

**T.C.
MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Pseudomonas spp.*'de LİPAZ ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RUKİYE BORAN

**TEMMUZ 2008
MUĞLA**

**T.C.
MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Pseudomonas spp.*'de LİPAZ ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rukiye BORAN

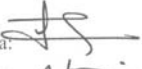


MUĞLA 2008

T.C. MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Aysel UĞUR danışmanlığında Rukiye BORAN tarafından hazırlanan "*Pseudomonas* spp.'de Lipaz Enzimi Üzerine Çalışmalar" başlıklı tez 18.08.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Aysel UĞUR
Üye : Doç. Dr. Nazime MERCAN
Üye : Yrd. Doç. Dr. M.Emin DURU

İmza: 
İmza: 
İmza: 

ÖNSÖZ

Öncelikle, bu tez çalışmasını yapma olanağı veren, gerekli alt yapıyı sağlayan, çalışmalarımı yönlendiren, fikir ve önerileri ile bana yol gösteren saygıdeğer hocam Doç. Dr. Aysel UĞUR'a, teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince her konuda emeğini, desteğini, sabrını ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım ve birlikte çalışmaktan daima zevk aldığım Öğr. Gör. Nurdan SARAÇ, sayın hocam Arş. Gör. Dr. Gülten ÖKMEN ve Dr. Özgür CEYLAN'a teşekkür ederim. Çalışmalarımın ilk gününden itibaren bilgi ve zamanını benimle paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen arkadaşım Arş. Gör. Yonca SURGUN'a ve akademik çalışmalarımın tümünde, maddi manevi her türlü desteği gösteren, ilgi ve sevgilerini daima hissettiğim sevgili aileme, ve bunun yanı sıra emeği geçen herkese yanımda oldukları ve bana güvendikleri için teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Lipazların Genel Özellikleri.....	4
2.2. Lipaz Kaynakları.....	6
2.2.1. Pseudomonal lipazlar.....	9
2.2.2. Sütlerde Pseudomonal lipazlar.....	10
2.3. Lipaz Analiz Metotları.....	13
2.3.1. Kalitatif analiz.....	13
2.3.2. Kantitatif analiz.....	15
2.4. Optimizasyon Koşulları.....	16
2.5. Protein Saflaştırma Metotları.....	19
2.6. Lipazlar İçin Karakterizasyon ve Stabilizasyon Çalışmaları.....	23
2.7. Lipazların Endüstride Kullanımı.....	27
2.7.1. Lipazların gıda endüstrisinde kullanımı.....	29
2.7.2. Lipazların oleokimya endüstrisinde kullanımı.....	30
2.7.3. Lipazların organik sentezde kullanımı.....	31
2.7.4. Lipazların deterjan endüstrisinde kullanımı.....	31
2.7.5. Lipazların atıksu arıtımı işlemlerinde kullanılması.....	32
2.7.6. Lipazların kağıt endüstrisinde kullanımı.....	33
2.7.7. Lipazların farmasötik endüstrisinde kullanımı.....	33
2.7.8. Lipazların deri endüstrisinde kullanımı.....	34
2.7.9. Lipazların medikal sektörde kullanımı.....	35
2.7.10. Lipazların biyopolimerlerin üretiminde kullanımı.....	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	37

3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	37
3.1.2. Çalışmada kullanılan boya ve solusyonlar.....	40
3.1.3. Çalışmada kullanılan tamponlar.....	42
3.1.4. İdentifikasyonda kullanılan test kitleri.....	43
3.2. Yöntem.....	45
3.2.1. <i>Pseudomonas</i> izolasyonu.....	45
3.2.2. Muhtemel <i>Pseudomonas</i> izolatlarında lipolitik aktivitenin belirlenmesi.....	45
3.2.3. Lipolitik aktivitesi olan muhtemel <i>Pseudomonas</i> 'ların İdentifikasyonu.....	46
3.2.3.1. İzolatların Gram boyanma özelliklerinin belirlenmesi.....	46
3.2.3.2. Katalaz etkinliği.....	46
3.2.3.3. Sitokrom oksidaz testi.....	46
3.2.3.4. Laktozu fermente etme yetenekleri.....	47
3.2.3.5. Oksidasyon/Fermentasyon testi.....	47
3.2.3.6. API 20NE identifikasyon testi.....	47
3.2.4. Kantitatif ekstraselüler lipaz aktivitesi tayini.....	51
3.2.4.1. Lipaz üretimi için uygun besiyerinin seçimi.....	51
3.2.4.2. Enzim üretimi.....	51
3.2.4.3. Ekstarselüler lipaz aktivitesinin tespiti.....	52
3.2.4.4. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması.....	52
3.2.5. <i>P. fluorescens</i> RB02-3 suşunun hücre gelişimi ve lipaz üretimi.....	53
3.2.6. <i>P. fluorescens</i> RB02-3 suşunun protein konsantrasyonunun belirlenmesi.....	53
3.2.7. BSA standart eğrinin hazırlanması.....	54
3.2.8. Ekstarselüler lipaz enziminin saflaştırılması.....	54
3.2.8.1. Amonyum sülfat [(NH ₄) ₂ SO ₄] çöktürmesi.....	54
3.2.8.2. Diyaliz.....	55
3.2.8.3. Jel filtrasyon kromatografisi.....	55
3.2.9. Lipazın moleküler ağırlığının belirlenmesi (SDS-PAGE).....	57
3.2.9.1. Örneklerin hazırlanışı.....	58
3.2.9.2. SDS-PAGE uygulaması.....	59
3.2.10. <i>P. fluorescens</i> RB-02-3 suşu lipazının karakterizasyonu.....	60
3.2.10.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	60
3.2.10.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	60
3.2.10.3. Organik çözücülerin <i>P. fluorescens</i> RB02-3 suşu lipazı üzerine etkileri.....	61

3.2.10.4. Ağır metallerin <i>P. fluorescens</i> RB02–3 lipazı üzerine etkisi	61
3.2.10.5. Çeşitli ajanların <i>P. fluorescens</i> RB02–3 lipazı üzerine etkisi.....	61
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	62
4.1. <i>Pseudomonas</i> İzolasyonu.....	62
4.2. Muhtemel <i>Pseudomonas</i> İzolatlarında Lipolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	62
4.3. Lipolitik Aktivitesi Olan İzolatların Tanımlanması.....	65
4.4. İzolatların Tür Düzeyinde Tespiti	67
4.5. Kantitatif Ekstraselüler Lipaz Aktivitesi Tayini.....	71
4.5.1. Lipaz üretimi için uygun besiyerinin seçimi.....	71
4.5.2. Ekstarselüler lipaz aktivitesinin tespiti	71
4.6. <i>P. fluorescens</i> RB02-3 Suşunun Hücre Gelişimi ve Lipaz Üretimi.....	74
4.7. Ekstraselüler Lipaz Enziminin Saflaştırılması.....	74
4.8. Lipazın moleküler ağırlığının belirlenmesi (SDS-PAGE).....	78
4.9. <i>P. fluorescens</i> RB02–3 Suşuna Ait Lipazın Karakterizasyonu.....	78
4.9.1. Optimum pH'nın belirlenmesi	78
4.9.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	80
4.9.3. Organik çözücülerin <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşu lipazı üzerine etkisi.....	81
4.9.4. Ağır metallerin <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşu lipazı üzerine etkisi.....	82
4.9.5. Çeşitli ajanların <i>P. fluorescens</i> RB02–3 lipazı üzerine etkisi.....	83
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	84
KAYNAKLAR.....	100
ÖZGEÇMİŞ	

Pseudomonas spp.*'de LİPAZ ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR*(Yüksek Lisans Tezi)****Rukiye BORAN****MUĞLA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****2008****ÖZET**

Bu çalışmada; *Pseudomonas* CFC Agar kullanılarak bozulmakta olan çiğ ve pastörize süt örneklerinden 85 izolat elde edilmiştir. Bütün izolatların lipolitik aktiviteleri Tribütirin Agar ve Rhodamin B Agar'da kalitatif olarak belirlenmiştir.

İzolatlar Gram boyama yapılmış ve Gram negatif izolatlar seçilmiştir. Ayrıca izolatlar katalaz ve oksidaz testleri, Mac Conkey Agarda gelişme durumları ve O/F testleri yapılmıştır. Gram negatif, katalaz ve oksidaz pozitif, laktoz negatif ve oksidatif metabolizma gösteren izolatlar API 20NE identifikasyon testi aracılığı ile tür seviyesinde tanımlanmıştır. Toplam 37 izolat karakterize edilmiş ve 36 tanesi (97.30%) *P. fluorescens*, 1 (2.70%) *P. putida* olarak tanımlanmıştır. Lipaz aktivitesi substrat olarak p-nitrofenil palmitatın kullanılmasıyla spektrofotometre ile kantitatif olarak ölçülmüştür. Suşların tamamı lipaz aktivitesi göstermiştir. Bu suşların lipaz aktivitesinin 10.03 U/ml ve 22.16 U/ml aralığında olduğu bulunmuş ve en yüksek lipaz aktivitesinin *P. fluorescens* RB02-3 suşuna ait olduğu belirlenmiştir. *P. fluorescens* RB02-3'ün zamana bağlı enzim üretimi bazal ortamda gözlenmiş ve maksimum aktiviteyi 40 saat sonra geç logaritmik fazda üretmiştir ve durağan faza ulaştıkça azalmıştır. *P. fluorescens* RB02-3 suşunun ekstraselüler lipazı amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve Sephadex G-100'ün kullanıldığı jel filtrasyon kolon kromatografisi kombinasyonu kullanılarak homojen

olarak saflaştırılmıştır. *P. fluorescens* RB02–3 suşundan ekstraselöler lipaz % 20.3 verim ile 2.97 kat saflaştırılmıştır. Saf enzimin moleköler ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 57 kDa olarak belirlenmiştir.

Ardından, bu enzim karakterize edilmiş ve maksimum aktiviteyi pH 7.0 ve 50 °C ‘de göstermiştir. Hekzan, etil asetat ve butanol gibi çeşitli organik solventlerin varlığında yüksek stabilite sergilemiş, izopropanol ve etanol lipaz aktivitesini arttırmıştır. Bu lipaz MnCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂ ve EDTA varlığında biraz inhibe olmuştur fakat SDS ve Tween 80 aktiviteyi etkilememiştir.

Anahtar Kelimeler : *Pseudomonas*, lipaz, süt, saflaştırma, karakterizasyon

Sayfa adedi : 131

Tez yöneticisi : Doç.Dr. Aysel UğUR

STUDIES ON LIPASE ENZYMES FROM *Pseudomonas spp.***(M.Sc. Thesis)****Rukiye BORAN****MUGLA UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE and TECHNOLOGY****2008****ABSTRACT**

In this study; 85 isolates from spoilage raw milk and pasteurized milk samples were obtained by using *Pseudomonas* CFC Agar. The lipolytic activities of all the isolates were qualitatively determined in Tributyrin Agar and Rhodamine B Agar.

These isolates were tested for Gram stain and selected Gram negative isolates. Additionally, catalase and oxidase tests, growth on Mac Conkey Agar and O/F tests were employed. Isolates determined as Gram-negative, catalase and oxidase positive, lactose negative and oxidative metabolism were identified at species level by means of API 20NE identification test. A total 37 isolates characterized and 36 (97.30%) of the isolates were identified as *P. fluorescens*, 1 (2.70%) was identified as *P. putida*. Lipase activity was quantitatively measured through a spectrophotometer using *p*-nitrophenyl palmitate as substrate. All strains displayed lipase activity. This strains of lipase activity between 10.03 U/ml and 22.16 U/ml was found and *P. fluorescens* RB02-3 was determined to give the highest lipase activity. Time course of enzyme production by *P. fluorescens* RB02-3 was observed in basal medium and maximum activity was produced in the late logarithmic phase after 40h and levels increased once the stationary phase was reached. The extracellular lipase of *P. fluorescens* RB02-3 strain was homogeneously purified using a combination of ammonium sulfate precipitation, dialyze and gel filtration column chromatography with

Sephadex G-100. An extracellular lipase from *P. fluorescens* RB02-3 strain was purified 2.97 fold with 20.3% recovery. The molecular mass of the purified enzyme was determined to be approximately 57 kDa by SDS-PAGE.

After that, the enzyme was characterized and enzyme exhibited maximum activity at pH 7.0 and 50 °C, respectively. The enzyme exhibited the highest stability in the presence of various organic solvents such as hexane, ethyl acetate and butanol, but isopropanol and ethanol enhanced lipase activity. The lipase was slightly inhibited in the presence of MnCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂ and EDTA whereas SDS and Tween 80 had no effect on its activity.

Keywords : *Pseudomonas*, lipase, milk, purification, characterization

Page number : 131

Adviser : Doç.Dr. Aysel UĞUR

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No.</u>	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 2.1. Lipazların katalizlemesi sonucu triaçilgliserollerden gliserol ve yağ asitlerinin oluşumu.....	4
Şekil 2.2. Lipazın katalizlediği transesterifikasyon reaksiyonu.....	5
Şekil 2.3. Lipazın katalizlediği interesterifikasyon reaksiyon.....	6
Şekil 2.4. Bakteriyel lipazların bölgesel seçiciliği.....	27
Şekil 3.1. API 20NE'ya ait boş sonuç çizelgesi.....	49
Şekil 4.1. RB02-3 izolatının Tribütirin Agar besiyerinde görünümü.....	63
Şekil 4.2. İzolat RB02-3'ün Rhodamin B Agar besiyerinde görünür ışıkta oluşturduğu pembe renkli koloniler	64
Şekil 4.3. İzolat RB02-3'ün Rhodamin B Agar besiyerinde oluşturduğu pembe renkli kolonilerin UV ışığı altındaki görünümü	64
Şekil 4.4. İzolat RB02-3'ün katalaz ve oksidaz testleri sonucunda verdiği pozitif reaksiyon	65
Şekil 4.5. İzolat RB02-3'ün Mac Conkey Agar besiyerindeki görünümü.....	67
Şekil 4.6. İzolat RB02-3'ün O/F testi görünümü.....	67
Şekil 4.7. İzolat RB02-3'ün API 20NE stripindeki reaksiyonları.....	67
Şekil 4.8. <i>pNPP</i> 'in substrat olarak kullanıldığı lipaz aktivitesi standart grafiği.....	72
Şekil 4.9. <i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-3 suşunun Bazal Medium'daki hücre yoğunluğu (◆) ve ekstraselüler lipaz aktivitesi (■).....	74
Şekil 4.10. Birinci kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarındaki ekstraselüler lipaz aktiviteleri	75
Şekil 4.11. İkinci kolon kromatografisi fraksiyonlarındaki ekstraselüler lipaz aktiviteleri	76
Şekil 4.12. Bovine Serum Albumin kullanılarak hazırlanan standart eğri.....	77
Şekil 4.13. <i>P. fluorescens</i> RB02-3 suşu ekstraselüler lipazının II. kolon kromatografisi sonucu SDS-PAGE'deki protein profili.....	78
Şekil 4.14. <i>P. fluorescens</i> RB02-3 suşuna ait lipaz enziminin farklı pH değerlerinde enzim aktivitesi	79
Şekil 4.15. <i>P. fluorescens</i> RB02-3 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki enzim aktivitesi	80

Şekil 4.16. <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı organik solventlerin etkisi	82
Şekil 4.17. Ağır metallerin <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine etkisi	83
Şekil 4.18. Çeşitli ajanların <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine etkisi	83

TABLolar/ ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Tablo No.</u>	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 2.1. Lipolitik enzim familyaları.....	9
Tablo 3.1. API 20NE striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları.....	50
Tablo 4.1. İzolatların API 20NE identifikasyon testi sonuçları.....	69
Tablo 4.2. <i>Pseudomonas</i> izolasyonu yapılan süt örnekleri.....	70
Tablo 4.3. Suşların ekstraselüler lipaz aktiviteleri	73
Tablo 4.4. <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşuna ait saflaştırma basamaklarındaki protein ve ekstraselüler lipaz enzim aktivitesi ve miktarları.....	77
Tablo 4.5. <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin farklı pH değerlerinde enzim aktivitesi	79
Tablo 4.6. <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki enzim aktivitesi	80
Tablo 4.7. <i>P. fluorescens</i> RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı organik solventlerin etkisi	81

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Sembol ve Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
E.C.	Enzim sınıflandırılması
vb	ve benzeri
%	Yüzde
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
°C	Santigrat derece
EDTA	Etilen diamin tetra asetikasit
cm	Santimetre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
dk	Dakika
sn	Saniye
gr	Gram
mM	Milimolar
M	Molarite
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ O	Su
NaCl	Sodyum klorür
α	Alfa
β	Beta
U	Unite
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
µm	mikromol
kDa	kilodalton
Da	Dalton
UV	Ultraviyole
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit

1. GİRİŞ

Teknolojinin gelişmesine paralel olarak enzimlerin kullanım alanları ve biyoteknolojik uygulamaları artmaya başlamıştır. Dolayısıyla dünya genelindeki enzim üretimi son yıllarda hızla artış göstermiş ve enzim üretim sektörü gelişmeye açık büyük bir pazar haline gelmiştir (Pandey vd., 1999). Endüstriyel enzimlerin, dünya piyasasındaki bütçesinin 2004 yılında 2 milyar dolar olduğu tahmin edilmekte ve % 3.3'lük yıllık ortalama artış oranı ile 2009'da 2.4 milyar dolar olması beklenmektedir (Rajan, 2004). Endüstriyel enzim pazarında büyük bir paya sahip olan hidrolitik enzimler içinde yer alan lipazlar, endüstriyel uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadırlar (Jaeger vd., 1994, 1999; Pandey vd., 1999). Lipazların, karbohidrolazlar ve proteazlar kadar büyük bir piyasa payına sahip olmamasına rağmen bu grup 1995'te % 100'lük yükselme ile en büyük talep artışını göstermiştir. Bu hızlı büyümenin devam edeceği ve talebin 2015'te % 71'lik artış göstermesi beklenmektedir (Heler, 2006).

