlarda türler arasındaki diğer kromozal bölgelerin rRNA'yı kodlayan 16S ve 23S bölgelerine göre daha fazla kararsız olduğu tespit edilmiştir (Barry, 1997). Bu bölgeler cins ve tür düzeyinde farklılıklar göstermekte ve korunmuş bölgeler oldukları için prokaryotların tanılanmalarında kullanılmaktadır.

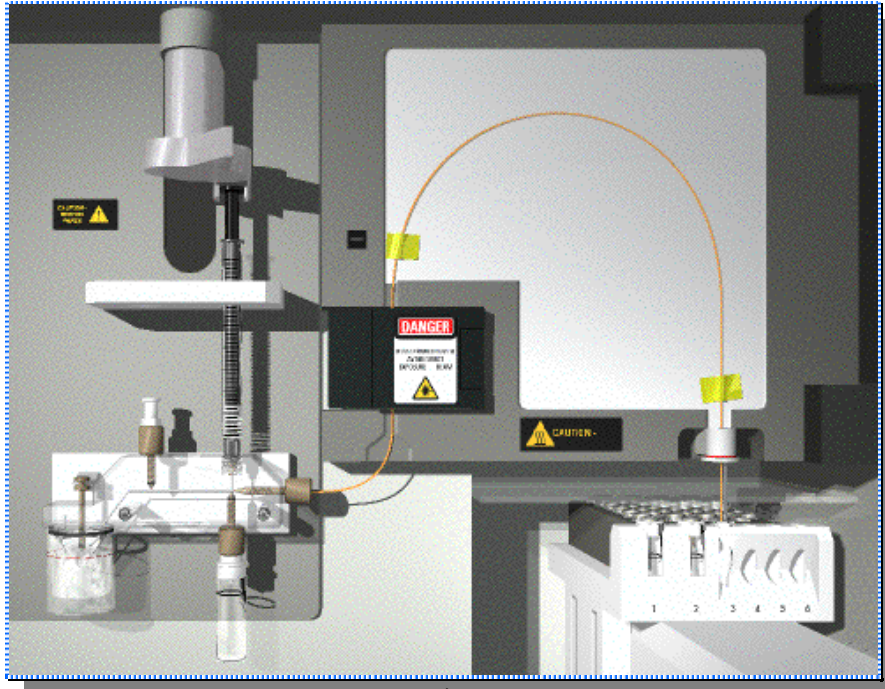
Elde edilen DNA örneklerinden ilgili bölge seçilen spesifik primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmaktadır. Daha sonra elde edilen PZR ürünü özel olarak hazırlanmış, içinde normal ve beş karbonlu şekerin 3. karbonundaki -OH grubunun yerine -H molekülünün geçmiş olduğu (ddNTP), farklı dalga boyunda absorpsiyon yapan floresans boya ile

işaretlenmiş 4 çeşit azotlu bazın (ddTTP, ddATP, ddGTP ve ddCTP) aynı anda bulunduğu ikinci bir PZR karışımı ile ilk PZR karışımında kullanılan 5'→3' (forward) veya 3'→5' (reverse) primerlerden birisinin kullanılmasıyla tekrar işleme tabi tutulur. Bu PCR reaksiyonunda sentez edilen yeni dizilere ddNTP bazların girmesiyle enzim senteze devam edememekte ve bunu bağlı olarak farklı uzunluklarda fragmentler elde edilmektedir.

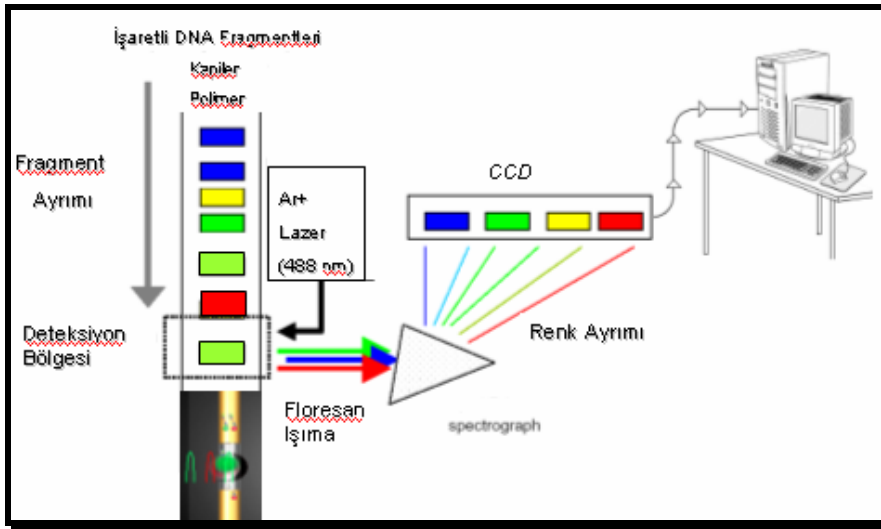


**Şekil 1.4.** 4 farklı ddNTP ve dNTP'li bazların bulunduğu karışım ile PCR reaksiyonunun ve ddTTP'nin şematize hali.

Farklı dalga boylarındaki floresan özellikte boyalarla işaretli ddNTP ve primerler ile amplifiye olmuş DNA fragmentlerinin, tek kapiler içerisinde elektroforezi esnasında, 488 nm'de sürekli ışığa yapan lazer ışığının etkisiyle yaydığı floresan sinyalin mikroçip teknolojisi ile üretilmiş bir CCD kamera tarafından algılanarak elektronik sinyale dönüştürülmesi ile hedef dizinin analiz yapılmaktadır.



a)



b)

**Şekil 1.5.** a) Tek kapiller sistemi ile çalışan sekanslama cihazı. b) Kapiller içinde fragment uzunluklarına göre sıralanan dizilerin başındaki farklı dalga boyundaki flouresans boyayla işaretli bazlar lazer önünden geçerken ışına yapmakta ve bu ışık mercekler aracılığıyla CCD kamera üzerine düşürülmektedir. Daha sonra bilgisayar aracılığıyla istenilen DNA bölgesinin nükleotid dizisi belirlenmektedir.

#### 1.7.3.4.3. PZR-RFLP

Bu yöntemde PZR ürünleri uygun restriksiyon enzimleri ile kesilir. Kesilmiş ampliconlar agaroz jelde yürütülür ve DNA fingerprint sonuçları elde edilir. 16S, 23S ve 16S-23S rRNA aralık bölgeleri bölge spesifik RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) için kullanılır (Olive and Bean, 1999; Caccamo, 2001).

#### 1.7.3.5. RFLP'ye dayalı genomik DNA

PFGE (Pulse field gel electrophoresis), yüksek düzeyde ayırt edici ve tekrarlanabilir olan bir tiplendirme yöntemidir. Bu yöntemde DNA ekstraksiyonu süresince DNA'nın kesilmesini önlemek için tüm hücre agaroz boncuklar içine alınır. Daha sonra bu boncuklar DNA izolasyonu için deterjan ve enzimlerle muamele ettirilir. İlerleyen adımda, izole edilen DNA spesifik 8 veya 6 bazlık dizileri tanıyan bir restriksiyon endonükleaz ile kesilir. Kullanılacak enzim, bakteriyal genomun G+C oranına göre seçilmektedir. İşlem sonrasında çok büyük DNA fragmentleri (10-800 kb) elde edilmektedir.

Bakteriyal boncuklar agaroz jele yüklenir. PFGE sisteminde, elektriksel alan ön saptama süresince değişkendir. Şalter veya nabız süresi denilen bu sürede, elektriksel alanın yönü değişkendir. Sonuç olarak, yüksek moleküler ağırlıktaki DNA fragmentlerinin ayrılması sağlanmaktadır.

Agaroz ve tampon konsantrasyonu, şalter süresi, voltaj ve elektroforez süresi fragmentlerin ayrılmasında etkili olan önemli parametrelerdir (Olive and Bean,1999; Busch and Nitschko,1999; Farber,1996).

## 1.8. İmmobilizasyon

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi kısıtlandırma demektir. Bilimsel anlamda immobilizasyon ise çeşitli hücrelerin ve enzimlerin suda çözünen veya çözünemeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması veya tutuklanmasıdır.

Enzimatik reaksiyonlarda immobilize hücrelerin kullanımı gerekli enzimlerin saflaştırılması ve izole edilmesi ihtiyacını ortadan kaldırmakla beraber enzimlerin doğal ortamlarında olmalarından dolayı operasyonel denaturasyon olasılığını azaltmaktadır. Aynı zamanda hücre ortamda kofaktör rejenerasyonunda önemli bir problem olmaktan çıkar. Bu çalışılabilir enzim aralığını genişletir. Üstelik çok adımlı enzimatik reaksiyonlar gerçekleştirilebilir.

Ancak enzimatik reaksiyonlarda immobilize hücrelerin kullanımının çeşitli dezavantajları da mevcuttur. Bunlara hücre duvarlarının, plazma membranının veya organel membranlarının substratların uygun enzime ulaşmasını ve ürünlerin tekrar dışarı çıkmasını ciddi biçimde etkileyeceği gerçeği dahildir. Ayrıca ortamda pek çok başka enzimin de bulunuyor olması istenmeyen yan reaksiyonların oluşumuna da neden olabilir (Woodward J.).

İmmobilize hücrelerle, enzim üretimi yapılabilmesi için mikroorganizmaların mutlaka istenilen enzimi ekstrasellüler olarak üretmesi gerekmektedir. Aksi takdirde immobilizasyonun hiçbir önemi kalmaz. Fakat seçilen tür iyi bir enzim üreticisi ise yapılan genetik manipülasyonlarla hücre zarında geçirgenlik sağlanabilir.

Mikrobiyal hücrelerin hidrojel gibi matrikslere immobilizasyonu hücreleri pH, sıcaklık, organik çözücüler ve zehir gibi çevresel etkilerden korur, ayrıca immobilize hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması kolayca gerçekleştirilir. İmmobilizasyonla, sürekli kültürlerde yüksek akış hızına rağmen hücre kaybı olmaksızın istenilen hücre konsantrasyonlarında çalışılabilir. Sonuç olarak ürün verimliliği artar (Park J.K., Chang H.N., 2000). Kesikli kültürlerde ise hücrelerin ortamdan kolayca uzaklaştırılması gibi alt akım işlemleri basite indirgenir. Neticede filtrasyon, santrifüj gibi maliyeti artıran prosesler uygulanmadan ürün elde edilir.

Hücrelerin immobilizasyonunda temel olarak kullanılan yöntemler; Bağlama yöntemlerinden çapraz bağlama ve taşıyıcıya bağlama (yüzeysel adsorpsiyon, taşıyıcıya kovalent bağlama vb), tutuklama yöntemlerinden ise polimerik jellerde (aljinat, kitosan, agar, poliakrilamid vb.) tutuklamadır. Kullanılan en yaygın ve bu çalışmada da kullanılan yöntem jelde tutuklamadır.

### **1.8.1. Tutuklama Yöntemleri**

Prensip olarak tutuklama, molekülü veya hücreyi belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Hücre bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik molekülün veya hücrenin fiziksel ve kimyasal olarak bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

### **1.8.1.1. Jelde Tutuklama**

Yöntemin temeli çapraz bağlamanın ve polimerizasyonun oluşturulduğu ortamda hücrenin de bulunması halinde, hücrenin çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda tutuklanması olayına dayanır. Böylece hücrelerin ortama geçmeleri engellenirken, besinler (C ve N kaynakları) ve ürünler (enzimler) gözeneklerden kolayca içeri ve dışarı difüze olabilirler. Gözeneklerin boyutu ise matriksin konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Konsantrasyon artması gözenek boyutunu küçültür. Konsantrasyon öyle bir ayarlanmalıdır ki hücreler tutuklanabilsin ama besinler ve ürünler içeri ve dışarı çıkabilsin.

Jel matriksi olarak genellikle agar, agaroz,  $\kappa$ -karrajenan, jelatin, aljinat, kitosan ve selüloz kullanılmaktadır. Bunların bazıları pahalı olmalarına rağmen mekanik güçleri zayıftır. Bundan dolayı jel boncuklara yüklenebilecek maksimum hücre, hacmin % 25 kadardır. Poliakrilamid ve poliüretan ise mikrobiyal hücreler için toksiktir. Hayvansal hücrelerin, mikrobiyal hücrelerin, mitokondrilerin, kloroplastların, protoplastların ve alyuvarların tutuklanmasında en uygun polimer aljinattır (Park J.K., Chang H.N., 2000).

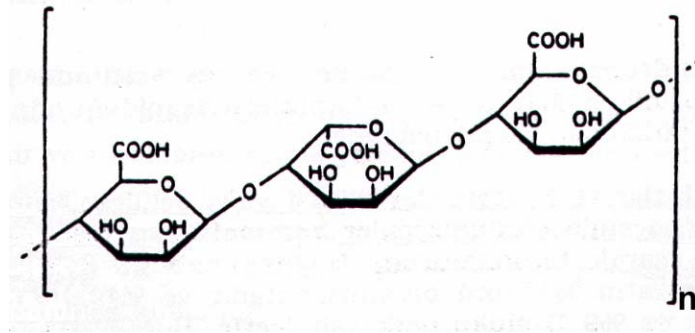
### **1.8.2. Jelde tutuklamada kullanılan Kullanılan Doğal Polimerler**

#### **1.8.2.1. Aljinat**

Aljinat özellikle Kuzey Atlantik'deki kayalık kıyılarda (ABD, Norveç, İngiltere, İsveç) çok yaygın bulunan kahverengi alglerden elde edilmektedir. Aljinat alglerde kalsiyum tuzu şeklinde bulunur ve hücre

zarında iyon değiştirici olarak etki eder. Son zamanlarda fermentatif olarak *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* ve *Azobacter vinelandii* ile aljinat üretimi gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak piyasaya daha çok sodyum-aljinat formunda sunulmaktadır ki bu ürün de aljinatın su bağlayıcı özellikteki bir polisakkarit olması nedeniyle gıda endüstrisinde jel yapıcı, stabilizatör ve koyulaştırıcı madde olarak çok tüketilmesiyle sonuçlanır (Kılınç, A. 1990)

#### Kimyasal Kompozisyon Ve Yapısı



Şekil 1.6 Aljinik asidin yapısı. (Telefoncu, A. 1993)

Aljinatlar yüksek oranda, hücre tutuklayıcı olarak ve enzim immobilizasyonunda kullanılırlar.

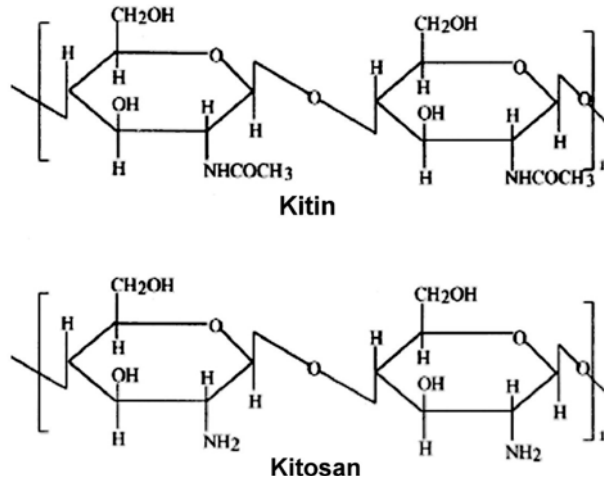
Kalsiyum aljinat jellerinde hücre tutuklamak günümüzde hücre immobilizasyonunda en çok kullanılan yöntem haline gelmiştir. Hücre taşıyan aljinat boncukları üretmek oldukça basittir.

Bir hücre veya enzim çözeltisi, sulu aljinat solüsyonu ile %2-4 oranında karıştırılır. Karışım multivalent katyon solüsyonu taşıyan başka bir solüsyona (0,05-0,1 M)  $\text{CaCl}_2$  damlatılır. Dammlar çabucak katılaşarak iyonotropik jel oluştururlar ve bu arada da hücreleri tutuklarlar.

### 1.8.2.2. Kitosan

Kitin N-asetil D glukozamin' in (N-asetil 2-amino 2-deoksi D-glukopiranoz)  $\beta$ 1-4 bağlarıyla bağlanmış, yüksek molekül ağırlıklı, düz bir polimerdir (şekil 1.14). Kabukluların ve mikroorganizmaların vücut yapılarını koruduğu gibi bir arada tutma işlevini de üstlenmiştir. Doğada binlerce ton kitin mevcuttur. Ticari olarak kitin deniz endüstrisinin yan atıkları olan, yengeç, karides ve ıstakoz kabukları atıklarından elde edilir.

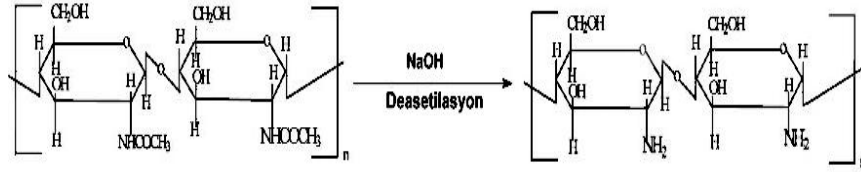
Kitosan, kitinin deasetillenmiş ürünüdür (şekil 1.15). Kitosan üretimi yüksek sıcaklıkta konsantre alkali çözeltilerde kitinin asetamid gruplarının hidrolizi sonucu gerçekleştirilir (şekil 1.15). Kitosan birkaç fungus türü dışında doğada bulunmaz.



Şekil 1.7 Kitin ve Kitosanın Yapısı

Kitosan toksik değildir. Kolayca biyoabsorblanabilen ve düşük pH' larda jel oluşturma yeteneğine sahiptir. Ayrıca basit serbest aminler içerir ve birçok inorganik ve organik tuzlarla tuz oluşturabilir. Bu tuzların birçoğu

suda çözülebilir ve genellikle kitosan organik ve inorganik asitlerin sulu çözeltilerinde çözülebilir. Kitosanın amin gruplarının asetilasyonu, reaktif olarak açıl anhidritlerin kullanımı ile gerçekleştirilir. Açılasyon işlemi sırasında kitosan solüsyonu yavaş yavaş çözünürlüğünü kaybederek jel hale geçer.



**Şekil 1.8** Deasetilasyon işlemi

Bu özellikler doğal polimer olan kitosanı hücre immobilizasyonu pozisyonunda ideal bir polimer yapar.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan aljinat, kitosan,  $\text{CaCl}_2$ , Glukoz,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Trizma Base, NaCl, Tween-80, Triton X-100 Sigma Chemical Co.,  $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Merck firmalarından sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar ise analitik saflıktadır. CSL, Pepton, kazein, tripton, yeast ekstrakt, balık yağı, zeytin yağı, ayçiçeği yağı, mısır yağı, soya yağı, fındık yağı, pamuk yağı,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Agar mikroorganizma kültürasyonunda kullanılmış ve farklı ticari firmalardan temin edilmiştir.

#### Besiyeri 1. Glikoz Yeast Ekstrakt Agar (GYA)

Yeast ekstrakt	5 gr
Pepton	3 gr
Glikoz	10 gr
Agar	15 gr
Sikloheksimid	100mgr/ml
Distile su	1000 ml

Besiyeri pH'sı 7,0'a ayarlanır ve otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edilmiştir. Pastör fırınında 180 °C'de steril edilmiş petri kaplarına 20 ml dağıtılarak kullanıma hazırlanmıştır. Antifungal olarak kullanılan

sikloheksimid membran filtrasyonu ile steril edildikten sonra otoklavda steril edilmiş besiyerine ilave edilmiştir. Aktinomisetlerin izolasyonunda kullanılmıştır.

**Besiyeri 2. Lipaz aktivitesi tarama ortamı:**

Tri-n-butirin	5 ml
Yeast ekstrakt	5 gr
Pepton	3 gr
Glukoz	5 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Ortam pH'sı 7,0'a ayarlandıktan sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Pastör fırınında 180 °C'de steril edilmiş petri kaplarına 20 ml dağıtılarak kullanıma hazırlanmıştır.

**Besiyeri 3. Bennet's Agar (DAP analizi için)**

Yeast Ekstrakt	1 g
Lab Lemko	0,8 g
Bakto Kasiton	2 g
Gliserol	10 g
Agar	18 g
Distile su	1000 ml

Ortam pH'sı 7,2'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Pastör fırınında 180 °C'de steril edilmiş petri kaplarına 20 ml dağıtılarak kullanıma hazırlanmıştır.

**Besiyeri 4. Lipaz Üretim Ortamı**

Yeast Ekstrakt	5 gr
Pepton	3 gr
İndükleyici Ajan	% 1

Ortam pH'sı 7,2'ye ayarlandıktan sonra erlenlere dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

**2.2. Yöntem****2.2.1. Örneklerin toplanması ve hazırlanması:**

Denemede kullanılan mikroorganizmaların izole edildiği topraklar Ege Üniversitesi kampüsünde bulunan zeytin bahçesi ve Rize'den temin edilmiştir. Bu örneklerden zeytin bahçesinden alınan toprak pH'sı nötral iken, Rize'den alınan toprak ise asidik özelliktedir. Mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılan pirina örneği ise bir zeytinyağı üretim fabrikası (Bornova) atıklarından alınmıştır.

Toprak örneklerinin kuru ağırlıklarının tespit edilmesi için 100 gram toprak 105 °C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletilmiştir. Süre sonunda tekrar ölçüm yapılarak 100 gram yaş toprağın kaç gram kuru toprağa denk geldiği bulunmuştur.

### 2.2.2. Actinomycetes İzolasyonu

*Actinomycetes* üyelerini zenginleştirmek için toprak ve pirina örneklerine, 1:10 (w/w) oranında CaCO<sub>3</sub> eklenerek 27 °C'de 4 gün inkübe edilmiştir.

Bu örneklerden 25 gram tartılarak aseptik koşullarda 225 ml'lik fizyolojik tuzlu su (%0,85 tuz içeren steril distle su) içerisine aktarılmıştır. Süspansiyon haline getirilen örneklerden 1/10 oranında seyreltmeler hazırlanarak her seyreltmeden iki paralelli olarak steril petri kaplarına aktarılmıştır. Otoklavlanmış ve yaklaşık 50 °C sıcaklığa getirilmiş Glukoz Yeast Ekstrakt Agar (GYA) besiyerine membran filtrasyonu (0,45 µm çaplı) ile steril edilmiş Siklohekzimid 100µg/ml konsantrasyonunda ilave edilmiştir. Her petriye 20 ml olacak biçimde besiyeri ilave edilmiş ve petriler 27 °C'de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. Petrilerde oluşan kolonilerden, morfolojik ve pigmentasyon özelliklerine göre *Actinomycetes* üyeleri lup yardımıyla seçilmiştir.

İzole edildiği yere göre adlandırılan izolatlar, ardı ardına izolasyon besiyerinde çizgi ekim tekniğiyle saf koloni haline getirilmiş ve daha sonraki uygulamalar için yatık GYA besiyerinde +4 °C'de stoklanmıştır. Stoklar ayda bir yenilenmiştir.

### 2.2.3. Lipaz Üreticisi Aktinomiset'lerin Saptanması

İzole edilen organizmaların lipaz aktiviteleri belirlenmiştir. Bu amaçla kalitatif ve kantitatif metotlar kullanılmıştır.

### 2.2.3.1. Kalitatif Yöntem ile Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

GYB besiyerinde 24 saatlik, aktiveştirilen izolatlar lipaz tarama ortamına nokta ekimi ile aktarılarak 27 °C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Tribütirin substratını hidrolizleyerek koloni etrafında açılma zonu oluşturan izolatlar, lipaz üreticisi olarak değerlendirilmiş ve en büyük hidroliz zonu oluşturan izolatlar kantitatif lipaz aktivitelerinin ölçülmesi için seçilmiştir.

### 2.2.3.2. Kantitatif Yöntem ile Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipaz aktivitesi Rapp ve Backhaus'a (1992) göre kromojenik bir substrat olan p-nitro fenil palmitat (pNPP) kullanılarak ölçülmüştür.

50ml Lipaz üretim ortamına 1ml aktif pelletlerin aktarılmasıyla, 27°C'de 200 rpm'de üretilen mikroorganizmaların ekstrasellüler lipaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, belirli sürelerde üretim ortamından 1 ml alınmış ve +4 °C de 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant lipaz aktivitesi ölçümlerinde kullanılmıştır.