Lipazlar endüstriyel uygulamalarda; lipid içeren atık suların enzimatik degradasyonunda, organik sentezlerde, deterjan formülasyonlarında, tekstil sanayinde, biyosüpfaktanların sentezinde, kağıt yapımında, farmasötiklerde, agrokimyasal (tarım kimyası) endüstride, pestisitlerde, gıda endüstrisinde, süt endüstrisinde, kozmetiklerde, oleokimyasal endüstride, deri endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Jaeger vd., 1994; Gunstone, 1999; Pandey vd., 1999; Sharma vd., 2001; Gupta vd., 2004).

Endüstriyel alanda kullanılan lipazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunmakla birlikte, mikrobiyal orijinli lipazlar, biyoteknolojik uygulamalar ve organik kimyada yüksek oranda kullanılmaktadırlar. Özellikle ekstraselüler mikrobiyal lipazlar ticari olarak çok önemli olup, bunların üretimi diğer kaynaklara göre çok daha kolaydır (Gupta vd., 2004).

Pseudomonas cinsi, lipazların da dahil olduğu çok sayıda ekstraselüler enzim üretmektedir (Stead, 1986). Birçok farklı bakteri tarafından üretilen bakteriyal lipazlar içerisinde *Pseudomonas*'ların ürettiği lipazların cazipliği, sahip oldukları enantiospesifik biyokatalitik etkinliği, organik solvent toleransı, geniş sıcaklık ve pH aralığında aktif ve substrata spesifik olmaları nedeniyledir. Bu özellikleri

günümüzde ve gelecekte tercih edilecek biyokatalizörler olacaklarını göstermektedir (Gupta vd., 2004). Ayrıca *Pseudomonas* lipazları, diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen lipazlar arasında yaygın olmayan, ısıya dirençli (termoresistant) ve alkali pH'da aktif olmaları gibi özel biyokimyasal karakterler göstermeleri sebebiyle özellikle deterjan uygulamalarında büyük önem taşımaktadırlar (Lin vd., 1996; Kulkarni ve Gadre, 1999; Martinez ve Soberón-Chávez, 2001). *Pseudomonas* lipazlarına olan bu ilginin sebebi, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel faydalarından yararlanmaktır.

Lipaz kaynağı olarak kullanılabilen mikroorganizmaların izole edilebileceği değişik materyaller doğada mevcut olmakla birlikte, süt içerdiği laktoz, süt yağı, azot kaynağı, mineral maddeler ve yüksek su oranı nedeni ile birçok bakterinin gelişebilmesi için uygun bir besiyeri ortamı oluşturmaktadır (Jackson, 1990; Ünlütürk ve Turantaş, 1998). Bununla birlikte süt yağında 100.000'den fazla farklı triaçilgliserol bulunduğu için (Larsson, 1994) süt ve süt yağı lipaz üretimini uyarmaktadır (Stead, 1986; Aires-Barros vd., 1994). *Pseudomonas sp.*, işlem görmemiş ve pastörize sütlerde bozulma esnasında en yaygın bulunan organizmalardır (Sørhaug ve Stepaniak, 1997; Deeth vd., 2002; Mc Phee ve Griffiths, 2002). Bunlar soğutulmuş sütte hızlı gelişme yeteneklerinin yanında ısı stabil ekstarsellüler proteazlar, lipazlar ve fosfolipazlar üretirler ve bazı enzimler pastörizasyon ve hatta UHT (Ultra High Temperature) ısı işlemleriyle hayatta kalabilmektedirler (Braun vd., 1999).

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

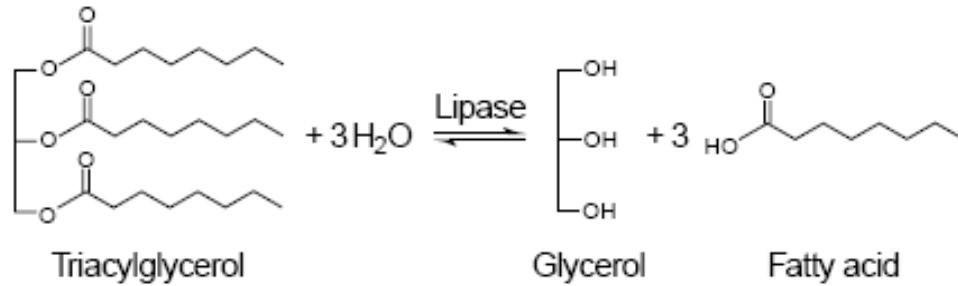
amaçlanmıştır. *Pseudomonas* cinsi bozulmakta olan sütlerde dominant florayı oluşturduğu için yapılan çalışmada izolasyon kaynağı olarak süt seçilmiştir. Sütten izole edilen *Pseudomonas*'lardan en yüksek lipaz aktivitesi gösteren suş seçilip sahip olduğu lipazın çeşitli ayırma teknikleri kullanılarak saflaştırılması ve moleküler ağırlığının belirlenmesi, bu lipazın endüstride kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla da saflaştırılmış lipazın karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Lipazların Genel Özellikleri

Lipazlar, enzim sınıflandırmasında sırasıyla hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) ve triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar (Anonim, 1992). Lipazlar lipit-su ara yüzeyinde aktif olup (Sugihara vd., 1992; Lee ve Rhee, 1993; Telefoncu, 1993; Sharma vd., 2001; Chen vd., 2003; Sayari vd., 2005), suda çözünmeyen uzun zincirli trigliseritlere karşı maksimum aktive gösterirler (Arpigny ve Jaeger, 1999; Dröge, 2004).

Bu enzimler suda çözünmeyen trigliseritleri di ve mono-açilgliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizlerler (Şekil 2.1) (Jaeger vd., 1999; Cardenas vd., 2001; Kojima ve Shimizu, 2003; Angkawidjaja ve Kanaya, 2006).

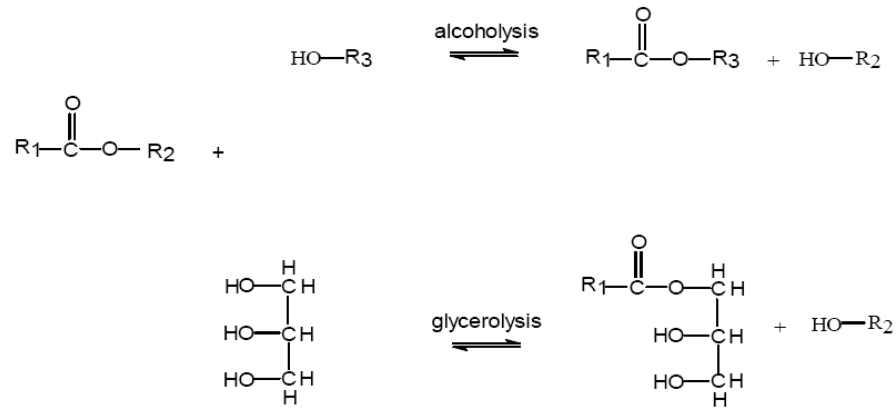


Şekil 2.1. Lipazların katalizlemesi sonucu triaçilgliserollerden gliserol ve yağ asitlerinin oluşumu (Jaeger ve Reetz, 1998)

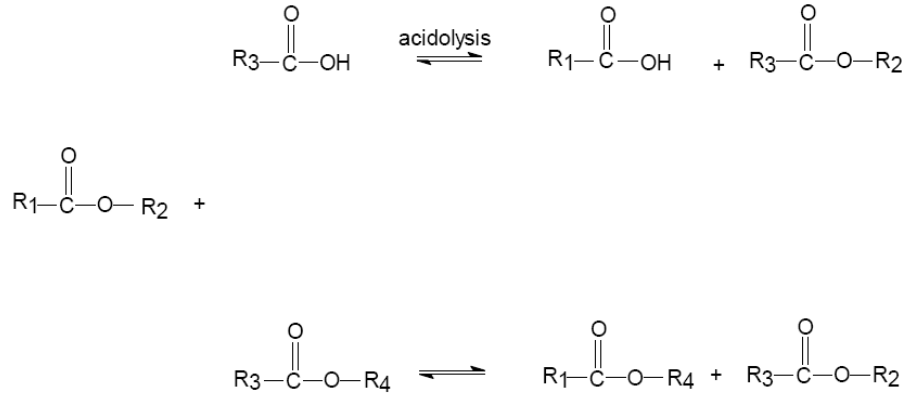
Lipazlar, doğal olarak triaçilgliserollerin ester bağlarını parçalayan hidrolitik aktiviteye sahip olsalar da, suyun az bulunduğu ortamlarda ester sentezini de katalizleyebilirler (Balcão vd., 1996). Karışımdaki suyun miktarı, lipaz katalizleme reaksiyonunun yönünü tayin eder (Macrae ve Hammond, 1985; Sharma vd., 2001). Suyun çok az olması veya hiç bulunmaması halinde esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları tercih edilmektedir (Jang vd., 1998; Jennings ve Akoh, 2000; Sellappan ve Akoh, 2001; Adlercreutz vd., 2002). Suyun fazla olduğu

durumlarda ise sadece hidroliz reaksiyonu meydana gelmektedir (Klibanov, 1997). Lipazlar, hem sulu hem de susuz solvent sistemlerinde aktivite gösterdikleri için (Zaks ve Klibanov, 1985; Reetz ve Jaeger, 1998; Jaeger vd., 1999; Wang vd., 2001; Gupta vd., 2004; Nie vd., 2006), endüstride ve tıptaki uygulamalarda önemli bir yere sahiptirler (Andree vd., 1980; Bjokling vd., 1991).

Ester sentez reaksiyonları reaksiyonun tabiatına bağlı olarak esterifikasyon, transesterifikasyon ve interesterifikasyon olarak sınıflandırılabilir. Esterifikasyon reaksiyonu gliserol ve yağ asitlerinden gliserol esterlerin sentezine dahil olan reaksiyondur (Kulkarni, 2002). Lipiterin transesterifikasyon reaksiyonu açıl alıcının tipine bağlı olarak değişmektedir. Bir trigliseritten bir açıl grubu gliserole aktarılıyorsa reaksiyona gliseroliz; bir alkolle aktarılıyorsa alkoliz adını almaktadır (Şekil 2.2) (Jaeger vd., 1994; Kulkarni, 2002). İnteresterifikasyonda ise, açıl grup gliserid ve yağ asidi (asidoliz) ya da yağ asidi esterleri arasında değiştirilir (Şekil 2.3) (Kulkarni, 2002).



Şekil 2.2. Lipazın katalizlediği transesterifikasyon reaksiyonu (Kulkarni, 2002)



Şekil 2.3. Lipazın katalizlediği interesterifikasyon reaksiyon (Kulkarni, 2002)

Lipazlar, genellikle hidroliz reaksiyonları ve sentez veya açıl değişim reaksiyonları arasında farklı olabilen yüksek oranda kimyasal, bölgesel veya enantioselektif bütün reaksiyonları gerçekleştirirler (Gunstone, 1999).

2.2. Lipaz Kaynakları

Lipazlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur (Borgstrom ve Brockmann, 1984; Telefoncu, 1986; Cortez vd., 1999; Carriere vd., 1991; Mukherjee ve Hills 1994; Winkler ve Gubernator 1994; Gao vd., 2000; Kojima ve Shimizu, 2003). Bazı hayvansal lipazlar memeli pankreatik lipazları, memeli gastrik, pregastrik, ruminantların mide içi tarafından üretilen dilsel lipazları, balık ve omurgalıların sindirim lipazları, lipoprotein lipazları, doku lipazları ve süt lipazlarıdır. Bitkilerde lipazlar en çok yağlı tohumlarda ve daha az derecede tahıl tanelerinde bulunur (Mukherjee ve Hills, 1994).

Ökaryotlarda lipazlar; yağların sindirimi, absorpsiyon, yeniden oluşum ve lipoprotein metabolizmasının dahil olduğu lipid metabolizmasının farklı aşamaları için gereklidir. Bitkilerde lipazlar enerji rezerv dokularında bulunmaktadır (Balashev vd., 2001).

Lipazlar doğada bol bulunmasına rağmen (Faber 1997; Schmid 1998; Klivanov, 1997, 2001) sadece mikrobiyal lipazlar ticari olarak önemlidir (Wiseman, 1995;

Saxena vd., 2003b). Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, yüksek verim imkânının olması, genetik manipülasyonlarının kolaylığı, mevsimsel dalgalanmanın olmamasından dolayı düzenli kaynağının olması ve pahalı olmayan ortamlarda mikroorganizmaların gelişiminin kolay olmasıdır (Wiseman 1995). Lipazların hayvansal ve bitkisel dokulardan elde edilmeleri güçtür. Çünkü bu tür dokularda, hücrenin ya da hücre duvarının parçalanması gereklidir ve bunun için ekstra hücre parçalayıcılara ihtiyaç vardır. Bu işlemler sırasında enzimin yapısına da zarar verilebilmektedir (Taipa vd., 1992). Mikroorganizmaların ekstraselüler lipaz üretebilme kabiliyetleri mikrobiyal lipazların elde edilmesini kolay (Rathi vd., 2001) ve ekonomik kılar (Sharma vd., 2001). Bunun yanı sıra, mikrobiyal lipazlar küçük hacimlerde çok büyük miktarlarda (Jaeger ve Eggert, 2002) üretilenlerinden endüstriyel açıdan hayvansal ve bitkisel lipazlardan daha önemlidirler (Gill ve Parish, 1997). Mikrobiyal enzimler aynı zamanda bitkisel ve hayvansal enzimlerden daha stabildir ve bunların ürünleri daha kullanışlı ve güvenlidir (Wiseman, 1995).