**Substratın hazırlanması:** 30 mg pNPP 10 ml n-propanol içerisinde çözülür, üzerine 200 mg Triton X-100 içeren 90 ml 0,05 M Tris/HCl (pH 7,2) tamponu ilave edilir.

**Standartın hazırlanması:** Standart çözelti olarak, 10 µmol/ml derişimindeki ticari pNP (Sigma) çözeltisi kullanılarak, 0,005-0,1 µmol/ml derişimlerinde standartlar hazırlandı.

İşlem aşağıda çizelgede belirtildiği şekildedir.



### 2.3. Protein Tayini

Protein konsantrasyonu Bradford (1976) metodu ile tayin edilmiştir. Bu amaçla, aktivite ölçmek için hazırlanan süpernatant sıvısı kullanılmıştır.

**Bradford Reaktifinin Hazırlanışı:** 40 mg. Coomassie Brilliant Blue G-250, %95'lik 50 ml etanolde çözülüp, üzerine 55 ml %88'lik fosforik asit ilave edilerek distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Daha sonra filtre edilmiştir.

**Standart Protein Çözeltisi:** Sığır serum albüminin (BSA), distile suda hazırlanmış 10 mg/ml'lik stok standart çözeltisinden 0,02-0,2 mg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan protein çözeltileri ile çizilen standart grafik kullanılarak, örneklerin protein miktarları hesaplanmıştır.

Standart ve örneklerin protein miktarları tablodaki işleme göre belirlenmiştir.

Çizelge 2.2 Bradford yöntemi:

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Örnek</b>
<b>Distile su</b>	0,1 ml	-	-
<b>Standart çöz.</b>	-	0,1ml	-
<b>Örnek çöz.</b>	-	-	0,1 ml
<b>Bradford Reak</b>	2,0 ml	2,0 ml	2,0ml
Küvetler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.			
595 nm'de absorbanslar okunur.			

## **2.4. İmmobilize Sporlar ile Lipaz Üretimi**

### **2.4.1. Sporların Aljinat ile İmmobilizasyonu**

Tüplerde 4 ml distile suda çözünerek hazırlanan Na-aljinat çözeltisi, 121°C de 15 dk. steril edilmiştir. Üzerlerine GYB besiyerinde 27 °C'de 48 saatte üretilen spordardan ( $10^7$  adet/ml) 1 ml ilave edildikten sonra istenilen son aljinat konsantrasyonlarına (%2, %3, %4, %5) ulaşılmıştır. Tüpler vorteksle karıştırıldıktan sonra steril, otomatik pipet uçlarıyla, +4 °C'deki 150 ml'lik steril CaCl<sub>2</sub> (% 0,2 w/v) çözeltisine damlatılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Boncuklar aynı sıcaklıkta CaCl<sub>2</sub> içerisinde 1 saat bekletilerek sertleşmesi sağlanmıştır. Süre sonunda boncuklar steril distile su ile iki kez yıkanmıştır.

### **2.4.2. Kitosanla Kaplama**

Kitosan, %1'lik glasiyel asetik asit içinde %0,3 olacak şekilde hazırlanmış ve 80 °C'de karıştırarak çözülmüştür. Daha sonra 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Alginatla kaplanmış boncuklar, +4 °C'ye kadar soğutulmuş kitosan çözeltisi içinde 1 saat bekletilmiştir. Boncuklar steril saf su ile iki kez yıkanarak üretim ortamına alınmıştır. Sonuç olarak aljinatın karboksil grupları ile kitosanın amin grupları arasında elektrostatik etkileşim olmakta ve aljinatın etrafında ekstra bir tabaka oluşmaktadır.

## **2.5. Batık Kültür Yöntemi ile Lipaz Üretimi**

### **2.5.1. Farklı Karbon Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi:**

Besiyeri içeriğindeki karbon kaynağı değiştirilerek lipaz aktivitelerine bakılmıştır. Bu amaçla karbon kaynağı olarak %1 oranında zeytin yağı, ayçiçeği yağı, mısır yağı, soya yağı, pamuk yağı, balık yağı, fındık yağı ve Tween 80, GYB besiyerindeki glikoz yerine kullanılmıştır.

### **2.5.2. Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi:**

En iyi karbon kaynağı belirlendikten sonra lipaz üretimine azot kaynağının etkisi araştırılmıştır. Bunun için inorganik azot kaynağı olarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ve organik azot kaynağı olarak ise yeast ekstrakt, tripton, corn steep likör (CSL), pepton ve kazein kullanılmıştır. Azot kaynakları GYB ortamındaki azot kaynakları yerine %1 oranında ilave edilmiştir.

### **2.5.3. Farklı pH Değerlerinin Lipaz Üretimine Etkisi:**

Aktivitenin en iyi olduğu karbon ve azot kaynakları kullanılarak ortam pH'sı 4-8 olarak ayarlanmış ve günlere bağlı lipaz aktivitesi ölçülmüştür.

#### **2.5.4. İzolatın Büyüme Eğrisinin Çıkarılması**

İçerisinde % 1 yeast ekstrakt, % 1 ayçiçek yağı bulunan üretim besiyerinde pH 7.0'da, günlere bağımlı olarak lipaz aktiviteleri ve kuru hücre ağırlıkları ölçülmüştür.

#### **2.6. İzolatın Tanılanması:**

##### **2.6.1 Diamopimelik Asit (DAP) Analizi :**

Modifiye Bennet's agar üzerinde 2 hafta 27 °C'de büyütülen izolat, petri yüzeyinden kazınarak toplanmış ve liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen 50 mg örnek geri soğutucuda 1 ml 6 N HCl ile 100 °C'de 18 saat hidrolizlenmiştir. Hidrolizat soğutulduktan sonra 5.5 cm'lik Whatman No.1'den filtre edilmiştir. Tüp içine küçük bir parça turnusol kağıdı atılmış ve 6N NaOH damla damla ilave edilerek nötralize edilmiştir. Örnek süzöldükten sonra 1 ml steril distile su ile iki kez yıkanmıştır. Son olarak 300µl distile su eklenmiş ve 20 x 20 cm selüloz ince tabaka plakları (TLC) üzerine 5 µl örnek uygulanmıştır.

DAP'ın ince tabaka kromatografisinde yürütülmesi için kullanılan geliştirme solüsyonu metanol: su: 10N HCl: piridin (80 : 26,25 : 3,75 : 10, v/v ) karışımı kullanılmıştır. Örnek bu solüsyon içinde 5 saat yürütülmüştür. Süre sonunda oluşan DAP bantlarının gözlenmesi için aseton içinde çözülmüş ninhidrin (% 0.2) püskürtülmüş ve 100 °C'de yakılarak görünür hale getirilir. Oluşan mavi renk pozitif sonucu verir. Bantların belirlenmesi için standart DAP karışımı (Sigma-D1377) kullanılmıştır.

### 2.7.2 Moleküler Tanılama:

Lipaz aktivitesi en yüksek izolat olan *Streptomyces* sp. F11'in DNA ekstraksiyonu için İnvisorb Spin Bacteria (İnvitek 10332002, Almanya) kiti, pelletten ekstraksiyon protokolünde çeşitli modifikasyonlar yapılarak, kullanılmıştır.

DNA ekstraksiyonu için GYB besiyerinde 2 gün 27 °C'de çalkalamalı olarak büyütülen pelletler kullanılmıştır. Pelletlerden aseptik koşullarda 1 ml alınıp steril ependorf tüplerine aktarılmıştır. Tüp +4 °C'de 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen pellet üzerine Resuspension Buffer R'den 400 µl eklenmiştir. Kısa süreli vorteksleme ile pellet solüsyon içinde homojenize edilmiştir. Karışım Extraction Tube L'ye alınarak 65 °C'de 30 dakika çalkalamalı olarak inkübe edilmiş ve sonra tüp 95 °C'deki su banyosuna alınarak 15 dakika daha lizis işlemine devam edilmiştir.

Süre sonunda açığa çıkan DNA'nın filtreye bağlanmasını kolaylaştıran Binding Buffer B6'dan 400 µl eklenip kısa süreli vorteksleme ile karışması sağlanmıştır. Karışım RTA Receiver tüpüne yerleştirilmiş RTA Spin filtre kolonuna aktarılmıştır. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA'nın filtreye bağlanması ve diğer hücre atıklarının Receiver tüpüne geçmesi sağlanmıştır.

Filtreye bağlanması istenmeyen diğer yan ürünlerin arındırılması için filtre kolonu yeni Receiver tüpüne alınarak üzerine 500 µl Wash Buffer I eklenip 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra filtre kolonu tekrar yeni Receiver tüpüne alınmış ve 700 µl Wash Buffer II eklenerek 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Yıkama solüsyonlarının (Wash Buffer I ve II) aktif olarak çalışmasını sağlamak için önceden içlerine konulan saf etanolün filtreden uzaklaştırılması için filtre kolunu yeni Receiver tüpüne alınarak 14000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve böylece filtredeki etanolün Receiver tüpüne geçmesi sağlanmıştır.

Filtreye bağlanmış olan DNA'nın filtreden kurtarılması için filtre kolunu Elution tüpüne yerleştirilerek 200 µl Elution Buffer D eklenmiştir. Tüp, oda ısısında 3 dakika inkübe edildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve filtredeki DNA'nın Elution tüpüne geçmesi sağlanmıştır. Son olarak filtre kolunu atılmıştır.

Elde edilen ekstraksiyon ürünü, % 2'lik agoroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Daha sonra -20 °C'ye kaldırılarak saklanmıştır.

PZR işlemi için; 5'-TCACGGAGAGTTTGATCCTG-3' Forward Primeri ve 5'-GCGGCTGCTGGCACGTAGTT-3' Reverse Primeri (Lee et al., 2002) ile 5'-ACAAGCCCTGGAAACGGGGT-3' forward primer 5'-AGATCGGAATTCCTGGTG-3' ve 5'-TGTCTTGGGCTGCACACGT-3' reverse primerleri kullanıldı (Rintala, 2003).

Ayrıca bu primerler <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> adresindeki gen bankalarında araştırılarak AB026199 *Streptomyces scabies* (ATCC 49173) strainin 16S Ribozomal RNA bölgeleriyle karşılaştırılarak uygunluğu tespit edilmiştir.

PCR karışımı ve protokolü aşağıda çizelgelerde verilmiştir.

**Çizelge 2.3.** PZR protokolü 1

Applied Biosystems Gene Amp® 10 X Buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl)	5 µl
Applied Biosystems Gene Amp® MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP (2 mM , Fermentas)	3 µl
Forward Primer (10 pmol) ( TCACGGAGAGTTTGATCCTG)	2,5 µl
Reverse Primer (10 pmol) ( GCGGCTGCTGGCACGTAAGT)	2,5 µl
Applied Biosystems Native Taq DNA Polymerase (5 U/ml)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	28,5 µl
İzolat DNA'sı	5 µl

**Çizelge 2.4.** Thermalcycler protokolü 1

<b>Sıcaklık</b>	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
<b>Süre</b>	5 dk	60 sn	45 sn	80 sn	5 dk	∞
<b>Döngü sayısı</b>	1	30			1	

**Çizelge 2.5.** PZR protokolü 2

Applied Biosystems Gene Amp® 10 X Buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl)	5 µl
Applied Biosystems Gene Amp® MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP (2 mM , Fermentas)	3 µl
Forward Primer (25 pmol) ( ACAAGCCCTGGAAACGGGGT)	2,5 µl
Reverse Primer (25 pmol) ( AGATCGGAATTCCTGGTG)	2,5 µl
Applied Biosystems Native Taq DNA Polymerase (5 U/ml)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	28,5 µl
İzolat DNA'sı	5 µl

**Çizelge 2.6.** Thermalcycler protokolü 2

<b>Sıcaklık</b>	95 °C	95 °C	54 °C	72 °C	72 °C	4 °C
<b>Süre</b>	5 dk	45 sn	130 sn	70 sn	7 dk	∞
<b>Döngü sayısı</b>	1	45			1	

**Çizelge 2.7.** PZR protokolü 3

Applied Biosystems Gene Amp® 10 X Buffer ( 100mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl)	5 µl
Applied Biosystems Gene Amp® MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP (2 mM , Fermentas)	3 µl
Forward Primer (25 pmol) (ACAAGCCCTGGAAACGGGGT)	2,5 µl
Reverse Primer (25 pmol) ( TGTCTTGGGCTGCACACGT)	2,5 µl
Applied Biosystems Native Taq DNA Polymerase (5 U/ml)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	28,5 µl
İzolat DNA'sı	5 µl

**Çizelge 2.8.** Thermalcycler protokolü 3

<b>Sıcaklık</b>	95 °C	95 °C	64 °C	72 °C	72 °C	4 °C
<b>Süre</b>	5 dk	45 sn	130 sn	70 sn	7 dk	∞
<b>Döngü sayısı</b>	1	45			1	

PZR reaksiyonu 9700 model Perkin-Elmer (Foster City.CA. U.S.A) thermalcyclerı kullanarak gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında PZR ürünleri % 2'lik agoroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

PZR ürününün Cycle sequencing öncesi saflaştırılması için Invisorb Spin PCRapid (Invitex, 10202004 Almanya) kiti kullanılmıştır. PZR ürünün üzerine 130 µl Buffer P'den eklenmiştir. Karışım Receiver tüpüne yerleştirilmiş Spin filtre kolonuna aktararak oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. Tüp süre sonunda 10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

Filtrenin temizlenmesi için yeni Receiver tüpüne alınmış filtre kolonuna 700 µl Wash Buffer eklenerek 10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

Filtreden Wash Buffer içine önceden konulmuş etanolün ve Wash Buffer fazlalığının uzaklaştırılması için, filtre kolonu yeni Receiver tüpüne alınmış ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

Son olarak filtre kolonu Elution tüpüne alınarak 30 µl Elution Buffer'dan eklenmiştir. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyondan sonra 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve PZR ürününün Elution tüpüne geçmesi sağlanmıştır.