Lipaz üreten mikroorganizmalar; bakteri, maya ve küflerdir (Sharma vd., 2001). Bu mikroorganizmalar, değişik alanlardaki topraklar (Nishio vd., 1987; Palmeros vd., 1994; Lin vd., 1996; Sztajer vd., 1988; Dong vd., 1999; Gao vd., 2000; Haba vd., 2000; Jinwal vd., 2003), endüstriyel atıklar (Sztajer vd., 1988; Gombert vd., 1999), kompost yığınları (Gowland vd., 1987, Wang vd., 1995; Rathi vd., 2000; Tsai vd, 2007), kömür madenleri (Gowland vd, 1987; Wang vd., 1995), sıcak su kaynakları (Gowland vd., 1987; Wang vd., 1995; Lee vd., 1999; Castro-Ochoa vd., 2005; Li ve Zhang, 2005), okyanuslar (Feller vd., 1990), yüksek tuzlu ya da şekerli çevreler (Elwan vd., 1985, Ghanem vd., 2000) gibi farklı habitatlardan izole edilmişlerdir.

Mikrobiyal orjinli lipazlardan en çok bakteriyel ve fungal orjinli lipazlar, biyoteknolojik uygulamalarda ve organik kimyada en çok kullanılan enzim sınıfı olarak tanımlanmaktadır (Gupta, 2004). Bakterilerde lipazın varlığı 1901'den önce *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyneus* ve *Bacillus fluorescens*'de gözlenmiştir (Eijkman, 1901; Jaeger vd., 1994). Günümüzde ise *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Microccus*, *Propionobacterium*,

Streptococcus, *Streptomyces* cinslerinden elde edilen bakteriyal lipazlar, *Candida* ve *Saccharomyces* tarafından üretilen maya lipazları ve *Rhizopus*, *Penicilium*, *Aspergillus*, *Geotricum*, *Mucor* tarafından üretilen fungal lipazlar ve diğer suşlara dahil lipazlar (Godtfredsen, 1990; Hou, 1994; Jaeger vd., 1994; Miura ve Yamane, 1997; Lotrakul ve Dharmstithi, 1997; Jaeger ve Reetz 1998; Chen vd., 1999; Gupta vd., 2007) ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen çok az sayıda yabancı veya rekombinant suş ticari olarak kullanılabilir. Bakteriler arasında *Pseudomonas* türlerinin iyi miktarda lipaz ürettiği ile ilgili kayıtlar vardır (Bornscheuer vd., 1994). Ticari olarak üretilen maya kaynaklı lipazlar ise en çok *Candida rugosa* ve *Candida antarctica* türlerinden elde edilmektedirler (Jaeger ve Reetz, 1998).

Arpigny ve Jaeger (1999), ilk defa bakteriyal lipolitik enzimleri aminoasit sekansı ve biyolojik özellikleri farkına göre sekiz familyada sınıflandırmıştır (Tablo 2.1). Familya I en büyük gruptur ve altı subfamilyaya ayrılmıştır, bunlardan I-1, I-2 ve I-3 Gram negatif bakteriyel gerçek lipazlardır (Jaeger ve Eggert, 2002). *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. fluorescens* C9, *P. wisconsinensis*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Proteus vulgaris* lipazları familya I.1; *Pseudomonas luteola*, *Burkholderia glumae*, *B. cepacia* ve *Chromobacterium viscosum* lipazları familya I.2; *P. fluorescens* ve *Serratia marcescens* lipazları familya I.3 içinde yer almaktadır (Arpigny ve Jaeger, 1999). Familya I-1 ve I-2 lipazları yüksek oranda benzer aminoasit sekansı (30–40 %) gösterirken (Arpigny ve Jaeger, 1999), familya I-3 lipazı diğer I-1 ve I-2 lipaz familyalarıyla çok az aminoasit sekans benzerliği (< 20 %) göstermektedir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

Tablo 2.1. Lipolitik enzim familyaları (Arpigny ve Jaeger, 1999)

Family	Subfamily	Enzyme-producing strain	Accession no.	Similarity (%)		Properties			
				Family	Subfamily				
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>	D50587	100		True lipases			
		<i>Pseudomonas fluorescens C9</i>	AF031226	95					
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57					
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43					
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40					
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39					
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38					
		2	<i>Burkholderia glumae*</i>	X70354	35		100		
			<i>Chromobacterium viscosum*</i>	Q05489	35		100		
			<i>Burkholderia cepacia*</i>	M58494	33		78		
			<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33		77		
			<i>Pseudomonas fluorescens SIK W1</i>	D11455	14		100		
	<i>Serratia marcescens</i>		D13253	15	51				
	6	4	<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16	100	Phospholipase		
			<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80			
			<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	100			
			<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94			
			<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	29			
			<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	28			
		5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	26			
			<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100			
			<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	U80063	14	50			
			II (GDLS)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P1 0480	100			Secreted acyltransferase
				<i>Streptomyces scabies*</i>	M57297	36			Secreted esterase
III			3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35			OM-bound esterase
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014		28		OM-bound esterase			
	<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379		28		Secreted esterase			
	<i>Streptomyces exfoliatus*</i>	M86351		100		Extracellular lipase			
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114		82		Extracellular lipase			
	<i>Moraxella sp.</i>	X53053		33		Extracellular esterase 1			
	IV (HSL)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100		Esterase			
		<i>Pseudomonas sp. B11-1</i>	AF034088	54		Lipase			
		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48		Carboxylesterase			
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40		Putative lipase			
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36		Carboxylesterase			
		<i>Moraxella sp.</i>	X53868	25		Extracellular esterase 2			
V	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100		PHA-depolymerase				
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		Putative esterase				
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		Extracellular esterase				
	<i>Moraxella sp.</i>	X53869	34		Extracellular esterase 3				
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32		Esterase				
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	20		Esterase				
VI	<i>Synechocystis sp.</i>	D90904	100		Carboxylesterases				
	<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50						
	<i>Pseudomonas fluorescens*</i>	S79600	24						
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20						
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16						
	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100		Carbamate hydrolase				
VII	<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48		<i>p-Nitrobenzyl esterase</i>				
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45		Putative carboxylesterase				
	VIII	<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492	100		Stereoselective esterase			
		<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43		Cell-bound esterase			
		<i>Pseudomonas fluorescens SIK W1</i>	AAC60471	40		Esterase III			

* Lipolytic enzyme with known 3D structure.

2.2.1. Pseudomonal lipazlar

Pseudomonas'lar *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alırlar (Sneath vd., 1986). 0.5-1.0 µm çapında, 1.5-5.0 µm uzunluğunda düz veya hafif eğimli basillerdir. Gram negatiftirler. Hareketli olması bu cinsin karakteristik özelliğidir. *Pseudomonas* türlerinin en önemli özelliği çok farklı yapıdaki organik bileşikleri kullanabilecek metabolik mekanizmaya sahip olmalıdır (Holt vd., 1994). *Pseudomonas* cinsi bakterilerin çoğu doğada, toprak ve sularda yoğun olarak bulunurlar (Brooks, vd. 1998). *Pseudomonas*'ların çevrede geniş bir yayılım göstermeleri çok basit gelişim ihtiyaçlarına sahip olmalarından kaynaklanmaktadır

(Palleroni, 1984).Glikozu parçalayıp asit oluştururlar. Ancak laktoz ve sukroza etki etmezler. İndol ve H₂S negatifirler. Metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri negatiftir. Üreyi amonyak haline ya da amonyağı üreye çevirebilirler ve bunları azot kaynağı olarak kullanabilirler (Vasil, 1981; Palleroni, 1984). Hepsi olmamakla birlikte çoğu asidik ortamlarda gelişemezler. *P. syringae* ve *P. viridiflava* hariç oksidaz pozitifirler (Holt vd., 1994). Katalaz pozitifirler (Palleroni, 1984). Minimal besin ihtiyaçlarını 4 – 42 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında tolere edebilirler (Brooks vd., 1998). *Pseudomonas* 'ların çoğu türleri için, en iyi gelişme sıcaklığı 28 °C'dir (Palleroni, 1984).

Gram negatif bakteriler lipaz üretimi açısından ele alındığında *Pseudomonas* 'lar bu grup içinde kuşkusuz ki en önemli cinslerden biridir. Bu cinse ait lipazların cazipliği, sahip oldukları enantiyospesifik biyokatalitik etkinliği ve organik solvent toleransı ve buna ilaveten alkali ve termostabil olması nedeniyledir (Singh ve Banerjee, 2007).

Pseudomonas cinsi bakterilerin üretmiş olduğu lipazların çoğunluğu hücre dışıdır. Aminoasit sekans analizlerine göre yapılan değerlendirme sonucunda *Pseudomonas* lipazları moleküler ağırlıklarının (M_r) artışına göre üç gruba ayrılmıştır. Grup-I, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fragi* ve diğer *Pseudomonas* türlerini içeren moleküler ağırlığı en küçük lipazların bulunduğu birinci gruptur. Grup-I lipazları, yaklaşık 285 aminoasit içeren ve M_r değeri yaklaşık 30.000 dalton olan lipazları kapsamaktadır. Grup-II lipazları, *P. cepacia* ve *P. glumae* türlerini kapsamaktadır. Bu grup lipazlar, yaklaşık 320 aminoasit içeren ve M_r değeri yaklaşık 33.000 dalton olanları içeren bir gruptur. Grup-III ise yaklaşık 475 aminoasitten oluşan ve M_r değeri yaklaşık olarak 50.000 dalton olan ve *P. fluorescens* gibi bakterilere ait büyük moleküler ağırlığı olan lipazları içerir (Jaeger vd., 1994).

2.2.2. Sütlerde Pseudomonal lipazlar

Süt endüstrisinin temel hammaddesi olan çiğ süt, sağıldığı hayvandan başlamak üzere sağım, depolama ve süt işleme fabrikalarına taşınması sırasında mikrobiyal kontaminasyona maruz kalabilmektedir. Çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesi işlenecek ürünün kalitesini de doğrudan etkilediğinden büyük önem taşımaktadır.

Mikroorganizma faaliyeti sonucu sütün renk, tat, koku, yapı ve kıvamında meydana gelen değişmeler ürünlere de doğal olarak yansımaktadır (Karakuş, 1993). Sütlerin depolama tanklarında uzun süre ve düşük ısılarda depolanması psikrotrofik bakteri sayısının hızla artmasına neden olmaktadır (Karakuş, 1993). Çünkü süt içerdiği laktoz, süt yağı, azot kaynağı, mineral maddeler ve yüksek su oranı ile birçok bakterinin gelişebilmesi için uygun bir besiyeri ortamı oluşturmaktadır (Jackson, 1990; Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Çok değişik cinslere ait, sütlerde bozulmaya sebebiyet veren bakteri süttten izole edilmiştir. Bunlar *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* ve *Escherichia*, *Citrobacter* ve *Klebsiella* gibi koliformları kapsamaktadır (Shah, 1994; Stepaniak, 2000; Hayes ve Boor, 2001). *Pseudomonas spp.*, işlem görmemiş ve pastörize sütlerde bozulma esnasında en yaygın bulunan organizmalardır (Sørhaug ve Stepaniak, 1997; Deeth vd., 2002; Mc Phee ve Griffiths, 2002). Bunlar taze sütteki toplam mikrofloranın % 10'undan daha az bir kısmını oluşturmaktadırlar (Suhren, 1989). Fakat soğutmanın uzamasıyla, *Pseudomonas spp.* çiğ sütün hakim mikroflorasını oluşturmaktadır. Bu organizmalar çiğ sütteki diğer mikroflora ile karşılaştırıldığı zaman soğutma sıcaklıklarında çok kısa jenerasyon zamanına sahiptirler (Chandler ve McMeekin, 1985; Suhren, 1989). Bunlar 4 °C'de işlem görmüş sıvı sütlerin raf ömrünü sınırlandırmaktadırlar (Cousins ve Bramley, 1981; Craven ve Macauley, 1992; Ternström vd., 1993).

Yapılan pek çok çalışma *Pseudomonas*'ların çiğ ve pastörize sütlerde dominant florayı oluşturduğunu göstermektedir. Örneğin 4 °C'de 1 hafta depolanan çiğ süt örneklerinden izole edilen psikrotrofların % 70-90'ının (Adam vd., 1975), pastörize süt örneklerinden izole edilen psikrotrofik bakterilerin ise % 87'sinin (Craven ve Macauley, 1992) *Pseudomonas* olduğu kaydedilmiştir. Bunlar daha çok *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. putrefaciens* ve daha az sıklıkta olmak üzere *P. aeruginosa*'dan oluşmaktadır (Gilmour ve Rowe, 1990).

P. fluorescens'in ise süt ve süt ürünlerinde en çok karşılaşılan tür olduğu bildirilmektedir (Stevenson vd., 2003). Literatürde *P. fluorescens*'in çiğ süt örneklerinin % 84'ünde mevcut olduğu (Gennarl ve Dragotta, 1992) ve çiğ süttten

izole edilen tüm bakterilerin % 55.6'sından daha fazlasını oluşturduğu (Ternström vd., 1993) kaydedilmiştir. Başka bir çalışmada 6 °C'de depolanan çiğ süt örneğinden izole edilen 9 izolatın 8' inin *P. fluorescens* ve 1'inin de *P. putida* olduğu (Rowe vd., 2003), yağsız süt, yarım yağlı süt ve yağlı süt örneklerinden izole edilen 37 *Pseudomonas*'ın ise tamamının *P. fluorescens* olduğu kaydedilmiştir (Rajmohan vd., 2002). Dogan ve Boor (2003) yaptıkları çalışmada çiğ sütler, işlenmiş sütler ve süt işleme fabrikası çevresinden izole edilen 338 *Pseudomonas*'ın % 51'ini *P. fluorescens*, % 14'ünü *P. putida* ve % 25'ini ya *P. fluorescens* ya da *P. putida* olarak tanımlanmıştır. Bir başka çalışmada ise 13 çiğ süt örneğinden izole edilen 68 bakterinin ise 60'ı (% 88) psikrotrof olarak bulunmuştur. Yapılan identifikasyonda 33 izolat (% 49.2) tanımlanmış ve bunlardan 27'si *P. fluorescens* 1'i de *P. aeruginosa* olarak tanımlanmıştır (Alatossava ve Alatossava, 2006).

Mikrobiyal kontaminasyona uğramamış temiz ve taze sütte 50–60 farklı enzim aktivitesi kaydedilmiş olup (Andrews, 1991; Muir, 1996) bunlardan sadece birkaç tanesinin süt ve süt ürünlerinin kalite ve yarılanma ömründe büyük bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Muir, 1996). Bunların en önemlilerinin ise proteaz ve lipaz olduğu rapor edilmiştir. Depo edilmiş sütler (çiğ ya da işlenmiş) mevcut enzimler dışında kontamine bakteri orjinli enzimler de içerebilmektedirler (Chen vd., 2003). Yapılan çalışmalar sütlerde psikrofil mikroorganizma sayısındaki artışla, mikroorganizmaların salgıladıkları enzimler arasında da paralellik olduğunu göstermektedir. Örneğin bir çalışmada sütteki psikrofil popülasyon ml'de 10^5 – 10^6 oranına ulaştığında lipaz ve proteaz enziminde artış olduğu kaydedilmiştir (Rowe ve Gilmour, 1985; Stead, 1986).

Süt, lipaz üretimi için iyi bir vasattır. Çünkü süt yağının yaklaşık % 98'i triaçilgliserollerden oluşmaktadır (Taylor ve MacGibbon, 2002) dolayısıyla süt ve sütte bulunan süt yağı lipaz üretimini uyarmaktadır (Stead, 1986; Aires-Barros vd.,1994). Lipazlar, ekşimeye neden olan serbest yağ asitlerinin oluşumuna yol açtıklarından gıdaların bozulmasına sebep olurlar. Özellikle et ve süt ürünleri, balık gibi sıkça tüketilen gıdalarda başlıca bozulma sebeplerinden birini oluşturmaktadırlar (Jos ve Veld, 1996; Kim vd., 2004).

Pseudomonas'lar sütlerde lipolitik degradesyondan sorumlu temel bakterilerdir (Shah, 1994; Mc Phee ve Griffiths, 2002). Bunlar soğutulmuş sütte hızlı gelişme

yeteneklerinin yanında ısı stabil ekstarsellüler proteazlar, lipazlar ve fosfolipazlar üretebilmektedirler (Braun vd., 1999). Uygulanan ısı işlemleri bakterilerin vejetatif formlarını ortadan kaldırmakta ise de bunların enzimleri aktivitelerini koruyarak depolama sırasında ürünlerde istenmeyen tat ve aroma bozukluklarına neden olmaktadır (Karakuş, 1993). Örneğin çiğ sütün izole edilen psikrotrof *Pseudomonas* türlerinin ürettiği ham lipaz çiğ sütün 63 °C'de 30 dakika ısı işleminden sonra % 55-100 oranda aktivitede (Law vd., 1976) ve yağsız sütün 100 °C'de 30 saniye ısı işleminden sonra % 75-100 oranında aktivitesini korumuştur (Fitz-Gerald vd., 1982).

Sütte bulunan psikrofil bir bakteri olan *P. fluorescens* SIK W1'in, kısa ve orta zincirli triaçilgliserollere karşı yüksek bir lipolitik aktivite gösteren ısıya dayanıklı lipaz ürettiği tespit edilmiş ve bu lipazın sütün doğal bozulmasından sorumlu olabileceği rapor edilmiştir (Kim vd., 2005). Ayrıca sütün izole edilen *P. fluorescens* izolatlarının 7 °C'de % 7'si, 22 °C'de % 44'ü, 32 °C'de % 7'sinin lipolitik aktivite gösterdiğini gözlenmiştir (Wang ve Jagarao, 2001). Yapılan başka bir çalışmada ise, çiğ ve işlenmiş süt ürünlerinden izole edilen 66 *Pseudomonas*'ın 38'inin (% 58) lipaz aktivitesi gösterdiği (Wiedmann vd., 2000), çiğ sütler, işlenmiş sütler ve çevresel örneklerden izole edilen 338 *Pseudomonas* izolatının % 67'sinin lipaz aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir (Dogan ve Boor, 2003).

2.3. Lipaz Analiz Metotları

Lipaz aktivitesinin belirlenebilmesi için çok sayıda metot mevcuttur. Lipazlar, trigliseritleri hidrolize ederek serbest yağ asitleri ve gliserolün meydana gelmesine neden olurlar. Bu nedenle, bu enzimler için analiz metotları genel olarak serbest yağ asitlerinin oluşumunun analiz edilmesi şeklinde gelişmiştir (Jensen vd., 1983).

2.3.1. Kalitatif analiz

Mikrobiyal kültürlerin salgılamış olduğu lipaz katı besiyeri ortamında belirlenebilmektedir (Kulkarni, 2002). Bu amaçla değişik substratların kullanıldığı kalitatif analizler yapılmaktadır. Yaygın olarak Tribütirin Agar besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerinin substratı dört karbonlu sentetik bir trigliserit olan tribütirindir (Gao vd., 2000) ve bunun hidrolizi ile oluşan zon esteraz veya lipaz

aktivitesini vermektedir (Lee ve Rhee, 1993; Makhzoum vd., 1996; Kulkarni ve Gadre, 1999; Braun vd., 2001; Cardenas vd., 2001; Kanwar vd., 2002; Litthauer vd., 2002; Meghwanshi vd., 2006; Ertuğrul vd., 2007; Kiran vd., 2007; Côté ve Shareck, 2008).

Tribütirin Agar besiyerinde kullanılan yöntem alternatif olarak kullanılan diğer yöntemlerde katı besiyerlerine Nile Blue Sülfat (Lawrence vd., 1967; Converse vd., 1981; Christen ve Marshall, 1984; Samad vd., 1989), Victoria Blue (Lawrence vd., 1967; Converse vd., 1981; Christen ve Marshall, 1984; Gao vd., 2000; Dogan ve Boor, 2003; Alatossava ve Alatossava, 2006), Metil Red ve Fenol Red (Lawrence vd., 1967; Converse vd., 1981; Christen ve Marshall, 1984; Samad vd., 1989) gibi indikatör boyalar eklenerek renkli zon oluşumunun gözlenmesi ile analiz gerçekleştirilmektedir (Gupta vd., 2003). Bu metotta indikatör boya içeren büyüme ortamına emülsiyeye yağlar eklenmektedir. Yağların hidrolizi mikrobiyal kolonilerin etrafında renkli oluşum ya da floresan hâleler veya zonlara neden olmaktadır (Kulkarni, 2002). Bu testler katı besiyerlerinde lipolitik mikroorganizmaların gelişimlerini hızlı bir şekilde araştırmak için uygundur. Ancak bazı pozitif yanlış sonuçlar görülebilir. Bu durum, mikrobiyal lipazlar tarafından serbest bırakılan yağ asitlerinin asidik metabolit olmasından dolayı ortamın asidifikasyonundan kaynaklanmaktadır (Beisson vd., 2000; Gupta vd., 2003).

Bu durumu engellemek için Kouker ve Jaeger (1987) floresan Rhodamin B boyasını kullanarak 350 nm dalga boyunda UV ışığı altında turuncu floresan olarak lipolizis zonlarını göstermişlerdir. Rhodamin, serbest yağ asitleriyle floresan bir kompleks oluşturur. Böylece lipaz üreten koloniler UV ışığı altında floresan hâleler gösterir (Kouker ve Jaeger, 1987; Lee ve Rhee, 1993; Winteler vd., 1996; Kumura vd., 1998; Haba vd., 2000; Hube vd., 2000; Kim vd., 2001; Martinez ve Soberón-Chávez, 2001; Litthauer vd., 2002; Gupta vd., 2003; Kojima ve Shimizu, 2003).

Ayrıca zeytinyağı içeren besiyerlerinde (Hube vd., 2000; Martinez ve Soberón-Chávez, 2001) ve Tween 80 içeren besiyerinde şeffaf zonun gözlenmesi (Smibert ve Krieg, 1994; Sierra, 1957; Emanuilova vd., 1993) ile de lipaz aktivitesinin belirlenmesi mümkündür.

2.3.2. Kantitatif analiz

Serbest yağ asitlerinin oluşumunu araştırmak amacıyla kantitatif olarak titrimetrik (Makhzoum vd., 1996; Beisson vd., 2000; Deeth ve Touch, 2000; Litthauer vd., 2002; Ruiz vd., 2004; Kiran vd., 2007), spektrofotometrik (Kurooka vd., 1977; Rollof vd., 1984; Stuer vd., 1986; Lee ve Rhee, 1993; Lin vd., 1996; Beisson vd., 2000; Litthauer vd., 2002; Kiran vd., 2007), kromatografik prosedürler (TLC/GC/HPLC) (Kashyap vd., 1980; Ruiz ve Roudriguez-Fernandez, 1982; Veerraghavan, 1990; Maurich vd., 1991) ve immünolojik metotlar kullanılmaktadır (Jaeger vd., 1994; Beisson vd., 2000; Deeth ve Touch, 2000; Gupta vd., 2003; Ruiz vd., 2004).

Triaçilgliseroller lipazların doğal substratlarıdır ve spektrofotometrik metotlarda bunlar substrat olarak kullanılmaktadır (Kulkarni, 2002). Bu ölçüm temel olarak *p*-nitrofenol esterlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda meydana gelen *p*-nitrofenol'ün 410 nm'de kolorimetrik olarak tespit edilmesine dayanmaktadır (Winkler ve Stuckmann, 1979; Kademi vd., 2000; Barbaro vd., 2001; Gupta vd., 2002; Litthauer vd., 2002; Bendikienė vd., 2004; Kumar vd., 2005; Gilham ve Lehner, 2005).

Bu substratlara *p*-nitrofenil bütirat (Lee ve Rhee, 1993; Lee vd., 1999; Cho vd., 2000; Surinenaite vd., 2002; Lee vd., 2003; Wei vd., 2003; Bendikienė vd., 2004; Kim vd., 2005) ile birlikte, *p*-nitrofenil kaproat (Chen vd., 2004), *p*-nitrofenil kaprilat (Makhzoum vd., 1996; Baral ve Fox, 1997; Gupta vd., 2002), *p*-nitrofenil kaprat (Chen vd., 2004), *p*-nitrofenil laurat (Lin vd., 1996; Sakiyama vd., 2001), *p*-nitrofenil miristat (Chen vd., 2004), *p*-nitrofenil palmitat (Stuer vd., 1986; Kordel vd., 1991; Abramic vd., 1999; Kulkarni ve Gadre, 1999; Gupta vd., 2002; Litthauer vd., 2002; Lopes vd., 2002; Jinwal vd., 2003; Kumar vd., 2005; Karadzic vd., 2006; Ertuğrul vd., 2007; Gupta vd., 2007), *p*-nitrofenil stearat (Schuepp vd., 1997), *p*-nitrofenol valerat ve *p*-nitrofenol asetat (Gupta vd., 2002) örnek olarak verilebilir.

Ancak kısa zincirli esterler suda çözünür ve o nedenle bu hidroliz lipaz aktivitesinden ziyade esteraz aktivitesinin ölçülmesini sağlar. Asetat ve bütirat gibi kısa zincirli esterleri esteraz aktivitesini ölçerken, buna karşın laurat, palmitat veya oleat gibi daha uzun zincirler lipaz aktivitesini belirlemektedir (Gilham ve Lehner,

2005). Bu nedenle *p*-nitrofenil palmitat lipaz aktivitesinin ölçülmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Asidik pH'da *p*-nitrofenol absorbansı yoğun olarak etkilendiği için bu estrelerin bu pH' larda ölçümü sağlıklı yapılamamaktadır. Diğer taraftan kinetik ölçümler bazı lipazlar için uygun olmasa da, sadece nötral ya da alkalın pH' larda yapılabilmektedir (Kademi vd., 2000). *p*-nitrofenol farklı pH değerlerinde farklı absorpsiyon katsayıları verdiği için farklı pH ortamlarında standartların kullanılması gerekmektedir (Gilham ve Lehner, 2005).

Diğer kolorimetrik lipaz ölçümü naftil esterlerinin hidrolizine dayanmaktadır (Gilham ve Lehner, 2005). Renksiz β -naftil karpilat (oktanat) esterinin hidrolizi ile meydana gelen renkli β -naftol'un 560 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle yapılmaktadır (Degrassi vd., 1999; Gandolfi vd., 2000). α -naftil asetat, naftil propiyonat ve naftil bütirat gibi α -naftil esterleri bu analizde substrat olarak kullanılmaktadır (Gupta vd., 2003).

Renk üretiminin ölçülmesinden başka spektrofotometrik analizler yağ asitlerinin, kalsiyum veya bakırla çöktürülmesiyle yapılabilir. Substrat olarak Tween kullanılır ve absorbans artışı 500 nm' de ölçülmektedir (Von Tigerstrom ve Stelmaschuk, 1989).

Lipaz aktivitesinin kantitatif ölçümünde spektrofotometrik yöntemin dışında, lipaz aktivitesi sonucu ortamda oluşan yağ asitlerinin meydana getirdiği pH değişiminin ölçümüne dayalı zeytinyağı emülsiyon yöntemi (Gao vd., 2000; Kojima ve Shimizu, 2003), polivinil emülsiyon yöntemi (Omar vd., 1987; Kanwar ve Goswami, 2002; Kulkarni ve Gadre, 2002), pH-Stat yöntemi (Jaeger vd., 1994; Meyers vd., 1996; Beisson vd., 2000; Kambourova vd., 2003) gibi titrasyon yöntemleri de kullanılmaktadır.

2.4. Optimizasyon Koşulları

Çoğu bakteriyal lipazlar, ekstraselülerdir ve üremenin geç logaritmik fazında (Tan ve Gill, 1985) ve duraklama fazının başında üretilirler (Fox ve Stepaniak, 1983; Stuer vd., 1986; Sidhu vd., 1998; Matselis ve Roussis 1992; Makhzoum vd.,

1995). Lipazların, üretim periyodu birkaç saatten birkaç güne kadar değişebilir (Gupta vd., 2002).

Lipazların büyük ölçüdeki endüstriyel uygulamaları için büyük miktarlarda üretimleri gereklidir. Bu nedenle lipazın yüksek miktarda üretilbildiği koşulların belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır (Kanwar vd., 2002; Litthauer vd., 2002; Surinenaite vd., 2002; Jinwal vd., 2003; Gupat vd., 2006; Karadzic vd., 2006; Chen vd., 2007). Karbon ve azot kaynakları, sıcaklık, pH, inorganik tuzların konsantrasyonu ve oksijen varlığı gibi faktörler lipaz seviyesini etkilemektedir (Lee ve Rhee, 1993; Ghosh vd., 1996; Sharma vd., 2001; Chen vd., 2003).

Lipazlar genellikle indüklenebilir enzimler oldukları için lipaz aktivitesinin meydana gelebilmesinde başlıca faktörün her zaman için karbon kaynağı olduğu bildirilmektedir (Lotti vd., 1998). Bunlar genellikle yağ ya da triaçilgliseroller, yağ asitleri, hidrolize olabilen esterler, tweenler, safra tuzları ve gliserol gibi indükleyiciler varlığında üretilmektedir (Ghosh vd., 1996; Dharmstithi vd., 1998; Shirazi vd., 1998; Gao vd., 2000; Rathi vd., 2001). Örneğin en yüksek lipaz aktivitesini *Candida sp.* 99-125 mutanlığı susam yağı (Tan vd., 2003), *B. cepacia* hindistan cevizi, hardal yağı, keten tohumu yağı ve hurma yağı (Rathi vd., 2001) ve *Pseudomonas sp.* ise hardal yağı ve keten tohumu yağı (Rathi vd., 2000) kullanıldığında göstermiştir.

Fakat lipaz üretimi şekerler, şeker alkoller, polisakkaritler, süt suyu, kazamino asitleri ve diğer kompleks kaynaklar gibi karbon kaynaklarından da önemli ölçüde etkilenmektedir (Gilbert vd., 1991a; Lotrakul ve Dharmstithi 1997; Dharmstithi ve Kuhasuntisuk 1998; Ghanem vd., 2000; Rashid vd., 2001). *Bacillus sp*'nin % 0.5 pepton ve % 0.3 yeast ekstrakt bulunan bazal besiyerinde % 20 kesilmiş süt suyu + % 1 triolein içeren bazal ortamda en yüksek lipaz aktivitesi saptanmıştır (Ertuğrul vd., 2007). Oleik, lineik ve linoleik asitler gibi uzun zincirli yağ asitlerinin, *P. mephitica* gibi çeşitli bakterilerin lipaz üretimini desteklediği bilinmektedir (Ghosh vd., 1996). Fakat *P. aeruginosa* EF2 (Gilbert vd., 1991a) ve *Acinetobacter calcoaceticus* (Mahler vd., 2000) lipazlarının oleik asit gibi uzun zincirli yağ asitlerinin varlığında baskılandığı kaydedilmiştir. *Pseudomonas sp.* G6 suşunun ise maksimum lipaz üretimini %1 (v/v) n-hekzadekanın tek karbon kaynağı olarak

kullanılmasıyla sağladığı (25 U/ml), ayrıca kültür ortamında % 0.05 (v/v) konsantrasyonda tribütirin kullanımının da lipaz üretimini 2.4 kat arttırdığı bildirilmiştir (Kanwar vd., 2002).