Purifikasyondan sonra PZR ürününde kayıp olup olmadığını ve de Cycle sequencing için üründen kullanılacak miktarın belirlenmesi için PZR ürünü tekrar % 2'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Purifiye edilmiş PZR ürünü Forward ve Reverse primerler ile ayrı ayrı Sekans PZR'ına (Cycle sequencing) alınmıştır. Sekans PZR'ı aşağıda verilen miks ve protokole göre BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems ; part no: 43031539) kullanılarak 9700 model Perkin-Elmer (Foster City, CA, U.S.A) thermalcyclerında

gerçekleştirilmiştir (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

**Çizelge 2.9.** Cycle sequencing PZR karışımı

Ready Reaction Mix	8 µl
Forward ya da Reverse Primer (3.2 pmol)	0,5 µl
Örnek DNA'sı	2-8 µl
ddH <sub>2</sub> O	Aktarılan DNA miktarını göre toplam hacmi 20 µl'ye tamamlayacak şekilde ayarlanır.

**Çizelge 2.10.** Cycle sequencing PZR protokolü

<b>Sıcaklık</b>	96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
<b>Süre</b>	10 sn	5 sn	4 dk	∞
<b>Döngü sayısı</b>	25			

Cycle sequencing PZR işleminden sonra sodyum asetat (CH<sub>3</sub>COONa) pürifikasyon işlemi uygulanmıştır. PZR ürünü üzerine, pH 4.6 olan 3 mM'lık sodyum asetatın 2 µl eklenip üzerine 50 µl %95'lik etanol pipetlenmiştir. Karışım 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu pürifikasyon işleminin hiçbir aşamasında vorteks kullanılmamaktadır, bu nedenle karışım hafifçe elle vurularak karıştırılmıştır.

Tüp buz içinde 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hiç bekletilmeden 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant

yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alınıp üzerine 250  l %70'lik etanol eklenmiştir. Karışım hafifçe elle vurularak karıştırılmıştır.

T p 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant tamamen atıldıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan  r n -20  C'de 1 hafta saklanabilir veya direk sekans cihazına yüklenebilir.

PZR ürününe 20  l formamid eklenip kısa süre vortekslenmiŐtir. PZR  r nindeki çift sarmal yapının açılması için termalcyclerda 95  C'de 5 dakika bekletilen ürün daha sonra buz içinde 2-3 dakika Őoklanmış ve böylelikle sarmal yapının tekrar oluşması engellenmiŐtir.

 rnek önceden 50  C'ye getirilmiş ABI 310 sekanslama cihazına (ABI Prism 310 Genetic Analyzer-The Measure of Enabling Technology, 1997. PE Applied Biosystems) yüklenmiŐtir. Cihazda 47 ve 61 cm'lik kapiller, kapiller içinde POP 6 polimeri ve tampon olarak EDTA'lı 10X Buffer kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Kalitatif ve Kantitatif Lipaz Aktiviteleri

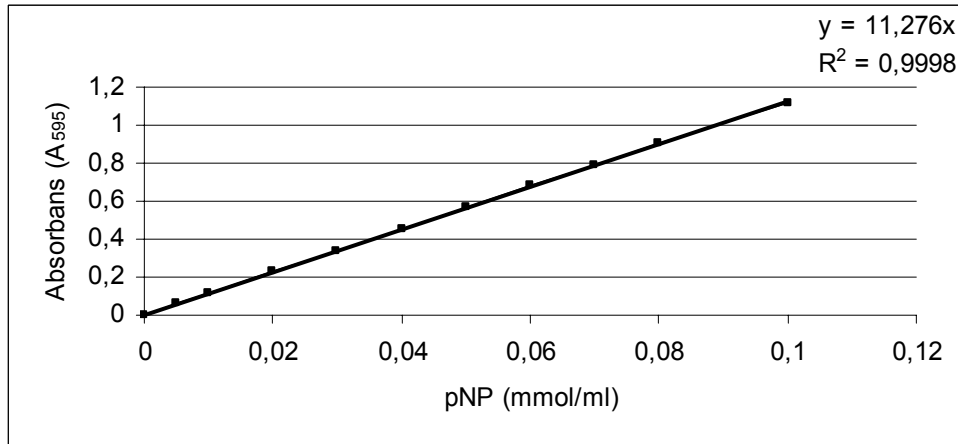
Kantitatif lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacı ile kullanılan pNP standart grafiği ve aktivite ölçümünde kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$\text{Lipaz Aktivitesi (U/ml)} = \frac{A_{410} \times V_T}{T_{\text{ink}} \times V_E \times E_{\text{gim}}} \times \text{Seyreltme Katsayısı}$$

$V_T$  = Toplam reaksiyon hacmi (ml)

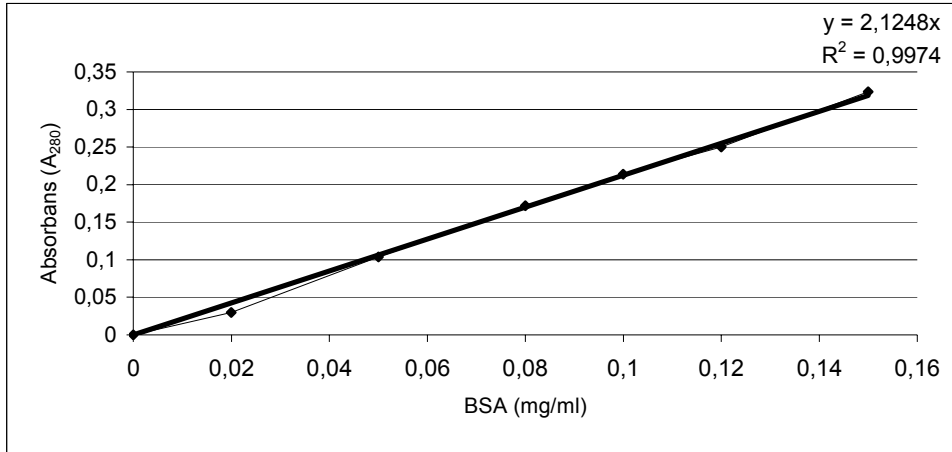
$V_E$  = Enzim hacmi (ml)

$T_{\text{ink}}$  = İnkübasyon süresi (dak.)



Şekil 3.1. pNP standart grafiği

Örneklerdeki protein miktarını ölçmek amacı ile Bradford yöntemi ile BSA kullanılarak oluşturulan protein standart grafiği aşağıdadır.

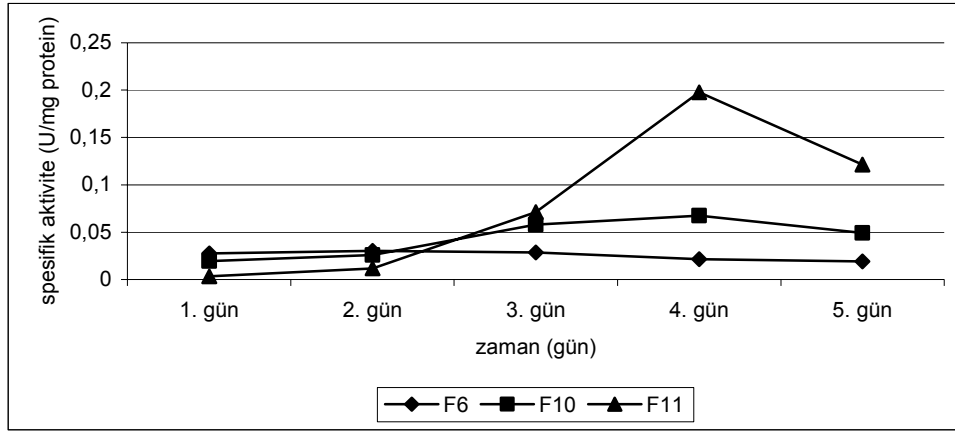


Şekil 3.2. BSA ile hazırlanan protein standart grafiği

### 3.2. İzolatların Lipaz Aktiviteleri

Seyreltme plaka yöntemi ile yapılan ekimler sonucunda oluşan kolonilere lup altında bakılarak farklı koloni morfolojileri ve oluşturdukları pigmentlere göre 52 *Actinomyces* üyesi seçilmiş ve bu örnekler çizgi ekimler yapılarak saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan izolatlar lipaz aktivite screening ortamına ekilen izolatlardan 11 (% 21,15) tanesinde lipaz hidroliz zonu gözlenmiştir. En geniş zon çapına sahip üç izolatın (F6, F10, F11) lipaz aktivitesi pNPP yöntemi ile ölçülmüş ve en iyi üretici olarak F11 izolatı seçilmiştir.



**Şekil 3.3.** İzolatların batık kültür fermentasyon tekniği ile yapılan üretim ortamındaki lipaz aktiviteleri

*Streptomyces* türlerinin antibiyotik üretimleri ile ilgili birçok çalışma olmasına karşın, onların lipaz aktivitelerinin taranması ve endüstriyel ölçekte lipaz üretimleri için literatürde oldukça az çalışma bulunmaktadır.

Mikrobiyal lipazlar gerçekleştirdikleri pek çok reaksiyon tipi nedeni ile son yıllarda üzerinde yaygın çalışmalara konu olmuştur. Birçok bakteri ve fungus türü lipaz üretmesine karşın ticari ölçekte lipaz üretiminde kullanılan türler; *Pseudomonas fragi*, *Alcaligenes sp.*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* ve *Candida cylindracea*'dır. Yüksek aktivitede lipaz preparatlarına duyulan endüstriyel ihtiyacın hala karşılanamamış olması, yeni lipaz kaynaklarının araştırılmasını teşvik etmektedir.