Üretim ortamında bulunan nitrojen kaynağının türü de lipaz üretimini etkilemektedir (Ghosh vd., 1996). Genellikle çeşitli *Bacillus spp.* (*Bacillus* A30-1, *B. alcalophilus*, *B. licheniformis* H1) ve çeşitli pseudomonadlar (*Pseudomonas sp.*, *P. fragi*, *P. fluorescens* BW 96CC) ve *Staphylococcus haemolyticus*'un lipaz üretimi için pepton ve yeast ekstrakt gibi nitrojen kaynakları kullanılmıştır (Wang vd., 1995; Khyami-Horani 1996; Pabai vd., 1996; Oh vd., 1999; Ghanem vd., 2000; Lanser vd., 2002; Sharma vd., 2002b). *Burkholderia multivorans*'ın lipaz üretimini indükleyici olan zeytinyağı/oleik asit ve nitrojen kaynağı olarak eklenen yeast ekstraktın lipaz üretimini maksimum oranda etkilediği bildirilmektedir (Gupta vd., 2007). Mısır ıslatma sıvısı ve soya fasülyesi unu lipaz üretimini peptondan daha az derecede uyarmaktadır (Sztajer ve Maliszewska, 1989). *Rhizopus oryzae*'nin lipolitik suşundan izole edilen lipaz, nitrojen kaynağı olarak % 4 mısır ıslatma sıvısı ve % 1 oranında pepton bulunan besiyeri bileşiminde yüksek ekstraselüler lipaz aktivitesi elde edildiği bildirilmektedir (Hiol vd., 2000). Amonyum klorid ve diamonyum hidrojen fosfat gibi inorganik nitrojen kaynaklarının bazı mikroorganizmaların lipaz üretimini etkilediği kaydedilmiştir (Gilbert vd., 1991a, 1991b; Bradoo vd., 1999; Dong vd., 1999; Rathi vd., 2001). Üre ve amonyum sülfat lipaz sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir (Sztajer ve Maliszewska, 1989).

Kofaktörler genellikle lipaz aktivitesi için gerekli değildir fakat divalent kanyonlar enzim üretimini stimüle etmekte ya da inhibe etmektedir. Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} ve Sn^{2+} gibi ağır metaller lipaz aktivitesini büyük ölçüde inhibe etmektedir. Fakat Zn^{2+} ve Mg^{2+} lipaz aktivitesi için önemsiz inhibitörlerdir (Patkar ve Björkling, 1994). Ca^{2+} ve Mg^{2+} *Burkholderia sp.*'nin lipaz üretimini stimüle ederken (Rathi vd., 2001), *B. multivorans*'ta Ca^{2+} lipaz üretimine pozitif sinyal vermiş Mg^{2+} ise negatif sinyal vermiştir (Gupta vd., 2007). Kalsiyum klorid varlığında ise *Bacillus sp.* RSJ1'in lipaz üretimini stimüle olduğu bildirilmektedir. Fakat diğer metal iyonu tuzlarının çoğu lipaz üretimini inhibe etmiştir. (Sharma vd., 2002b). Fe'nin ise *Pseudomonas sp.* G6'nın lipaz üretiminde kritik rol oynadığı kaydedilmiştir (Kanwar vd., 2002).

Gelişim ortamındaki başlangıç pH'sı lipaz üretimi için önemlidir. Bakterilerin çoğunluğu *Bacillus sp.* (Sugihara vd., 1991), *Acinetobacter sp.* (Barbaro vd., 2001) ve *Burkholderia sp.*'de (Rathi vd., 2001) olduğu gibi en iyi üreme ve lipaz üretimi pH 7.0 civarındadır. Fakat maksimum aktivite bazı durumlarda pH 7.0'den daha yüksek olduğu koşullarda gözlenebildiği gibi (Nashif ve Nelson 1953; Gilbert vd., 1991a; Wang vd., 1995; Khyami-Horani 1996; Dong vd., 1999; Sharma vd., 2002b; Kanwar vd., 2002; Kiran vd., 2007) pH 7.0'den daha küçük olduğu durumlarda da gözlenebilmektedir (Ertuğrul vd., 2007).

Lipaz üretimi için optimum sıcaklık, mikroorganizmaların gelişim sıcaklıklarına benzerlik göstermektedir. Örneğin *Bacillus sp.* RSJ1 (Sharma vd., 2002b) ve *B. cepacia*'da (Rathi vd., 2001) olduğu gibi lipaz üretimi için en iyi sıcaklık 50°C'dir. Genel olarak lipazların 20-45 °C arasındaki sıcaklıklarda üretildiği görülmüştür (Kanwar vd., 2002; Ertuğrul vd., 2007; Kiran vd., 2007).

Bakterilerin maksimum lipaz üretimi için en uygun inkübasyon süresi, inkübasyon periyodunun birkaç saatten birkaç güne kadar değiştirilmesi ile belirlenebilmektedir. *A. calcoaceticus* ve *Bacillus sp.* RSJ1 12 saatlik inkübe edildiğinde (Mahler vd., 2000; Sharma vd., 2002b) ve *B. thermocatenulatus* 16 saat (Schmidt-Dannert vd., 1997) maksimum lipaz üretimi sağlanmıştır. *Pseudomonas spp.* ve *P. fragi*'nin 72 saat ve *P. fluorescens* BW 96CC'nin 96 saat inkübasyonundan sonra maksimum lipaz ürettiği tespit edilmiştir (Pabai vd., 1996; Dong vd., 1999).

2.5. Protein Saflaştırma Metotları

Enzimlerin ticari uygulamalarının çoğunda, enzimlerin homojen karışımlarına ihtiyaç yoktur. Fakat belli derecede saflaştırılması gerekir. Protein saflaştırma çalışmalarında asıl amaç, istenilen proteinin, diğer proteinlerden ve protein olmayan hücre bileşenlerinden ayrılmasıdır (Berg vd., 2002; Dennison, 2002). Enzimlerin saflaştırılması, 3 boyutlu yapılarının ve proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkilerini anlamak için gereklidir (Taipa vd., 1992; Aires-Barros vd., 1994; Saxena vd., 2003a). Bununla birlikte saflaştırılmış lipazlara, hassas kimyasalların,

farmasötiklerin ve kozmetiklerin biyokatalitik üretimini gerçekleştiren enzim endüstrilerinde de ihtiyaç vardır (Saxena vd., 2003a).

Endüstriyel amaçlar için saflaştırma yöntemleri, pahalı olmamalı, hızlı, yüksek verim ve geniş çapta üretime uygun olmalıdır. Lipazlar için çok çeşitli saflaştırma yöntemleri kullanılmaktadır (Taipa vd., 1992; Aires- Barros vd., 1994; Palekar vd., 2000; Saxena vd., 2003a). Saflaştırma metotları genellikle çöktürme, hidrofobik interaksiyon kromatografisi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi gibi spesifik olmayan tekniklere bağlıdır (Sharma vd., 2001) ve lipazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez) ile belirlenmektedir (Lee ve Rhee, 1993; Kojima ve Shimizu, 2003).

Çöktürme işlemlerinde, sülfat ve fosfat gibi anyonların potasyum, sodyum ya da amonyum gibi katyonlarla olan tuzları tercih edilmektedir. Bu tuzlar proteinle doğrudan etkileşime girmek yerine, kümelenmiş su moleküllerine bağlanarak, proteinlerin kolay bir şekilde çökmesini sağlayacak niteliktedir. Diğer tuzlara göre daha saf olması, ucuz olarak elde edilmesi ve daha iyi bir çözünürlüğe sahip olmasından ötürü, amonyum sülfat en çok tercih edilen tuzdur. Amonyum sülfat tuzunun pH, çözünürlük, ısı, yoğunluk gibi etkenlerle uyumlu olması ve proteinlerinin yapılarının bozulmasına engel olarak proteinleri kararlı kılması, bu tuzun tercih edilmesindeki diğer nedenler arasında sayılabilir (Akbulut, 2006).

Çöktürme işlemi için ayrıca organik çözücüler de kullanılmaktadır. Bu yöntemde hidrofobik bölgeler etrafındaki su, organik çözücü molekülleri ile yer değiştirir. Suda çözülebilen proteinlerin çözünme oranı azalır ve proteinler arası etkileşimin gerçekleşmesi sonucunda proteinler bir araya gelerek çökerler (Scopes, 1994; Dennison, 2002).

Çöktürme işlemi gerçekleştirildikten sonra ortamda kalan tuz, sonraki saflaştırma basamaklarında biyolojik aktiviteyi etkilemekte ve iyonik değişimlere neden olmaktadır. Bu nedenle protein çözeltisi içinde yer alan tuzun çöktürme işlemini takiben ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla diyaliz işlemi gerçekleştirilmektedir. Diyaliz işleminde, seçilmiş büyüklükte gözeneklere sahip selüloz membran gibi yarı geçirgen membranlar kullanılmaktadır. Diyaliz fazla tuzun protein materyalinden uzaklaştırılması için en sık kullanılan yöntemdir (Akbulut, 2006).

Bu aşamadan sonra gerçekleştirilen saflaştırma basamaklarındaki amaç; ilgilenilen potenin diğer proteinlerden daha büyük oranda ayrılması, istenilen protein miktarında ve aktivitesinde azalma olmaksızın potenin saflaştırılmasıdır. Bu aşamada çeşitli kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Kromatografik yöntemler sayesinde proteinler büyüklüklerine, iyonik yüklerine veya özgül moleküllere olan ilgilerine göre birbirinden ayrılabilirler. Kullanılacak kromatografik yöntem, çalışılan potenin özelliklerine göre seçilmektedir (Scopes, 1994; Berg vd., 2002; Dennison, 2002).

P. mendocina PK-12CS lipazının saflaştırılması, aseton çöktürmesi ve DE-52 kromatografisi yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Yaklaşık 241 kat saflaştırılan lipazın moleküler ağırlığı 80 kDa olarak tespit edilmiştir (Jinwal vd., 2003). *Pseudomonas fluorescens* HU380 suşunun ürettiği ekstraselüler lipaz ise 0.5 M amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-sepharose ve Superdex 200HR kolon kromatografi yöntemleri ile 24.3 kat saflaştırılmıştır. Protein bantları SDS-PAGE ile gözlenmiş ve enzimin moleküler ağırlığı 67 kDa olarak bulunmuştur (Kojima ve Shimizu, 2003).

Bacillus cereus C71 suşunun ürettiği ekstraselüler lipaz, ardışık olarak amonyum sülfat çöktürmesi, Phenyl-Sepharose kromatografisi, DEAE iyon değişim kromatografisi ve CIM quaternary (QA) amine kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ve kütle spektrofotometre ile yaklaşık olarak 42 kDa olarak belirlenmiştir (Chen vd., 2007).

Organik solvent toleranslı *Pseudomonas aeruginosa* LST-03'ün salgıladığı organik solvent stabil lipazı, 2-propanolun varlığında iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik interaksiyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Lipazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 27.1 kDa ve jel filtrasyonu ile de 36 kDa olarak bulunmuştur (Ogino vd., 2000). *Pseudomonas sp.* S5 suşu tarafından üretilen, organik solvent toleranslı lipaz da affinite ve anyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. 387 kat saflaştırılan lipazın moleküler ağırlığı 60 kDa olarak belirlenmiştir (Rahman vd., 2005).

Enzimlerin saflaştırılması, onların ilk aminoasit sekanslarının başarılı bir şekilde ortaya konmasına ve çoğunlukla da üç boyutlu yapılarının açıklanabilmesine izin vermektedir. Saflaştırılmış lipazların X-ışını kristalografisi ile ilgili çalışmalar, yapı-

fonksiyon arasındaki ilişkilerinin anlaşılmasını sağlamakla birlikte hidroliz, sentez ve ester gruplarının değişimi gibi lipaz aktivitesinin gerçekleştiği mekanizmaların kinetiğinin daha iyi anlaşılmasında rol oynar (Jaeger ve Reetz, 1998). Bununla birlikte saflaştırılmış lipazlara, hassas kimyasalların, farmasötiklerin ve kozmetiklerin biyokatalitik üretimini gerçekleştiren enzim endüstrilerinde de ihtiyaç vardır (Saxena vd., 2003a).

Yapılan X-ışınları çalışmalarında tüm lipazların α/ β hidrolaz katlanması familyasında yer aldığını göstermektedir (Ollis vd., 1992). Genel olarak α/β -hidrolaz katlanmaları sekiz telden ibarettir, çoğunlukla paralel β tabaka 6 α heliks tarafından kuşatılmıştır (Ser/Asp/Cys-His-Asp/Glu) (Brzozowski vd., 1991).

Lipazlar her hangi bir kofaktöre ihtiyaç duymayan (Singh ve Banerjee, 2007) serin hidrolazlardır (Svendsen, 1994; Singh ve Banerjee, 2007) ve G-X₁-S-X₂-G sekansının enzimin katalitik kısmı olduğu düşünülmektedir. Burada G: glisin, S: serin, X₁: histidin ve X₂: glutamik veya aspartik asittir (Svendsen, 1994). İnsan pankreatik lipazı (HPL) (Winkler vd., 1990) ve *Rhizomucor miehei* (RML) lipazının katalitik üçlüsü Ser- Asp- His'den ibarettir. Buna karşın *Geotrichum candidum* lipazının (GCL) katalitik üçlüsünün ise Ser- Glu- His'den ibaret olduğu bildirilmektedir (Hou, 2002).

Lipazların aktif bölgeleri, diğer enzimlerde de olduğu gibi cep denilen (lid veya flap) yüzey katlanmalarının olduğu kısımlardan oluşmaktadır. Ortak yüzeye bağlanma sırasında bu katlanma hareket etmekte ve enzimin 'kapalı' bir formdan aktif bölgenin solvent içinde iş görebileceği 'açık' bir forma geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda, ortak yüzeyde lipazın bağlanmasını kolaylaştırdığı düşünülen büyük bir hidrofobik yüzey oluşturduğu düşünülmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998). HPL ve RML'da, aktif bölge kısa bir amfipatik heliks veya kapak tarafından sarılmıştır. Buna karşın GCL'nin aktif bölgesi hemen hemen paralel iki amfipatik heliks tarafından çevrilmiş olduğu bilinmektedir. Bu yapı substrat ile lipazın etkileşmesini önler, böylece hidrofobik tortular proteinin yüzeyi aracılığıyla protein ve substrat arasına temas eder (Jaeger vd., 1994).

Enzimin konformasyonel değişikliği suda çözünemeyen substrat ile karşılaştığı zaman olmaktadır (Saxena vd., 2003b). Bir aktivasyon olduğu zaman enzimin kapağı kapalı formdan açık forma dönüşür ve böylece aktif bölge substratın etkileşebileceği

bir hale gelir (Jaeger ve Reetz, 1998). Bu olay yüzeyler arası aktivasyon olarak bilinmektedir (Verger, 1997). Fakat bu yüzeyler arası aktivasyon fenomeni tüm lipazlarda meydana gelmemektedir. Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida antarctica* B (Martinelle vd., 1995) lipazları bir kapağa sahip değildirler ve bundan dolayı yüzeyler arası aktivasyonları nokсандır. Dolayısıyla, lipazları uzun zincirli triaçilgliseritlerin hidrolizini katalizleyebilen esterazlar olarak tanımlamak mümkündür (Foglia ve Villeneuve, 1997).

2.6. Lipazlar İçin Karakterizasyon ve Stabilizasyon Çalışmaları

Saflaştırılan lipazın karakterizasyonu ve stabilizasyonu aşamasında saflaştırılan enzimin pH ve sıcaklık kinetikleri, metal iyonlarının etkisi, spesifik inhibitörlerin etkisi, çeşitli deterjanların etkisi ve substrat spesifitesi belirlenmektedir.

Enzimlerin teknolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için çalışma koşullarında uzun süre stabil olmaları gerekmektedir. Operasyonel stabilitenin uzatılması süreçteki enzim yinelenmelerinin sayısını düşürecek, böylece oldukça pahalı olan enzim işlemlerinin maliyeti azalacaktır. Enzim inaktivasyonları, sıcaklık, ortam pH'sı, denatüre edici maddeler, oksijen ve proteazların mevcudiyeti gibi birçok faktörün etkisiyle gerçekleşmektedir. Bu nedenle inaktivasyona karşı enzimlerin stabilizasyonu endüstriyel uygulamaları için kaçınılmaz bir iştir (Erarslan, 2006).