*Streptomyces* türlerinin antibiyotik üretimleri ile ilgili birçok bilimsel araştırma olmasına karşın, onların lipaz aktivitelerinin taranması ve endüstriyel ölçekte lipaz üretimi için literatürde oldukça az çalışma mevcuttur. Lipidler karbonhidratlarla karşılaştırıldığında hem daha ucuz

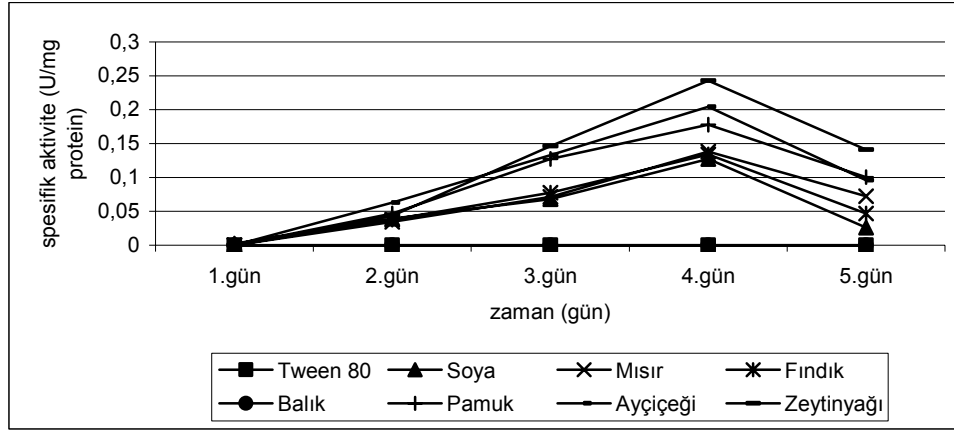
karbon kaynaklarıdır, hem de antibiyotik üretim ortamlarında kullanıldıklarında antibiyotik üretim verimlerini arttırmaktadır. Aynı zamanda doğal köpük kırıcı olmaları onların fermantasyon ortamlarında, eğer istenilen ana ürünün sentezini etkilemiyorsa, kullanılmasını teşvik etmektedir (Large et al., 1999). *Streptomyces* sp. p 6621'de Sefomisin C biyosentezinin soya yağı kullanımı ile (Park et al., 1994), *Streptomyces clavaligerus*'de ise hurma yağının klavulonik asit ve Sefomisin sentezini arttırdığı bulunmuştur (Lee and Hoo, 1999). Szatajer et al. (1988) test ettiği 15 *Streptomyces* tip türlerinden sadece 3 tanesinin hem tributinin hem de zeytin yağını hidrolize ettiği belirlemiştir.

Araştırmamızda Aktinomiset izolatlarından 11 tanesi (% 21,15) tarama ortamında lipaz aktivitesi göstermiştir. Szatajer ve arkadaşları (1998) test ettiği 15 *Streptomyces* tip türünden sadece 3 tanesinin hem tributinin hem de zeytin yağını hidrolizlediğini belirlemiştir. Borman ve arkadaşları (1993) ise 243 *Streptomyces* izolatının % 51'inin katı ortamda, % 33'ünün ise sıvı ortamda lipaz aktivitesini gösterdiğini bulmuşlardır.

### **3.3. Karbon Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi**

Farklı karbon kaynakları veya çeşitli yağların F11 izolatının lipaz aktivitesi üzerine etkisi balık yağı, pamuk yağı, ayçiçeği yağı, zeytin yağı, tween 80, soya yağı, mısır yağı ve fındık yağı (% 1v/v) kullanarak belirlenmiştir. % 1 oranında besiyerine eklenen zeytin yağının 0,25 U/mg protein lipaz aktivitesi üretimine neden olmuştur. Kullanılan diğer yağlardan hepsinde F11 izolatı lipaz üretiminde etkili olmuştur. Soya yağı 1,15 U/mg protein ile en etkisiz lipaz indükleyicisi olarak belirlenmiştir.

Rapp ve Backhaus (1992) *Streptomyces caelestis* DSM 40084, *Streptomyces lavendulae* DSM 40708 ve *Streptomyces lipmanii* DSM 40070 türlerinden lipaz üretimi amacı ile % 1 zeytin yağı kullanmışlardır. Aynı araştırmacılar *Streptomyces* türlerinden lipaz üretimi esnasında düşük lipaz aktiviteleri elde etmelerini pNPP'in zayıf bir lipaz substratı olmasına bağlamışlardır.



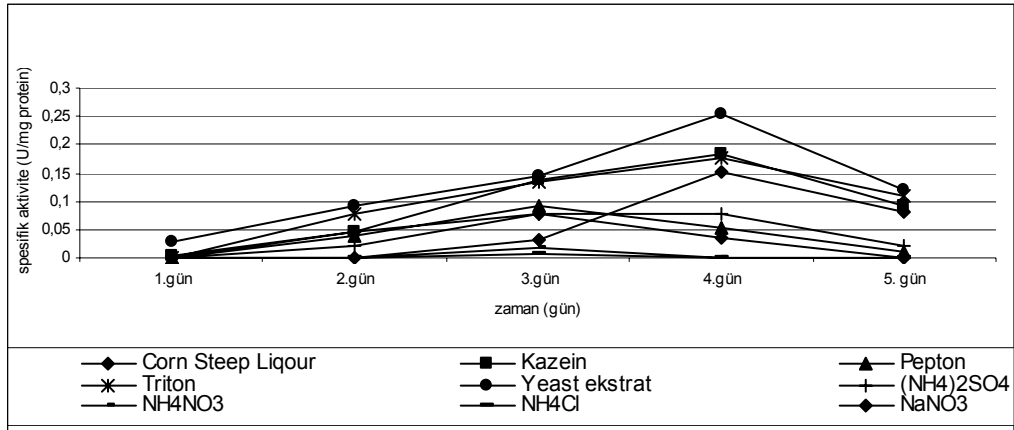
Şekil 3.4. Karbon kaynaklarının lipaz üretimi üzerine etkisi

Lipaz aktivitesinin indüksiyonu ile ilişkili mekanizmalar bir çok araştırmanın konusu olmaktadır. Üretici mikroorganizma ve enzimin lokalizasyonuna bağlı olmaksızın karbon kaynağı enzim aktivitesini indükleyerek veya baskılayarak kontrol eden en önemli faktörlerden birisidir. Lipazlar üretimleri için en önemli lipid bazlı bir karbon substratına gereksinim gösterirler. Bu maddelerin lipaz sentezi ve stimülasyondaki rolleri tam olarak anlaşılammıştır. Bazı lipazların bir lipid içermeyen ortamlarda, örneğin *A. niger*, yapısal olarak sentezlendiği bulunmuştur. Ancak ortama yağ ilave edildiğinde, yağsız ortamla karşılaştırıldığında enzim aktivitesinin 3 kat arttığı gözlenmiştir. Lipid ilaveli ortamda *A.*

*niger*'de lipazın sentezlendiğini ve lipaz sentezinin gliserol ve glukoz ilavesi ile baskılandığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda lipaz sentezinin triaçilgliseridteki yağ asiti zinciri karbon iskeleti kontrol edildiği bulunmuştur. Benzer sonuçlar *Fusarium oxysporum* ile de gösterilmiştir. Pseudomonadlarda lipaz aktivitesinin indüklenebilir olduğu onların indüksiyonunun gerekli olmadığı ve ortamdaki yağ mevcudiyetinde inhibe edilebileceği de rapor edilmiştir (Sharma et al.,2001).

### 3.3. Azot Kaynaklarının Lipaz Üretimine Etkisi

Lipaz üretimini artırmak için fermantasyon besisi yerine azot kaynaklarını ilavesi gereklidir. *Streptomyces* F11 izolatının fermantasyon ortamındaki azot kaynakları yerine 1 (w/v) oranında inorganik ve organik azot kaynakları eklendiğinde en iyi lipaz üretiminin fermantasyon 4. gününde gerçekleştirdiği görülmüştür. Yeast ekstraktan sonra etkili diğer azot kaynakları kazein > triton > NaNO<sub>3</sub> > (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > Pepton > CSL > NH<sub>4</sub>Cl şeklinde sıralanmıştır (Şekil 3.5).

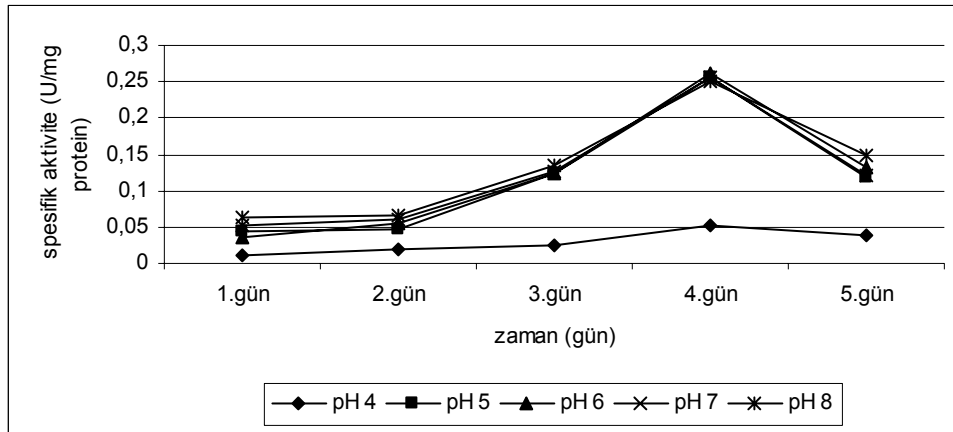


Şekil 3.5. Azot kaynaklarının lipaz üretimi üzerine etkisi

*Streptomyces* F11 izolatu lipaz üretiminde organik azot kaynakları ile en yüksek lipaz aktivitesini göstermiştir. Triton-X 100 katılan fermantasyon ortamında ise lipaz aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu durum enzimin yapısal ve hücreye bağlı bir enzim olduğunu göstermektedir. Benzer biçimde *S. clavuligerus*, *S. erythrea*, *S. lividans*, *S. coelicolor* ve *S. rimosus* lipazlarının hücreye bağlı oldukları gösterilmiştir (Large et al., 1999).

### 3.4. Ortam pH'nın Lipaz Üretimine Etkisi

Fermantasyon ortamının pH'sının 4-8'e ayarlandıktan sonra yapılan lipaz üretiminde ise, pH 4.0 dışındaki tüm ortamlarda lipaz üretiminin 4. günde optimum olduğu görülmüştür. Bu durum *Streptomyces* türlerinin doğal yaşam koşullarının nötral ve hafif alkali olması ile uygunluk göstermektedir.

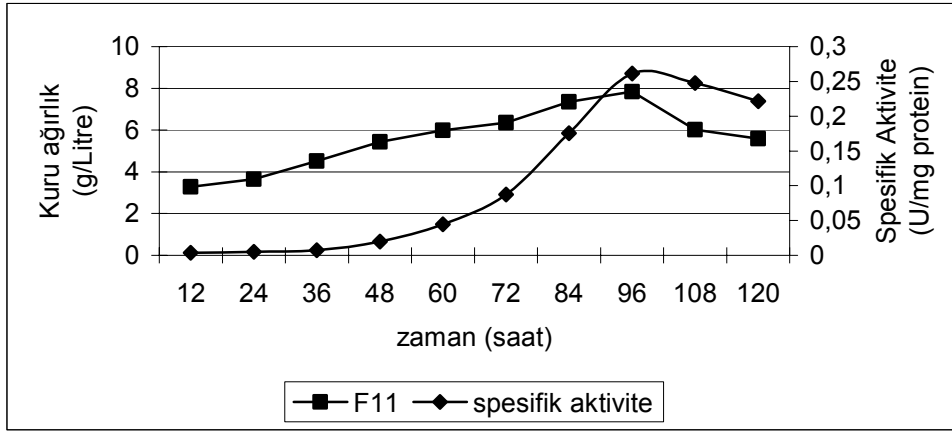


Şekil 3.6. Ortam pH'nın lipaz üretimi üzerine etkisi

Batık kültür çalışmalarında pH, metal iyonu konsantrasyonu gibi kimyasal çevredeki değişiklikler, sürfaktanların bulunması, C ve N kaynakları ve diğer ortam bileşenlerinin üretim ortamındaki lipaz stabilitesini etkilediği gösterilmiştir. Fiziksel çevredeki değişiklikler lipaz enzimi aktivitesini de etkileyecektir. Yağların lipaz ile hidroliz hızı yağ-su ara yüzeyinin yüzey alanının direk bir fonksiyonudur. Eksternal lipazların aktivasyonu için bu ara yüzey çok önemlidir. Aynı zamanda gazlar gaz-sıvı ara yüzeyinde inaktivasyona oldukça duyarlıdır. Lipaz enzimi çalkalamalı koşullarda denatürasyona duyarlılık gösterir ve batık kültürlerde oluşan proteolitik aktivite lipazları hidrolizleyerek üretim üzerine etkili olurlar (Sharma et al., 2001).