Genellikle enzimler, organik solventlerde stabil değildir ve denatüre olmaya eğilimlidirler (Schmidt ve Verger, 1998; Sharma vd., 2001). Fakat lipazlar organik solventlerde bir stabilizer olmadan aktiftirler ve stabil kalırlar (Schmidt ve Verger, 1998; Schmidt-Dannert, 1999; Sharma vd., 2001; Gupta vd., 2004). Organik solventlerin varlığında iş gördüklerinde reaksiyonun yönünü değiştirebilmektedirler ya da farklı açilgliseroller, alkoller, esterler, glikozidler ve aminler ve hatta bazı bileşenlerin farklı kimyasal grupları arasındaki açil gruplarıyla yer değiştirebilmektedirler (Pandey vd., 1999; Schmidt-Dannert, 1999; Ferrer vd., 2000; Bornscheuer, 2002; Gupta vd., 2004). Çok sayıda organik solvent toleranslı mikroorganizma izole edilmiş olmasına rağmen *Pseudomonas aeruginosa* LST-03'ün organik solvent stabil enzim üreten ilk organik solvent toleranslı mikroorganizma olduğu bildirilmektedir (Ogino vd., 1994). *Pseudomonas*

pseudomallei 12sm (Kanwar ve Goswami, 2002), *P. mendocina* (Jinwal vd., 2003), *P. fluorescens* (Makhzoum vd., 1996), *Pseudomonas sp.* S5 (Rahman vd., 2005), *P. aeruginosa* PseA (Gupta ve Khare, 2006), *Bacillus* GK-8 (Meghwanshi vd., 2006) lipazlarının organik solvent stabilitesi olduğu kaydedilmiştir.

Kofaktörler lipaz aktivitesi için genellikle gerekli değildir fakat kalsiyum gibi divalent katyonlar enzim aktivitesini genellikle uyarmaktadır (Macrae ve Hammond 1985; Godtfredsen 1990). *B. subtilis* 168 (Lesuisse vd., 1993), *B. thermoleovorans* ID-1 (Lee vd., 1999), *Pseudomonas sp.* S5 (Rahman vd., 2005), *P. aeruginosa* EF2 (Gilbert vd., 1991b), *P. fluorescens* HU380 (Kojima ve Shimizu, 2003), *P. fluorescens* SIK WI (Kim vd., 2005), *S. aureus* 226 (Muraoka vd., 1982), *S. hyicus* (Van Oort vd., 1989), *C. viscosum* (Sugiura vd., 1974) ve *Acinetobacter sp.* RAG-1 (Snellman vd., 2002) lipazlarının kalsiyum ile stimüle olduğu kaydedilmiştir. Buna karşılık *P. aeruginosa* 10145 lipazı kalsiyum varlığında inhibe edilmiştir (Finkelstein vd., 1970).

Lipaz aktivitesi Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} ve Sn^{2+} gibi ağır metaller tarafından şiddetli bir şekilde inhibe edilmektedir ve Zn^{2+} ve Mg^{2+} tarafından ise önemsiz bir şekilde inhibe edilmektedir (Patkar ve Bjorkling 1994). *P. fluorescens* HU380 lipazı Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} (Kojima ve Shimizu, 2003), *P. aeruginosa* lipaz Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} (Karadzic vd., 2006), *Bacillus cereus* C71 Cu^{2+} ve Zn^{2+} (Chen vd., 2007) varlığında inhibe edilmiştir.

Bakteriyel lipazların en iyi aktivite gösterdikleri pH genel olarak nötral (Dharmsthiti vd., 1998; Dharmsthiti ve Luchai 1999; Lee vd., 1999) ya da alkali (Schmidt-Dannert vd., 1994; Sidhu vd., 1998; Rathi vd., 2001; Kanwar ve Goswami 2002; Sunna vd., 2002; Karadzic vd., 2006; Chen vd., 2007) olmakla birlikte nadir de olsa asidik ortamda iyi aktivite gösteren lipazlar da vardır (Andersson vd., 1979).

Bakteriyel lipazlar genellikle 30-60 °C aralığında sıcaklıklarda aktiftirler (Lesuisse vd., 1993; Wang vd., 1995; Dharmsthiti vd., 1998; Litthauer vd., 2002; Meghwanshi vd., 2006). Fakat bakteriyel lipazların hem düşük hemde yüksek aralıkta aktif olduğu ile ilgili kayıtlar bulunmaktadır (Dunhaupt vd., 1991; Brune ve Gotz 1992; Lin vd., 1996; Dharmsthiti ve Luchai 1999; Lee vd., 1999; Oh vd., 1999; Sunna vd., 2002). Birkaç *Pseudomonas* lipazının 100 °C'de ya da hatta 150 °C'nin üstünde birkaç saniye yarılanma ömrü ile stabil olduğu kaydedilmiştir (Andersson

vd., 1979; Swaisgood ve Bozoglu 1984; Rathi vd., 2001). Yüksek termotolerant lipaz 100 °C'de 15-25 dakika yarılanma ömrü ile *B. stearothermophilus*'da kaydedilmiştir (Bradoo vd., 1999). Termofilik *Bacillus sp.* enzimi ise optimal aktiviteyi 60 °C'de (Nawani vd., 2006), *Pseudomonas sp.* 90°C (Rathi vd., 2000) ve *Pseudomonas aeruginosa* 70 °C'de göstermiştir (Karadzic vd., 2006).

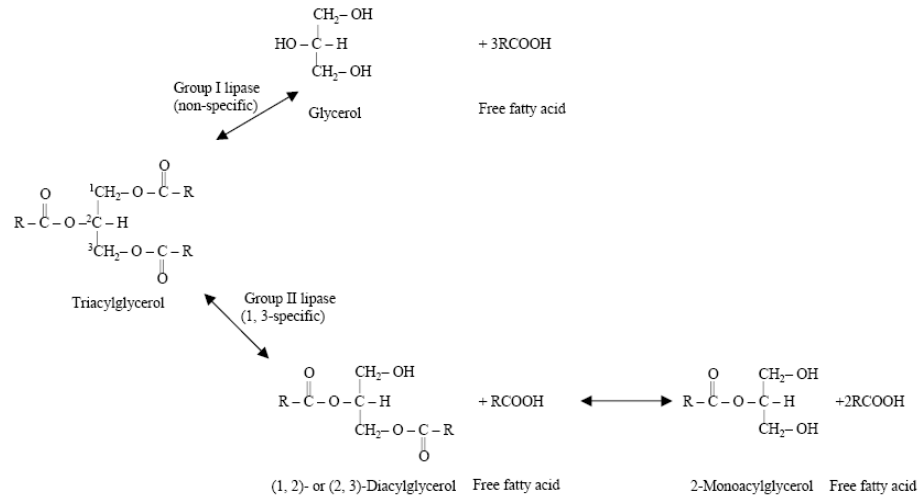
Lipazlar, hidroliz reaksiyonlarındaki spesifitelerine göre substrat-spesifik lipazlar, bölgesel spesifik lipazlar, yağ asitleri spesifik lipazlar ve stereospesifik lipazlar olmak üzere dört gruba ayrılabilirler.

Substrat-spesifik lipazlar trigliseroller, digliseroller, monogliseroller ve fosfolipitler gibi belirli gliserol esterlerini daha iyi hidrolizleme kabiliyetlerine göre tanımlanırlar. Triaçilgliserol birçok hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal lipazlar için favori substratlardır (Hou, 2002). *Burkholderia cepacia* (Pencreac'h vd., 1997), *Mucor miehei*, *Geotrichum candidum* (Jensen ve Hamosh, 1996), *Pseudomonas sp.* ATCC (Kordel vd., 1991) ve diğer bazı lipazlar uzun zincirli doymamış triaçilgliserollere spesifik olabilmektedirler (Bendikienė vd., 2005). Buna karşın, *Penicillium camembertii* lipazı gibi bazı lipazların gliseritleri triaçilgliserol'den daha iyi hidrolize ettikleri rapor edilmiştir (Tornqvist ve Belfrage, 1976; Yamaguchi ve Mase, 1991).

Yağ asidi spesifik lipazlar, bazı yağ asitlerine spesifik olup bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar (Jaeger vd., 1994; Telefoncu, 1997). Bu tür lipazlar gliserol omurgası üzerindeki pozisyona bakmaksızın gliserit esterlerini asitlere hidrolize edebilirler (Hou, 2002). Özellikle *Geotrichum candidum* fungal lipazı B açilgliserollerin C9 ve C10 arasındaki ikili ester bağı için spesifiktir. *Achromobacterium lipolyticum* yağ asidi spesifitesi gösteren bir lipaz üretmektedir (Davranov, 1994). Fakat *Bacillus sp.* (Wang vd.,1995), *P. alcaligenes* EF2 (Gilbert vd., 1991a, 1991b) ve *P. alcaligenes* 24 (Misset vd., 1994) lipazları uzun zincirli yağ asitleri içeren trigliseritlere spesifiktir (Gupta vd., 2004). *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse vd., 1993), *Bacillus sp.* THL027 (Dharmstithi ve Luchai 1999), *P. aeruginosa* 10145 (Finkelstein ve 1970), *P. fluorescens* (Sugiura vd., 1977), *Pseudomonas sp.* ATCC 21808 (Kordel vd., 1991), *C. viscosum* (Horiuti ve Imamura 1977) ve *Aeromonas hydrophila* (Angultra vd., 1993) lipazları küçük ya da orta zincirli yağ asitleri içeren substratlara, *P. aeruginosa* sana-i, orta zincirli yağ

asitlerini içeren triaçilgliserolleri tercih etmektedir (Karadzic vd., 2006). *S. aureus* 226 (Muraoka vd., 1982), *Bacillus sp.* (Sugihara vd., 1991) lipazlarının ise doymamış yağ asitlerini tercih ettiği bildirilmektedir.

Bölgesel spesifik lipazlarda ilk grup, spesifik olmayan gruptur. Bunlar trigliseritleri tamamen hidrolizleyip yağ asitleri ve gliserol oluşumunu katalizlerler (Şekil 2.4). Bu grup lipazlara *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* (Davranov 1994; Jaeger vd., 1994), *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscoum*, *Pseudomonas spp.* (Victor vd., 1997), *Chromobacterium viscosum* (Jaeger vd., 1994), *Corynebacterium acnes* (Hassing 1971) lipazları örnek verilebilir. 1,3-bölgesel spesifik lipazlar ise triaçilgliserol parçasının 1 ve 3 pozisyonunda hidroliz gerçekleştirirler (Jaeger vd., 1994; Telefoncu, 1997) ve 1,2-diaçilgliseroller, 2,3-diaçilgliseroller, 2-monogliseroller ve serbest yağ asitleri oluştururlar (Şekil 2.4) (Macrae, 1983). Ancak bu ürünler kimyasal olarak kararsızdır ve açıl göçüne maruz kalmaktadırlar. Bunun sonucunda 1,3-spesifik enzimlerin son ürünleri; 1,3-diaçilgliseroller, 1-monoaçilgliserol ve serbest yağ asitleri olabilmektedir (Macrae, 1983; Jaeger vd., 1994; Chen vd., 2003). Triaçilgliserollerin hidrolizi devam ettiği sürece 1,3-spesifik lipazlar, triaçilgliserollerin tamamen serbest yağ asitleri ve gliserole dönüşmesine sebep olurlar (Chen vd., 2003). Triaçilgliserol substratlarının lipolizi esnasında, 1,3-spesifik lipazlar, *sn*-1 ve *sn*-3 pozisyonlarını *sn*-2 pozisyonundan daha öncelikli olarak hidrolizlerler (Semeriva vd., 1967). Bu tip lipazlara örnek olarak domuz pankreası, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. carneus*, *A. terreus*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *Mucor miehei*, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium heterosporum*, *Bacillus* (GK-8, GK-31, GK-42) ve *Pseudomonas* GK-80 lipazları verilebilir (Okumura vd., 1976; Iwai vd., 1980; Aisaka ve Terada, 1981; Sugihara vd., 1988; Joerger ve Haas 1993; Toida vd., 1998; Yadav vd., 1998; Saxena vd., 2005; Meghwanshi vd., 2006). 2-spesifik lipazlar sadece ikinci bağları (gliserolün C₂ atomundaki ester bağları) hidrolize ederler ve serbest yağ asitleri ve 1,3 diaçilgliseroller meydana gelir (Gunstone, 1999). Gerçek *sn*-2-regioselektif lipazlar çok nadirdir. Bu kategoriye *Geotricum candidum* (Sugihara vd., 1991), *Candida antarctica* A (Rogalska vd., 1993) ve *Candida parapsilosis* (Briand vd., 1994) lipazları örnek olarak verilebilir.



Şekil 2.4. Bakteriyel lipazların bölgesel seçiciliği (Macrae, 1983)

Stereospesifik lipazlar ise rasemik karışımlarda enantiyomerler arasında ayırma yeteneğine sahip lipazlardır. Lipazların stereoseçiciliği büyük ölçüde substratın yapısı, aktif bölgedeki interaksiyon ve reaksiyon koşullarına bağlıdır. Böyle enantiyomerikal olarak saf ya da zenginleştirilmiş organik bileşenler farmasötikal, agrikültürel, sentetik ve doğal ürünlerin kimyasında önem kazanmaktadır (Reetz, 2001; Muralidhar vd., 2002; Gupta vd., 2004). Örneğin *Pseudomonas cepacia* lipazı hidroliz, esterifikasyon ve transesterifikasyondaki ikincil alkollerin rasemik karışımlarının kinetik çözümleri için organik sentezde oldukça popülerdir (Petschen vd., 1996; Takagi vd., 1996; Schulz vd., 2000). Bu tip lipazlara *P. aeruginosa* (Sharma vd., 2003), *P. aeruginosa* MTCC 5113 (Singh ve Banerjee, 2007), *Bacillus cereus* C71 (Chen vd., 2007), *Burkholderia cepacia* (Jaeger ve Eggert 2002) lipazları da örnek olarak verilebilir.

2.7. Lipazların Endüstride Kullanımı

Endüstriyel enzim pazarında büyük bir paya sahip olan hidrolitik enzimler içinde yer alan lipazlar, anahtar enzimler olarak ortaya çıkmakta ve endüstriyel uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadırlar (Jaeger vd., 1994, 1999; Pandey vd., 1999). Endüstriyel anlamda lipazlara olan ilgi; organik solventlerde doğal ve yapay bileşiklerin kullanımıyla hidroliz, sentez ve açıl değişimi yapabilmeleri ve

bunun gibi farklı reaksiyonları katalizleyebilme özellikleri nedeniyle çok yönlü biyokatalist olmaları (Bornscheuer, 2002; Gupta vd., 2004), kimyasal seçicilik (kemoselektivite), bölgesel seçicilik (regiyoselektivite), izomer seçicilik (stereoselektivite=enantioselektivite) gibi özelliklere sahip olması (Gunstone, 1999; Villeneuve vd., 2000; Sharma vd., 2001; Jaeger ve Eggert, 2002; Snellman vd., 2002), organik solventlerde (Schmid ve Verger, 1998; Sharma vd., 2001; Hasan vd., 2005) ve geniş pH ve sıcaklıklarda aktif ve stabil olmaları (Schmidt-Dannert, 1999; Gupta vd., 2004), yapı ve fonksiyonlarının iyi bilinmesi ve yeni kullanımlar için modifiye edilebilmeleri (Schmidt-Dannert, 1999; Jaeger ve Eggert, 2002), ılımlı koşullar altında iş gördüklerinden ve düşük enerji ve az ekipman gerektirdiklerinden kullanımlarında maliyetin düşük olması ve daha az kirliliğe yol açmaları (Gunstone, 1999; Pandey vd., 1999; Jaeger ve Eggert, 2002), mikroorganizmalardan yüksek miktarda üretilibilmeleri, pek çok lipazın kristal yapısının aydınlatılmış olması ve son olarak lipazların genellikle kofaktöre ihtiyaç duymamalarından (Patkar ve Björkling, 1994; Rubin ve Dennis, 1997; Jaeger ve Eggert, 2002; Ghanem ve Aboul-Enein, 2004; Gupta vd., 2004; Singh ve Banerjee, 2007) kaynaklanmaktadır. Bu özellikler, lipazları organik kimyada kullanılan en yaygın biyokatalistik grup yapmaktadır (Sugihara vd., 1992).