### 3.5. Büyüme Eğrisi

Fermantasyon ortamı içerisinde % 1 zeytinyağı ve % 1 yeast ekstrakt ilave edilerek pH 7.0 da, 27°C'de ve 200rpm'de yapılan denemede, F11 izolatının 4.günde 9.0g/l hücre üretimine ve 0,25 U/mg protein lipaz aktivitesine ulaştığı görülmüştür (Grafik 3.7). *Streptomyces caelestis* DSM 40084, *Streptomyces lavendulae* DSM 40708 ve *Streptomyces lipmanii* DSM 40070 türlerinin maksimum lipaz üretimini 5 günde gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Rapp and Backhaus, 1992). F11 izolatının bir litre besiyerinde 260 U/mg lipaz aktivitesi gösteren biyoması 9 g'dır. Bu durum F11 izolatının 28.8 U lipaz/g biyomas oluşturduğunu göstermektedir. *Streptomyces caelestis* DSM 40084'in 0,018 U/ml, *Streptomyces lavendulae* DSM 40708'nin 0,030 U/ml, *Streptomyces lipmanii* DSM 40070'nin 0,020 U/ml lipaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Rapp and Backhaus, 1992).



Şekil 3.7. Büyüme eğrisi

### 3.6. İmmobilize Sporlar ile Lipaz Üretimi

Fermantasyon yolu ile mikrobiyal metabolit üretiminde yüzey kültür tekniği, derin kültür tekniği ve sürekli kültür tekniği kullanılabilir. Saflaştırılmış enzimlerin suda çözünen veya çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması; anlamına gelen immobilizasyon, mikrobiyal hücrelerden özellikle enzim üretiminde kullanılabilir bir yöntem olarak son zamanlarda büyük ilgi çekmektedir. Mikrobiyal hücrelerin yukarıda belirtilen matrikslere immobilizasyonu; hücreleri pH, sıcaklık, organik çözücüler ve zehirli atıklara karşı korur, ayrıca immobilize hücrelerin besiyeri ortamından ayrılması, buna ilave olarak ürünün geri kazanımı da kolay olur. İmmobilizasyonla, sürekli kültürlerde hücre kaybı olmaksızın istenilen hücre konsantrasyonlarında çalışabilir. Hücrenin matriksi parçalamadığı durumlarda fermantasyon besiyerinin değiştirilmesi sureti ile birkaç kez aktif hücrelerle tekrarlanabilir.

Sonuçta ürün verimliliği artar. Kesikli kültürlerde hücrelerin filtrasyon, santrifüj gibi maliyeti arttıran, işlemlerle ortamda uzlaştırılması gerekmektedir. Ancak immobilize hücrelerle enzim üretimi yapılabilmesi için istenilen enzimin hücre dışı olması gerekmektedir. Bu amaçla üretici mikroorganizmada genetik manipulasyonlar yapılabilmekte, besi yerine hücre zarından geçişi kolaylaştırıcı maddeler (örn. deterjanlar) ilave edilebilmekte veya lizozim ile hücre zarı uzaklaştırılmış protoplastlar kullanılabilir (Johri et al., 1993; Cunha et al., 2002; Sharma et al., 2001).

Araştırmamızda  $10^7$  adet spor/ml içeren spor karışımı % 2-5 alginat ile immobilize edilmiş ve % 0,3 oranında kitosanla kaplanmış immobilize spor boncukları lipaz üretim ortamında 27°C'de 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Günlere bağlı lipaz aktivitesi ölçümlerinde lipaz aktivitesinin 4. günde 0,19 U/mg proteine ulaştığı gözlenmiştir. Ancak kitosanla kaplanmış spor içeren baloncuklarda 4. günde aşırı misel büyümesi sonucu lizis meydana gelmiştir. Bu durum ardışık lipaz üretim amacımızı ortadan kaldırmıştır. Fermantasyon ortamına % 1 (w/v) alginat ve % 5 (w/v) kitosan ayrı ayrı ilave edilerek yapılan kültürasyonlarda *Streptomyces* F11 izolatının her iki polimeri de hidrolizlediği görülmüştür. Bu durum *Streptomyces* F11 izolatı ile immobilize lipaz üretiminin yapılamayacağı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle çalışmamız *Streptomyces* F11 izolatından batık kültür ile lipaz üretimi şeklinde yeniden planlanmıştır.

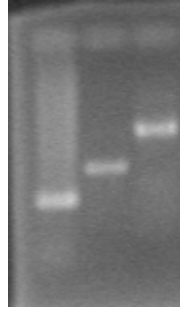
### 3.7. DAP Analizi

*Streptomyces* TEM izolatımızın tanısına yönelik yapılan kemotaksonomik bir yöntem olan DAP analizi sonucunda, izolatının hücre çeperinde L-DAP içerdiği bulunmuştur. Aktinomiset grupları içinde çeper

analizine göre yapılan sınıflandırmada (Lechavalier and Lechovalier 1970) L-DAP içeren türler kemotip 1 içinde yer almaktadır. Mikroskopik incelemeler sonucunda izolatın substrat ve havasal misel içermesi hareketsiz sporlara sahip olması, ayrıca havasal misel üzerinde uzun spor zincirleri içermeleri nedeni ile DAP analizi sonucuna göre kemotip 1 içinde sınıflandırılan bir *Streptomyces* genusu olduğuna karar verilmiştir.

### 3.8. Moleküler Tanılama

Materyal metotta belirtildiği şekilde izole edilen F11 izolatının DNA'sı saflık kontrolleri yapıldıktan sonra ilgili primerlerle PZR'da çoğaltılmıştır. PZR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra jel görüntülenmiştir (Şekil 3.8).

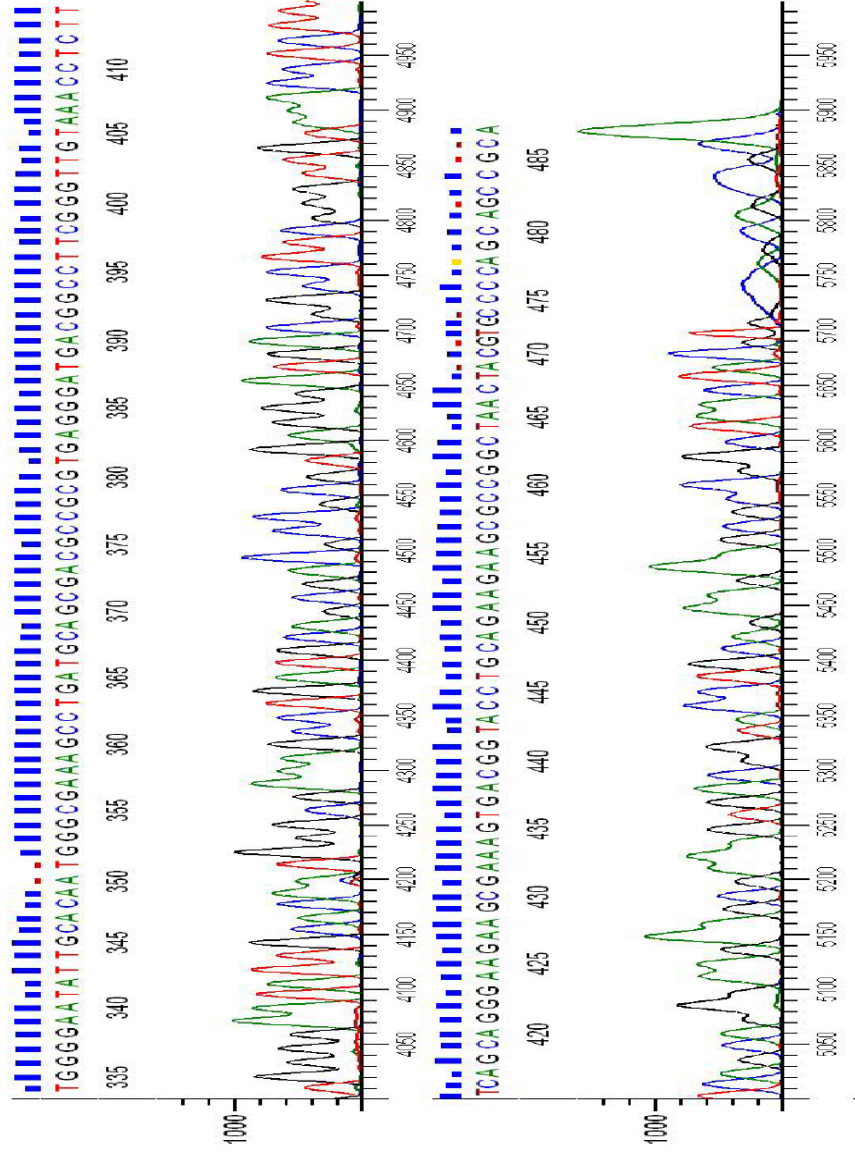


Şekil 3.8. PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü

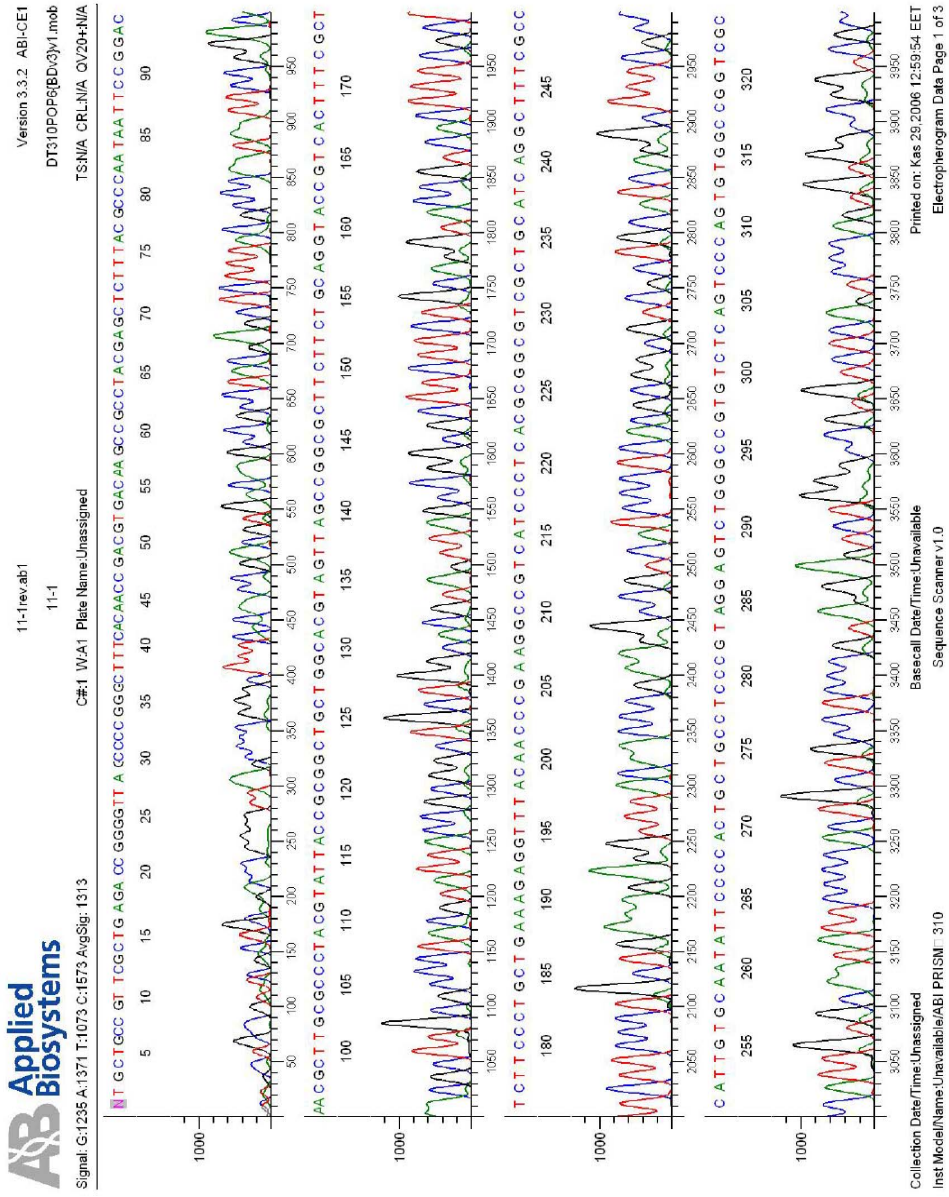
Şekilde ikinci kuyuda F11 izolatının 500 bp'lik dizisinin PZR ürünü, üçüncü kuyuda ise 700 bp'lik PZR ürünü görülmektedir. Bu ürünler ilk kuyuda bulunan 250 bp'lik DNA parçası ile kontrol edilmiştir.