Enzimlere ait endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilmektedir (Telefoncu, 1986). Enzimolojinin gelişimiyle susuz ortamlardaki lipaz uygulama alanları da büyük ölçüde artmıştır. Geçtiğimiz yıllarda lipazlar organik sentez, yağ modifikasyonu ve rasemik kararlılığından dolayı yeni kullanım alanları bulmuştur. Organik ortamda lipazlar tarafından gerçekleştirilen, esterifikasyon (Chowdary vd, 2001; Hamsaveni vd, 2001; Kiyota vd, 2001; Krishna ve Karanth, 2001; Rao ve Divakar, 2001), transesterifikasyon (Ducret vd, 1998; Metin ve Akpınar, 2000) ve interesterifikasyonu (katı ve sıvı yağlardaki doğal yağ asit dağılımının değiştirilmesi) içine alan çeşitli reaksiyonlarla ürünlerdeki değişiklikler gözlenmiştir ve bunların yüksek oranlarda sentezlenmesi sağlanmıştır (Gao vd., 2000).

Lipazlar, lipid içeren atık suların enzimatik degradasyonunda (Pandey vd., 1999; Masse vd., 2001; Suzuki vd., 2001), organik sentezlerde (Gitlesen vd., 1997; Reetz ve Jaeger, 1998; Sharma vd., 2001; Gupta vd., 2004), deterjan formülasyonlarında

(Jaeger vd., 1994; Pandey vd., 1999; Saxena vd., 1999; Rohit vd., 2001; Sharma vd., 2001; Kanwar vd., 2002; Dröge, 2004; Houde vd., 2004; Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007), tekstil sanayinde (Jaeger vd., 1994; Sharma vd., 2001; Kanwar vd., 2002; Houde vd., 2004; Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007), biyosüpfaktanların sentezinde (Sharma vd., 2001; Kanwar vd., 2002; Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007), kağıt yapımında (Jaeger vd., 1994; Jaeger ve Reetz, 1998; Pandey vd., 1999; Gutiérrez vd., 2001; Sharma vd., 2001; Houde vd., 2004), farmasötiklerde (Jaeger vd., 1994; Jesus vd., 1995; Faber, 1997; Jaeger ve Reetz 1998; Reetz ve Jaeger, 1998; Gunstone, 1999; Rohit vd., 2001; Sharma vd., 2001; Reetz, 2002; Yadav ve Trivedi, 2003; Gupta vd., 2004; Dröge, 2004; Houde vd., 2004; Gulati vd., 2005), agrokimyasal (tarım kimyası) endüstride (Kirchner vd., 1985; Gunstone, 1999; Pandey vd., 1999; Reetz, 2002; Dröge, 2004), pestisitlerde (Kirchner vd., 1985; Pandey vd., 1999; Jaeger ve Eggert, 2002), gıda endüstrisinde (Jaeger vd., 1994; Gunstone 1999; Houde vd., 2004; Pandey vd. 1999; Saxena vd. 1999; Reetz, 2002; Gulati vd., 2005), süt endüstrisinde (Reetz ve Jaeger, 1998; Sharma vd., 2001; Kanwar vd., 2002; Gupta vd., 2004; Ateslier ve Metin, 2006; Bora ve Kalita, 2007; Gupta vd. 2007), kozmetiklerde (Jaeger vd., 1994; Rohit vd., 2001; Sharma vd., 2001; Houde vd., 2004), oleokimyasal endüstride (Jesus vd., 1995; Faber, 1997; Reetz ve Jaeger, 1998; Sharma vd., 2001; Yadav ve Trivedi, 2003; Gupta vd., 2004), deri endüstrisinde (Jaeger vd., 1994; Gunstone, 1999; Houde vd., 2004; Gulati vd., 2005) yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.7.1. Lipazların gıda endüstrisinde kullanımı

Lipazlar, gıda endüstrisinde diğer enzimlerle birlikte ekmek, peynir ve diğer gıdaların raf ömrünü ve bunların reolojik özelliklerini iyileştirmek için ya da emulgatör veya aroma üretmek için *in situ* olarak kullanılır. Bunlar aynı zamanda tat üretimi ve besinsel değeri arttırmak ya da uygun parenteral beslenme için inter ya da transesterifikasyonla elde edilen açilgliserollerin kompozisyon ya da yapısının modifikasyonu için *ex situ* olarak da kullanılmaktadır (Gunstone, 1999).

Lipazlar peynir olgunlaşmasında, fırıncılık ürünlerinde ve meşrubatlarda tat gelişiminde (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998), et ve balık ürünlerinden yağın

uzaklaştırılmasına yardımcı olarak kullanılmaktadır (Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998). Lipazlar süt yağının hidrolizi için mandıra endüstrisinde de kapsamlı olarak kullanılmaktadır. Mevcut uygulamalar peynirde tat zenginleştirme, peynir olgunlaşımını hızlandırma, peynirli ürünlerin üretimi ve tereyağı ve kremin lipolizisidir (<http://www.au-kbc.org/frameresearch.html>).

2.7.2. Lipazların oleokimya endüstrisinde kullanımı

Yağlar, gıdalarda oldukça önemlidir (Sharma vd., 2001). Gliserol iskeletindeki yağ asidinin pozisyonu, yağ asidinin zincir uzunluğu ve doymamış yağ oranı gibi faktörler trigliseritin fiziksel yapısını, besinsel değerini önemli oranda etkilemektedir (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001). Lipazlar, gliseritteki yağ asidi zincirlerinin konumunun değiştirilmesi ve bir veya daha fazla yağ asidinin yeni bir tane ile yer değiştirmesiyle lipitlerin özelliklerinin farklılaşmasına imkan sağlar. Bu yolla diğerlerine nazaran daha ucuz ve daha kaliteli yağlar elde edilebilmektedir (Coleman ve Macrae, 1980; Pabai vd., 1995a, b; Undurraga vd., 2001).

Bu işleme kakao yağına denk yağların modifikasyonu çalışmaları örnek olarak verilebilir (Macrae, 1983; Bloomer vd., 1990; Graile vd., 1991; Gitlesen vd., 1995). Yüksek değerli bir yağ olan kakao yağı palmitik ve sterik asit içermektedir ve erime noktası yaklaşık 37 °C'dir. Kakao yağı ağızda eriyince çikolata gibi ürünlerde istenen soğutucu duyusu çıkmaktadır (Coleman ve Macrae, 1980; Undurraga vd., 2001). Palmiye yağındaki triaçilgliseroller ise palmitatçe zengindir ve erime noktası 23 °C'dir. Sonuç olarak oda sıcaklığında sıvıdır ve düşük değerli bir üründür. Palmiye yağının yeniden yapılandırılarak kakao yağı yerine kullanılması interesterifikasyonla yapılabilmektedir ve bu mevcut ticari bir uygulamadır (<http://wwwbiol.paisley.ac.uk/Courses/Enzymes/glossary/Esterif.htm>).

Bitkisel yağ modifikasyonuna dahil olan lipolitik enzimlerde diğer ilgi çekici şey yağların besinsel değerini iyileştirmenin amaçlanmasıdır (Lee ve Akoh, 1996; Fomuso ve Akoh, 1998; Mangos vd., 1999; Irimescua vd., 2001). Lipazlar aynı zamanda tat ve güzel koku bileşenleri olarak bilinen kısa zincirli yağ asidi esterlerinin ve alkollerin sentezi ile modifiye tatlı yiyeceklere eklemek için kullanılırlar (Macedo vd., 2003).

2.7.3. Lipazların organik sentezde kullanımı

Organik kimya endüstrisi gıda endüstrisinden sonra lipazların kullanıldığı en önemli uygulama alanıdır. Lipazlar, kimyasal olarak üretilmeyen ya da klasik kimyasal prosesle işlenmesi zor ya da pahalı olan spesifik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Örneğin; farmasötik ve agrokimyasal endüstride antibiyotikler, antienflamatuar bileşikler, pestisitlerin vb sentezi veya modifikasyonu, enantiosaf bileşiklerde veya rasemik karışımların ayrılmasında kullanılmaktadırlar (Gunstone, 1999; Pandey vd., 1999; Berglund ve Hutt, 2000; Reetz, 2002).

Organik sentezde katalizör olarak kullanılan lipazlar, substrata göre farklı etki göstermelerinden dolayı sentetik kimya için büyük avantaj sağlamaktadırlar (Ghosh vd., 1996). Lipazlar geniş bir çeşitlilik gösteren kemoselektif, regioselektif ve stereoselektif transformasyonları katalizlemede kullanılmaktadır (Rubin ve Dennis, 1997; Kazlauskas ve Bornscheuer, 1998; Berglund ve Hutt, 2000). Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır (Sharma vd., 2001).

2.7.4. Lipazların deterjan endüstrisinde kullanımı

Enzimler çevresel deterjan ürünleri yükünü azaltabilirler, düşük yıkama sıcaklıklarında kullanılarak enerjiyi koruyabilirler, deterjanlarda daha az tercih edilen kimyasallar azaltılabilir, biyolojik olarak parçalanabilir, zararlı kalıntılar bırakmaz, kanalizasyon sularında negatif etkisi yoktur ve sucul yaşam için risk göstermezler (<http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html>).

Yağları hidrolize edebilme kabiliyetlerinden dolayı lipazlar endüstriyel çamaşırhane ve evde kullanılan deterjanlarda büyük kullanım alanı bulmaktadırlar (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001). Dünya enzim pazarının en büyük payını deterjan endüstrisi oluşturmaktadır (Maurer, 2004). Deterjan enzimleri, toplam lipaz satışlarının yaklaşık % 32' sini oluşturmaktadır. Deterjanlarda kullanılması için lipazın, termostabil ve makinede yıkanmada alkali ortamda aktif kalmaya gereksinimi vardır. Yaklaşık 1000 ton lipaz, her yıl yaklaşık olarak 13 milyon ton deterjan üretiminde kullanılmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998).

Lipazlar ılımlı yıkama koşulları altında uygun oldukları için doymuş ve doymamış yağ depozitlerinin uzaklaştırılması için oldukça caziptirler. Deterjanlara uygun olarak eklenen lipazlar, termostabil olmasının yanısıra alkalofilik de olabilmektedirler ve deterjan formülasyonlarının çeşitli bileşenlerinin varlığında fonksiyon yeteneği vardır (Jaeger vd., 1994).

Yıkama genellikle alkali ortamda olduğu için böyle koşullar altında aktif olan lipazlar tercih edilmektedir. Örneğin *A. oryzae* lipazı gibi. *Acinetobacter radioresistens* tarafından üretilen lipaz pH 10' da optimumdur ve pH 6-10 aralığında stabildir; böylece deterjan endüstrisi uygulamaları için büyük potansiyeli vardır (Chen vd., 1998). *Pseudomonas* lipazları da alkali ortamda aktivite gösterdikleri için yüksek oranda çalışılmıştır ve *Pseudomonas stutzeri* ATCC 19.154, *P. fluorescens* IAM 1057 (Ruchi vd., 2007) ve *P. glumae* (Jaeger vd., 1994) suşları deterjan endüstrisinde büyük oranda kullanılmaktadır. Bundan dolayı pek çok lipaz üreten organizma ve bunların imalat işlemleri deterjan lipazlarının hazırlanması için patentlenmiştir (Mukoyama ve Umehara 1989, Holmes ve Kornacki 1993; Ishida vd., 1995; Lawler ve Smith, 2000).

1994'te Novo Nordisk ilk ticari lipazı dünyaya tanıtmıştır. Bu lipaz (Lipolase™) *Thermomyces lanuginosus* fungusu orjinlidir ve *Aspergillus oryzae*'ya eksprese edilmiştir (Jaeger ve Reetz, 1998). Deterjan sanayiinde Lipolase'dan sonra 1995'de iki bakteriyal lipaz olan *P. mendocina*'dan Lumafast™ ve *P. alcaligenes*'den Lipomax™ ortaya konmuştur ve her ikisi de Genencor International tarafından üretilmektedir (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001).

2.7.5. Lipazların atık arıtımı işlemlerine kullanılması

Lipazlar yağ içeren atıkların degradasyonunun iyileştirilmesi için kullanılmaktadırlar (Masse vd., 2001). Atıksu uygulamalarında lipazlar, sulu çamurda ve havalandırılmalı tank yüzeylerinde, yüzeydeki oksijen geçişine imkân sağlanması için yüzeyde biriken ince yağ bariyerinin uzaklaştırılmasında diğer aerobik atık prosesleri aktive etmek için kullanılmaktadır (Hou, 2002). Bunlar aynı zamanda biyofilm birikintisi, yağla kontamine olmuş topraklar ve zehirli gazların arıtımında da kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999).

Yağ imalathaneleri (Vitolo vd., 1998) ve dondurma fabrikalarından yağca zengin atıksu kirleticilerinin degradesyonu için biyokatalistlerle birlikte mikroorganizma karışımları kullanılmaktadır (Vulfson vd., 1994). Wakelin ve Forster (1997) fast-food restaurantlarından katı ve sıvı yağlar ile greslerin uzaklaştırılması için atığın mikroorganizmalar ile arıtımını araştırmışlardır. Bunlar saf olarak ve lipaz ve diğer enzimleri ürettiği bilinen mikroorganizma karışımlarını kùltive etmişlerdir ve *Acinetobacter sp*'nin yağlı materyallerin % 60-65' ini tipik olarak degrades edebilen etkili saf kùltür olduğunu bulmuşlardır (Kulkarni, 2002).

2.7.6. Lipazların kağıt endüstrisinde kullanımı

Zift veya ağacın hidrofobik bileşeni (başlıca trigliseritler ve mumlar), kağıt hamuru ve kağıt sektöründe bir çok problem yaratmaktadır. Lipazlar, kağıt yapımında üretilen kağıt hamurundan bu ziftin uzaklaştırılmasında kullanılır (Jaeger ve Reetz, 1998; Sharma vd., 2001). Bunlar aynı zamanda kağıdın geri dönüşümü sırasında lipit lekelerinin uzaklaştırılmasında ve yapışkan materyallerin oluşumundan kaçınmak için de kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999; Gutiérrez vd., 2001).

2.7.7. Lipazların farmasötik endüstrisinde kullanımı

Lipazlar agrokimyasallar, pestisitler ve farmasötiklerde kiral yapı bloklarının sentezinde ve rasemik karışımların çözümünde kullanılabilirler. Bunlar stereospesifik hidrolizlerde rasemik karışımların çözünürlüğü gibi suda çözünmeyen esterlerin hidrolizinde kullanılabilirler (Kirchner vd., 1985).

Enzimler genellikle organik solventlerde stabil değildirler ve denatüre olma eğilimindedirler. Fakat lipazlar stabilizer olmaksızın organik solventlerde stabil kalabilmekte ve aktif olabilmektedirler. Organik solventlerdeki kataliz kabiliyetlerinden dolayı lipazlarla ilgili birçok yeni potansiyel biyoteknolojik uygulama tanımlanmaktadır. Bu uygulamalardan birisi kiral açıdan önemli ilaç ve ilaç ara ürünlerinin sentezidir (Schmidt ve Verger, 1998; Sharma vd., 2001). Kiralite bazı ilaçların etkinliğinde anahtar faktördür, bu ilaç ara bileşenlerinin tek enantiyomerlerinin üretimi için farmasötik endüstrisinde gittikçe önemli olmaktadır.

Kiral ara bileşenleri ve iyi kimyasalların farmasötikal ve agrokimyasal endüstrilerde toplu ilaç maddeleri ve agrikültürel ürünlerin hazırlanması için yüksek talebi vardır (Patel, 2003).

Biyolojik aktivite kapsamında kiralitenin öneminin bilincinin artması naproxen (Xin vd., 2001) ve ibuprofen (Lee vd., 1995; Ducret vd., 1998; Xie vd., 1998; Chen ve Tsai, 2000) gibi kiral antiinflammatuar ilaçlar; antiotension-converting (ACE) enzim inhibitörleri gibi antihipertansif ajanlar (captopril, enalapril, ceranopril, zofenapril ve lisinopril) ve diltiazem (Singh ve Banerjee, 2007) gibi kalsiyum kanalını bloke eden ilaçlara dahil olan saf enantiyomerlerin endüstriyel sentezdeki uygulamaları artmaktadır. Lipazlar da bu ilaçların sentezinde kullanılmaktadır (Berglund ve Hutt, 2000).