Cycle sequencing ürünlerinin ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazında yürütülmesi sonucunda aşağıdaki baz dizileri elde edilmiştir.

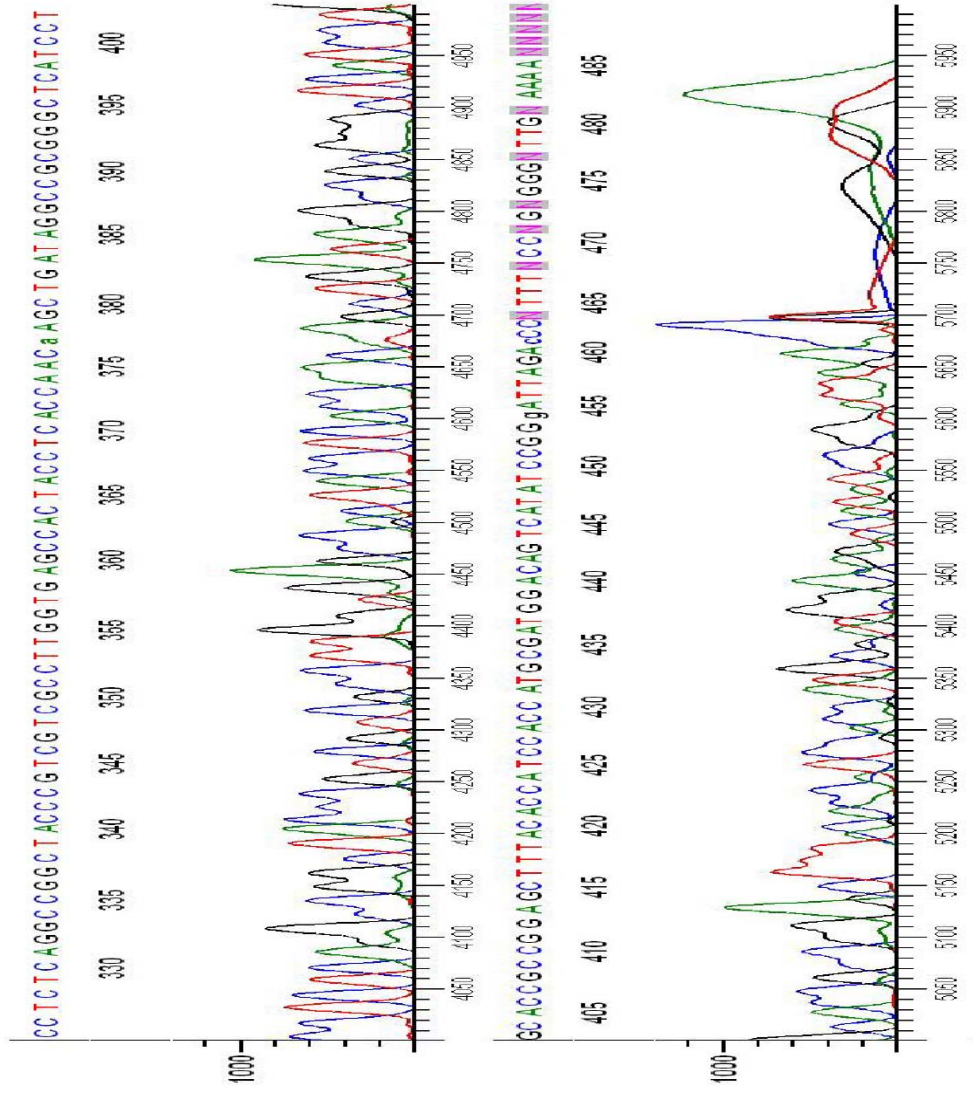




Şekil 3.9: (Devamı)

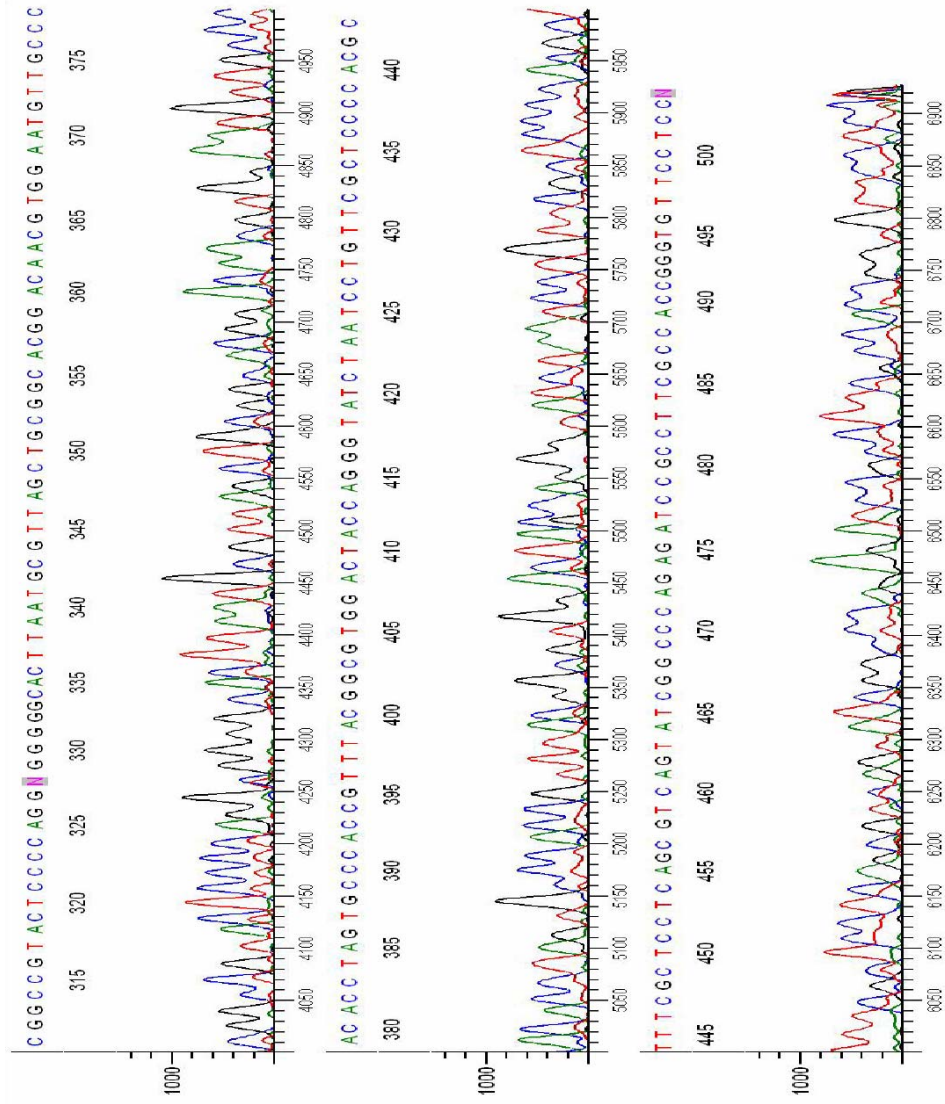


Şekil 3.10: PZR protokolü 2'ye göre *Streptomyces* TEM izolatının elde edilen baz dizisi



Şekil 3.10: (Devami)

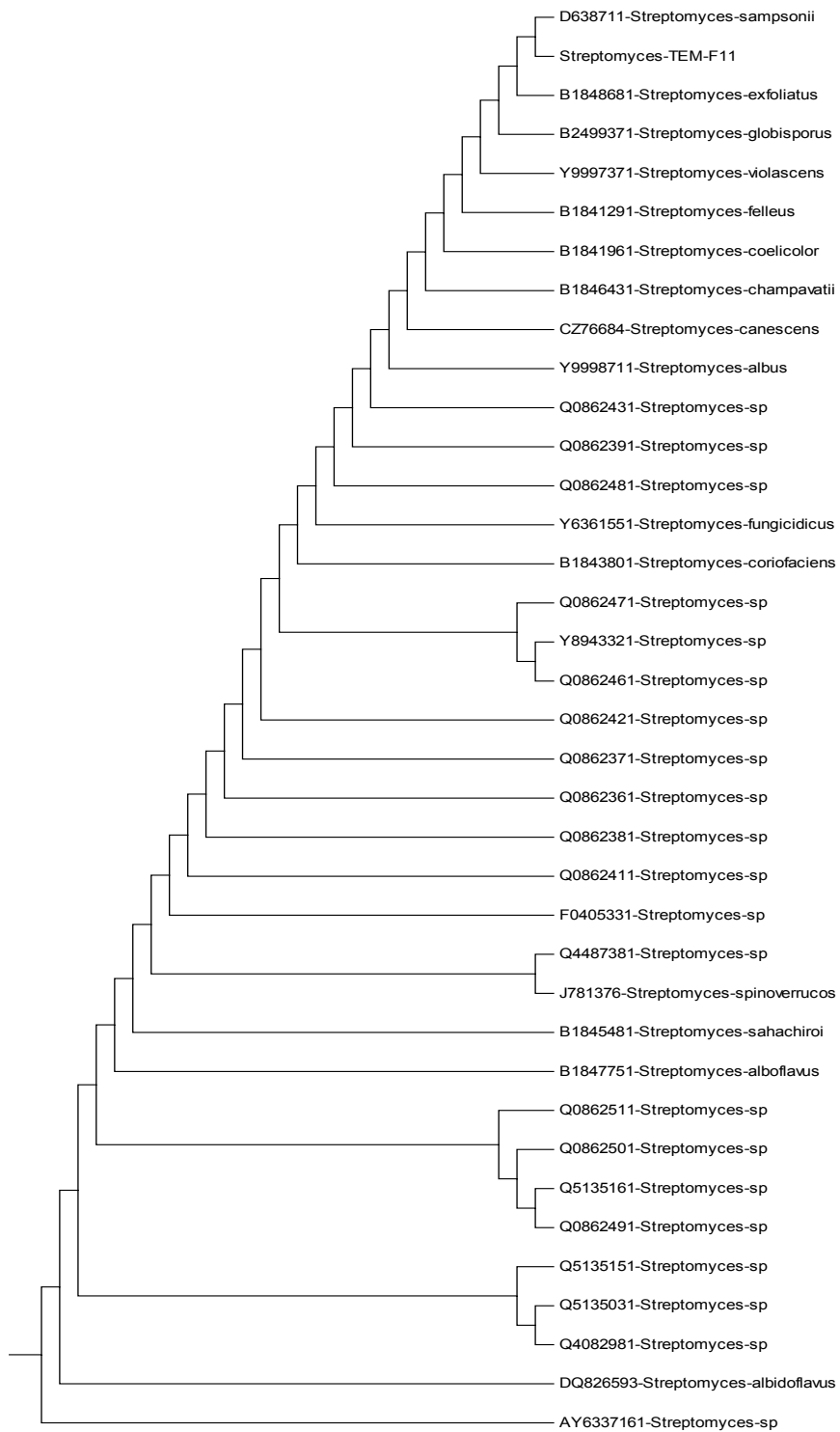




Şekil 3.11. (Devamı)



Nucleotide-nucleotide BLAST seçeneğine göre saptanan yakın organizmaların 16S rRNA bölgeleri ve F11 nolu izolatın baz dizisi Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA2) (Kumar, 2001) software' i kullanılarak aşağıdaki soyağacı elde edilmiştir.



Bu sonuçlara göre iyi bir lipaz üreticisi olan *Streptomyces* TEM F11 izolatının *S. sampsonii* türünün bir straini olduğu tespit edilmiş ve *S. sampsonii* TEM F11 olarak adlandırılmıştır.

*S. sampsonii* TEM F11 straininin *S. sampsonii* bakterisinin biyokimyasal özellikleri ile benzerlik durumu ayrıca 16S bölgesinin tamamı ile 5S ve 23S rRNA bölgelerinin dizi analizi yapılarak strain düzeyinde tanımlanması, *S. sampsonii* TEM F11 straininin tüm özelliklerinin belirlenmesi için gerekmektedir.

Bu çalışma, doğadan izole edilen bir mikroorganizmanın tanımlanmasında yol göstermesi ve lipaz üretimleri hakkında çok fazla literatür bulunmayan *Actinomycetes* gurubunun lipaz üretimlerine bir örnek olması açısından önem kazanmaktadır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Antonian E.** 1988 Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids*. **23** (12):1101–1106
- Balcao V. M. ; Kemppinen A. ; Malcata F. X.; Kalo P. J.** Lipase Catalyzed Acidolysis Of Butter Fat with oleic acid:characterization of process and product. *Enzyme Microb Technol* 1998; 23: 118–28.
- Beher , W.T. and Lin, G.J.,** 1975 Specificity of Oxidation of Bile-Salt Hydroxyl Groups by Crude Extracts of *Pseudomonas testosteroni* (ATCC 11996) Used in Determining Bile Salts *CLIN.CHEM.* 21/11,1630-1631
- Bormann C, Nikoleit K, Potgeter M, Tesch C, Sommer P, Goetz F.** Investigation of lipolytic enzymes from Streptomyces. *DECHEMAMonogr* 1993:237– 47.
- Bradford, M.M.,** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 242-254.
- Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M, Alberghina L, Schmid RD.** 1998. Design, total synthesis and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip 1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci* 7: 1415–22.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

**Chander H., Ranganathan B. and Singh J.** (1979) Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. *J. Food Sci.* **44(6)**, 1747-1751

**Cihangir, N. and Sarikaya, E.,** 2004 Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 193–197

**Cunha, M.G, Filho J.L And Takaki,G.M.,** 2002, Protoplast Formation And Regeneration From *Streptomyces Clavuligerus* Nrrl 3585 And Clavulanic Acid Production. *Brazilian Journal Of Microbiology* 33:347-351

**Downey, W.,** 1980. Review of the Progress of Dairy Science: Flavor impairment from pre- and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products. *J. Dairy Res.* 47, 237-252.

**El Khattabi, M., Gelder, P.V., Bitter, W. and Tommassen, J.,** 2000 Role of the Lipase-specific Foldase of *Burkholderia glumae* as a Steric Chaperone, *Journal of Biology and Chemistry*, 275:35, 26885-26891.

**Elibol, M., Ozer, D.,** 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rizopus arrhizus*. *Proc. Biochem.* 36, 325–329.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- Ellaiah P., Prabhakar T., Ramakrishna B, Thaer Taleb A., Adinarayana K.,** 2001, Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger* , Process Biochemistry.
- Falch, E.A.,** 1991. Industrial enzymes, developments in production and application. Biotechnol. Adv. 9, 643-658.
- Falony,G., Armas, J.C., Mendoza J.C.D. and Hernández, J.L.M.,** 2006. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation Food Technology and Biotechnology 44 (2) 235–240.
- Flaig, W., and H. J. Kutzner,** 1960. Beitrag zur Ökologie der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. *Arch. Mikrobiol.*, 35: 105-138
- Frost, G. M., and D. A. Moss.** 1987. Production of enzymes by fermentation. Biotechnology, 7a, 66-155.
- Gandolfi, R.; Marinelli, F.; Lazzarini, A. and Molinari, F.** 2000, Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. Journal of Applied Microbiology, 89: 870-875
- Garcia, H. S., Amundson, C. H. and Hill, C. G.**1991. Partial characterization of the action of *Aspergillus niger* lipase on butteroil emulsions Journal of Food Science 56 1233-1237.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- Ghosh, P.K., Saxena, R.X., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S.,** 1996. Microbial lipase: production and applications. *Sci. Prog.* 79, 119-157.
- Giuseppin M. L. F.,** 1984. Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by *Rhizopus delemar*. *Applied microbiology and biotechnology.* 20, 161-165
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D. and Walter, B. T.,** 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*) purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1124: 123-134,
- Godtfredsen SE.** Microbial lipases. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. *Microbial enzymes and biotechnology.* 2nd ed. London: Elsevier, 1990. pp. 255-73.
- Goodfellow, M.** 1989. The Actinomycetes I. Suprageneric classification of *actinomycetes*, s. 2333-2339. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol.4. Williams ve Wilkins, Baltimore.
- Goodfellow, M., and S.T. Williams,** 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbial.* 37:189-216.
- Goodfellow, M., and T. Cross,** 1984. Classification, s. 7-164. *The biology of the actinomycetes.* Academic Pres, London.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., Cygler, M.,** 1993, Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. J Biol Chem. 268 (17):12843–12847.
- Hsiao, K.F., Yang, F.L., Wu, S.H. and Wang, K.T.,** 1996. Selective monoacetylation of diol compounds by *Aspergillus niger* lipase Biotechnology Letters 18:11, 1277-1282
- Iwai, M. and Tsujisaka, Y.,** 1984. Fungal Lipase. Amsterdam : Lipases, Elsevier.
- Jasmin, A. M., C.P. Powell, and J. N. Baucom,** 1972. Actinomycotic mycetoma in bottlenose dolphin due to *Nocardia paraguayensis*. Vet. Med. Small Anim. Clin. 67:542-543
- Johri B.N, Alurralde J.D, and Klein J.** 1990, Lipase production by free and immobilized protoplasts of *Sporotrichum* (*Chrysosporium*) thermophile *Apinis*. Appl Microbiol Biotechnol. 33 (4):367-71
- Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., Iefuji, H.,** 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. Proc. Biochem. 36, 317–324.
- Khan, M. R., and S. T. Williams,** 1975. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. 8. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. Soil Biol. Biochem. 7:345-348.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- Korn-Wendisch, F. and H. J. Kutzner** 1992. The family *Streptomycetaceae*. In *The Prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application*, 2. ed. vol 1, 41: 921-995.
- Krishna S. H. and Karanth, N. G., 2002** Lipases And Lipase-Catalyzed Esterification Reactions In Nonaqueous Media *Catalysis Reviews* 44:4, 499–591.
- Kroppenstedt, R. M., F. Korn-Wendisch, V. J. Fowler, and E. Stackebrandt**, 1981. Biochemical and molecular genetic evidence for a transfer of *Actinoplanes armeniacus* into the family *Streptomycetaceae*. *Appl. Microbiol.* 4:254-262.
- Kulkarni, N., 2002** Studies On Lipase Enzyme From *Pseudomonas fluorescens* NS2W PhD Thesis University of Pune, India 213p.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., ve Nei, M., 2001.** MEGA2 : Molecular Evolutionary Genetic Analysis Software *Bioinformatics* Application Note 17:12, 1244-1245.
- Küster, E., 1970.** Note on the taxonomy and ecology of *Streptomyces malachiticus* and related species. *The Jena Int. Symp. On Taxonomy*, 169-172.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

**Lairon D, Nalbone G, Lafont H, Leonardi J, Domingo N, Hauton JC, Verger R.** Possible roles of bile lipids and colipase in lipase adsorption. *Biochemistry*. 1978 Nov 28;17 (24):5263–5269.

**Lambert, D. H. ve R. Loria,** 1989a. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:387-392

**Large, K. P.; Mirjalili, N., Osborne, M., Peacock ,L.M., Zormpaidis, V.; Walsh, M. Cavanagh, M.E., Leadlay, P.F and Iso, A.P.** 1999, Lipase activity in *Streptomyces* *Enzyme and Microbial Technology* 25 : 569–575

**Lechevalier H.A.and Lechevalier,M.P.** 1970, Chemical composition and criterion in classification of aerobic Actinomycetes, *Int. Journal of Syst. Bacteriology*, 20: 435-443.

**Lee, C.H., Kim, B.J., Choi, G.J., Cho, K.Y., Yang, H., Shinc., Min, S. ve Lim, Y.,** 2002. *Streptomyces* With Anti-Fungal Activity Against Rice Blast Causing Fungus, *Magnaporthe Grisea J. Microbiol. Biotechnol.*, 12 (6), 1-3.

**Lee PC and Ho CC.** ,1996, Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium. *World J Microbiol Biotechnol*;12:73–5.

**Lewis, G. E., W. J. Fidler, and M. H. Crumrine,** 1972. *Mycetoma in cat.* 161:500-503.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- Macrae, A., Roehl, E.L., Brand, H.M.**, 1990. Bio-esters in cosmetic. Drug Cosmet. Ind. 147, 36±39.
- Merek A, Bednasski W.** Some factors affecting lipase production by yeast and filamentous fungi. Biotechnol Lett1996;18:1155–60.
- Mikami,Y., K. Miyashita, and T. Arai**, 1985. Alkalophilic actinomycetes. The actinomycetes, vol. 19, 176-191,
- Mishra, S. K., R. E. Gordon, and D. A. Barnett**, 1980. Identification of nocardiae and streptomycetes of medical importance. J. Clin. Microbiol. 11:728-736.
- Park, J.K., Chang, H.N.**, 2000. Microenkapsulation of Microbial Cells, Biotechnology Advances, 18:303-319
- Park, YS, Momase I, Tsunoda K, Okabe M.** 1994, Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. Appl Micro Biotech;40:773–9.
- Rapp P, Backhaus S.** ,1992,Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. Enzyme Microbiol Technol;14: 938–43.
- Rintala, H.**, 2003. Streptomycetes In Indoor Environments -PCR Based Detection And Diversity, Academic Dissertation the University of Kuopio 70 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- Rohit Sharma, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee, 2001** Research review paper Production, purification, characterization, and applications of lipases. 19, 627-662.
- Sharma, R; Chisti, Y; Banerjee ,U. Chand,2001,** Production, purification, characterization,and applications of lipases .Biotechnology Advances 19 : 627–662
- Sommer P, Bormann C, Gotz F. 1997.** Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl Environ Microbiol*;63:3553–60.
- Sugiura M, Isobe M., 1974.** Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*. 3. Purification of a low molecular weight lipase and its enzymatic properties. *Biochim Biophys Acta.* 21;341 (1):195-200
- Szabo, I., M. Marton, I. Szabolcs, and L. Varga, 1959.** 9:9-39.
- Sztajer H, Maliszewka I, Wieczorek J.** Production of exogeneous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microbial Technol* 1988;10:492–7.
- Tanaka H, Doesburg K, Iwasaki T, Mierau I. 1999** Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity *J Dairy Sci.* 1999 Dec;82 (12):2530-5
- Telefoncu, A., 1995** *Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları* No 153, sayfa 219-258

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

**van Tilbeurg H, Egloff M. P, Martinez C, Rugani N, Verger R, Cambillau C.** 1993. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 362:814-820.

**Verger, R., Mieras, M.C.E., Haas, G.H.,** 1973, 248 (11):4023-4034

**Vickers, J. C., S. T. Williams ve G. W. Ross.** 1984. A taxonomic approach to selective isolation of streptomycetes from soil. Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes. Proc. 553-561.

**Wells, M.A.,** 1974, *Biochemistry*, 13 (11):2248-2257

**Williams, S. T., and Mayfield, C. I.,** 1971. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. III. The behavior of neutrophilic streptomycetes in acid soil. *Soil Biol. Biochem.* 3:197-208

**Williams, S. T., and Cross, T.,** 1971. Actinomycetes. Methods in microbiology, vol. 4, 295-334.

**Williams, S. T., M. E. Sharpe, and J. G. Holt,** 1989b. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Woodward J.,** Immobilised Cells and Enzymes, a practical approach, chapter 3 pages 39-48

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Erkan KAYTANKAŞ

**Doğum Yeri ve Tarihi:** İzmir, 26/03/1980

**Uyruğu:** T.C.

### **Eğitim Durumu:**

Üniversite	Akademik Kariyer	Bölüm/Branş	Yıl
Ege Üniversitesi	Lisans	Biyoloji/ Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji	1998-2003
Ege Üniversitesi	Yüksek Lisans	Biyoloji	2003-

### **Bilimsel Tebliğler:**

Bilge Hilal ÇADIRCI, Ali KOÇYİĞİT, İhsan YAŞA, Yusuf BARKUT, Erkan Kaytankaş ‘*Streptomyces* sp. den Katı Kültür Fermentasyon Tekniği İle Ksilanaz Üretimi Ve Kısmi Saflaştırılması’ XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran 2004, Adana

İhsan YAŞA, Bilge Hilal ÇADIRCI, Ali KOÇYİĞİT, Yusuf BARKUT, Erkan Kaytankaş ‘Bazı *Streptomyces* sp. Türlerinin Lipaz Aktivitelerinin Taranması ve Katı Kültür Fermentasyonu ile Lipaz Üretimi’ XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran 2004, Adana