Metabolik etkilerinden dolayı PUFA'lar (Polyunsaturated Fatty Acids), eczacılıkta ve gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımı artmaktadır (Gill ve Valivety, 1997a; Belarbi vd., 2000). Mikrobiyal lipazlar hayvansal ve bitkisel yağlardan, PUFA'ların elde edilmesinde kullanılmaktadır. Serbest PUFA'lar ve onların mono ve digliseritleri; kolesterol düşürücü, iltihap engelleyici ve kan pıhtılaşmasını engelleyici ilaçların üretilmesinde kullanılmaktadırlar (Gill ve Valivety, 1997b; Belarbi vd., 2000).

Lipaz uygulamalarıyla elde edilen çeşitli pestisitler kullanıma girmiştir. Lipazların en önemli uygulaması, pestisitlerin organik sentezinde optik olarak aktif bileşiklerin üretimine yönelik kullanımlarıdır. Genellikle bu bileşikler karboksilik esterler ya da alkollerin rasemik karışımlarının çözeltileri üzerinden üretilirler. Stereospesifik sentez reaksiyonları da pestisitlerin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Pandey vd., 1999; Jaeger ve Eggert, 2002).

2.7.8. Lipazların deri endüstrisinde kullanımı

Deri endüstrisinde lipazlar, deri ile ciltteki artık yağların uzaklaştırılması işleminde kullanılmaktadır (Hou, 2002). Bu enzim, yalnızca derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için daha uygun hale getirir (Kıran vd., 2006). Şu anki genel uygulamalarda bu amaçla lipaz ve proteaz karışımları kullanılmaktadır (Hou, 2002).

Geleneksel metotlarda organik solvent ve surfaktanların kullanılması uçucu organik bileşen emisyonları gibi çevresel problemlere artış verebilmektedir. Hayvan postu ve derilerinden özellikle yağ miktarını azaltarak yağ ve gresleri uzaklaştırabilir. Bu amaçla hem alkalın stabil hem de asit aktif lipazlar deri ve postlardan yağların uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (<http://www.biowise.org.uk/docs/2000/publications/leather.pdf#search='lipases%20in%20leather%20industry>).

2.7.9. Lipazların medikal sektörde kullanımı

Lipazlar medikal sektörde marker enzimler ya da ilaç amaçlı olarak önemlidir. Bunlar tanı aracı olarak kullanılabilirler ve bunların varlığı yada seviyeleri kesin infeksiyon yada hastalığı gösterebilir (Hasan vd., 2005).

Kan serumundaki lipaz seviyesi akut pankreatit ve pankreatik yaralar gibi durumlarda tanı aracı olarak kullanılabilir. Kronik pankreatitler ve ekzokrin pankreatit yetersizliğinin varlığını belli eden tanılarda serum amilaz, pankreatik izoamilaz, lipaz, tripsinojen ve elastaz ölçülerek belirlenebilmektedir (Lott ve Lu, 1991).

Propionibacterium acnes (Higaki vd., 2003), *Corynebacterium acnes* ve *Staphylococcus aureus* (Simons vd., 1998) gibi patojen bakterilerin lipazının akne hastalarında deride kurdeşen etkisine sahip olduğu da bulunmuştur (Hasan vd., 2005). Lipazlar sindirime yardımcı olarak kullanılabilirler (Gerhartz, 1990). Bunlar aynı zamanda Tümör Nekrozis Faktörünün aktivatörüdür ve kötü huylu tümörlerin tedavisinde kullanılabilirler (Kato vd., 1989). Lipazlar eskiden beri gastrointestinal rahatsızlık, hazımsızlık, sindirim alerjilerinin deri belirtilerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Mauvernay vd., 1970). *Candida rugosa* lipazı da serum kolesterol seviyesini düşürücü ilaç olarak lovastatin sentezinde kullanılmaktadır (Matsumae vd., 1993).

2.7.10. Lipazların biyopolimerlerin üretiminde kullanımı

Polisakkaritler, polifenoller ve poliesterler gibi biyopolimerler oldukça fazla çeşitlilik ve kompleks bir yapı gösterirler. Bununla beraber bu bileşikler,

yenilenebilir doğal kaynaklardan üretilmeleri ve biyodegradasyona uğramaları nedeniyle büyük bir öneme sahiptirler. Lipazlar, polimerik sentez için reaksiyon koşullarında sahip oldukları yüksek seçilim (stereoselektif, regioselektif ve kemoselektif) özellikleri gösterebilmeleri nedeniyle katalizör olarak kullanılmaktadırlar (Jaeger ve Eggert, 2002). 1-Bütül oleat, kışın kullanılan biyodizelin viskozitesini azaltmak için oleik asit ve butanolün direk esterifikasyonu ile üretilmiştir. Trimetilolpropan esterleri de makine yağları olarak benzer şekilde sentezlenmiştir. Lipazlar biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin enzim katalizli üretim olasılığının açık olduğu organik solvent sistemlerindeki transesterifikasyon reaksiyonları ve ester sentezlerini katalizleyebilirler. Aromatik poliesterler lipaz biyokatalistiyle sentezlenebilirler (Linko vd., 1998).

Lipazlar ayrıca sert yüzeylerin temizlenmesinde, tek hücre proteini üretiminde, biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin, yağlama malzemelerinde ve kozmetiklerde biyosensör bileşeni olarak da kullanılmaktadırlar (Schmidt ve Verger, 1998; Gombert vd., 1999; Schmidt-Dannert, 1999; Pandey vd., 1999; Reetz, 2002).

Enzim ortamlı işlemler çevreyi minimal oranda etkilemektedir (Falch, 1991). Bazı geleneksel kimyasal sentezlerle karşılaştırıldığında enzimatik işlemler daha çevre dostudur. Enzimlerin ayırım yetenekleri (stereoseçicilik ve substrat seçiciliği) diğer katalistlerden daha büyüktür. Bu enzimler yüksek oranda saflıkta yüksek değerli ürünler üretmek için kullanılabilirler. Enzimlerin katalitik etkisi (düşük aktivasyon enerjisi sonucunda) yenilenemeyen kaynakların enerji gereksinimini azaltmaktadır (Victor vd., 1997).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Besiyerlerinin tamamı 121 °C’de otoklavda 15 dk sterilize edilmiştir.

a) Nutrient Broth (NB) (Merck)

Meat pepton	5 g
Meat ekstrakt	3 g
Distile su	1000 ml
	pH 7.0

Bakterilerin aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

b) Nutrient Agar (NA) (Merck)

Meat pepton	5 g
Meat extract	3 g
Agar agar	12 g
Distile su	1000 ml
	pH 7.0

Bakterilerin koloni morfolojilerinin tespiti ve muhafaza edilmesinde kullanılmıştır.

c) *Pseudomonas* CFC Agar (Oxoid)

Jelatin pepton	16 g
Kazein hidrolizat	10 g
Potasyum sülfat	10 g
Magnezyum klorid	1.4 g
Agar	11 g
Distile su	1000 ml
	pH 7.1

Pseudomonas izolasyonunda kullanılmıştır. 50 °C'ye kadar soğutulan besiyerine *Pseudomonas* C-F-C Supplement (cephaloridin fucidin ceftrimid) (SR103) ilave edilmiştir.

d) Tribütirin Agar (TA) (Merck, 1.01958)

Meat pepton	2.5 g
Kazein pepton	2.5 g
Yeast ekstrakt	3 g
Agar	12 g
Tribütirin (Merck)	10 ml
Distile su	1000 ml
	pH 7.5

İzolatların lipolitik aktivitelerinin kalitatif olarak gözlenmesinde kullanılmıştır.

e) Rhodamine B Agar (Haba vd., 2000; Litthauer vd., 2002)

Nutrient broth (Difco)	8 g
NaCl	4 g
Agar	16 g
Distile su	1000 ml
	pH 7.0

İzolatların lipolitik aktivitelerinin doğrulanması amacıyla kullanılmıştır. pH 7'ye ayarlandıktan sonra besiyerine % 2.5 zeytinyağı eklenip 3 dakika sonikatör ile (KEMA KEUR PRO 200) emülsiyeye edilmiştir. 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilip 50 °C'ye kadar soğutulan besiyerine, 10 ml 0.2 µm por çaplı (Chromafil CA-20/25 S) filtre ile steril edilmiş Rhodamine B (Merck, 1.07599) boyasından (1mg/ml) ilave edilmiştir.

f) Mac Conkey Agar (Difco)

Baktopepton	17 g
Bakto proteaz pepton	3 g
Bakto laktoz	10 g
Bakto safra tuzları	1.5 g
Sodyum klorid	5 g
Bakto agar	13.5 g
Neutral red	0.03 g
Bakto kristal violat	0.001 g
	pH 7.1

İzolatların laktozu fermente etme yeteneklerini saptamada kullanılmıştır.

g) Hugh/Leifson (Sigma H-8282)

Peptic digest of animal tissue	2 g
Sodyum klorid	5 g
Dipotasyum fosfat	0.3 g
Glukoz	10 g
Bromtimol mavisi	0.05 g
Agar	2 g
	pH 7.1

İzolatların karbonhidratları ayrıştırmada oksidatif veya fermentatif metabolik yolu kullanma durumlarını saptamada kullanılmıştır.

h) Bazal Medium (Litthauer vd., 2002)

Nutrient broth	8 g
Glukoz	1 g
Tween 80	25 ml
Distile su	1000 ml
	pH 7.0

Ekstraselüler lipaz üretimini kantitatif olarak belirlemek amacıyla izolatların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan boya ve solusyonlar

a) Kristal Viyole

Kristal viyole	2 g
Etil alkol (% 95'lik)	20 ml
Amonyum oksalat (% 1'lik)	80 ml

Bir gece bekletilip süzülür.

b) Lugol

İyot	1 g
Potasyum iyodür	2 g
Distile su	300 ml

c) Safranin

Safranin	0.25 g
Etil alkol (% 95'lik)	10 ml
Distile su	100 ml

Bir gece bekletilip süzülür.

Kristal viyole, lugol ve safranin izolatların Gram reaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

d) Kovaks Ayırıcı

Tetrametil-para fenilendiamin dihidroklorid	1 g
Distile su	100 ml

Sitokrom oksidaz testi için kullanılmıştır.

e) Substrat Solusyonu (Winkler ve Stuckmann (1979)' ın metodu modifiye edilmiştir)

1. solusyon

pNPP (Sigma)	30 mg
İzopropil alkol (Merck)	10 ml

2. solusyon

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

1. solusyon ile 2. solusyonun karıştırılarak iyice çalkalanır.

İzolatların ekstraselüler lipaz aktivitelerinin kantitatif ölçümünde kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan tamponlar

50mM Tris-HCl Tamponu

Tris-HCl (Sigma)	4.4 g
Trizma Base (Sigma)	2.65 g
Distile su	1000 ml
	pH 8.0

İzolatların ekstraselüler lipaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesinde ve saflaştırılmış *P. fluorescens* RB02–3 lipazının karakterizasyonunda kullanılmıştır.

50mM Tris-HCl Tamponu

Tris-HCl (Sigma)	7.28 g
Trizma Base (Sigma)	0.47 g
Distile su	1000 ml
	pH 7.0

50mM Tris-HCl Tamponu

Tris-HCl (Sigma)	0.76 g
Trizma Base (Sigma)	5.47 g
Distile su	1000 ml
	pH 9.0

50 mM Sitrat Fosfat Tamponu

X= 0.2 M sitrik asit çözeltisi (19.21 g/l)

Y= 0.2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi (35.61 g/l)

pH: 3.0 (39.8 ml X + 10.2 ml Y)

pH: 4.0 (30.7 ml X + 19.3 ml Y)

pH: 5.0 (24.3 ml X + 25.7 ml Y)

pH: 6.0 (17.9 ml X + 32.1 ml Y)

X ve Y çözeltileri karıştırılarak son hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlanır.

50 mM Glisin-NaOH Tamponu

X= 0.2 M glisin çözeltisi (15.01 g/l)

Y= 0.2 M NaOH (8 g/l)

pH:10 (50 ml X + 32 ml Y)

pH: 10.6 (50 ml X + 45.5 ml Y)

X ve Y çözeltileri karıştırılarak son hacim distile su ile 400 ml'ye tamamlanır.

P. fluorescens RB02–3 lipazının karakterizasyonunda kullanılmıştır

3.1.4. İdentifikasyonda kullanılan test kitleri

İdentifikasyonda enterik olmayan Gram negatif basiller için spesifik olan API 20NE (Biomérieux) test kiti kullanılmıştır. API 20NE sistemi *Enterobacteriaceae* familyası dışındaki Gram negatif bakteri cinslerinin (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* vb) identifikasyonu için hazırlanmış, 8 geleneksel ve 12 asimilasyon testini içermektedir. API 20NE veri tabanı *Brucella* ve *Francisella* gibi gelişimleri için özel besiyerleri gerektiren cinsleri kapsamamaktadır. Böyle türlerin varlığı için ekstra deneyler ve doğrulama testleri yapılması gerekmektedir.

API 20NE stripleri kurutulmuş besiyeri ve substrat içeren 20 mikro tüpten oluşmaktadır. Saf bakteri kolonilerinden, steril tuzlu su süspansiyonları hazırlanarak bu mikro tüplere inoküle edilmiştir. İnkübasyon esnasında metabolizma kendiliğinden veya ayıraçlara bağlı olarak renk değişikliğine sebep olmaktadır. Asimilasyon testleri için ise AUX besiyeri ile karıştırılarak inoküle edilen bakteriler substratı kullanabilirlerse gelişebilmektedirler.

API 20NE Test Kitini Oluşturan Öğeler:

- 38 API 20NE stripi
- 38 İnkübasyon kutusu
- 38 ampul API 20NE (AUX) besiyeri
- 38 adet sonuç tablosu
- Mineral yağ
- MacFarland standart sıvısı

AUX Medium İçeriği:

-Amonyum sülfat	2 g
-Agar	1.5 g
-Mineral base	82.8 mg
-Aminoasit	250 mg
-Vitaminler vd	35.9 mg
-Fosfat buffer	0.04 M
-Distile su	1000 ml
	pH 7.1

Stripler ve API 20NE (AUX) medium 2–8 °C arasında buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Ayıraçlar ve İçerikleri

James	J2183 bileşiği	0.5 g
(5 ml)	HCl (1N)	100 ml
NIT 1	Sülfanilik asit	0.4 g
(5 ml)	Asetik asit	30 g
	H ₂ O	70 ml
NIT 2	N,N-dimetil-1-naftilamin	0.6 g
(5 ml)	Asetik asit	30 g
	H ₂ O	70 ml
Zn	Çinko tozu	10 g

NIT 1 ve Zn ayıraçları oda sıcaklığında, James ve NIT 2 ayıraçları ise 2–8 °C arasında karanlık bir ortamda buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Pseudomonas* izolasyonu

Bu çalışmada, 5 çiğ süt ve 11 UHT ile pastörize edilmiş süt örneği kullanılmıştır. Bu süt örnekleri 05.01.2007–27.03.2007 tarihleri arasında Muğla'dan toplanmış ve steril 200 ml'lik şişelere alınmıştır. Laboratuvara getirilen süt örnekleri +4 °C'de buzdolabında, şişe ağızları kapalı olarak muhafaza edilmiştir. *Pseudomonas* izolasyonu için çiğ sütlerden 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 ve 14 pastörize sütlerden 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 14, 17, 19 ve 20 günlük örneklerden 10^{-1} ,, 10^{-19} 'luk dilüsyonlar hazırlanmış ve steril pipetler ile 0.1'er ml alınarak *Pseudomonas* CFC Agar Besiyerlerine inokülasyonlar yapılmıştır. Petriler 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} 'lük dilüsyonlardan ekilen petrilerde çok yoğun üreme olduğu için bu dilüsyonlar izolasyon için kullanılamamıştır. Çiğ süt örneklerinden 14. günden sonra, UHT süt örneklerinde ise 20. günden sonra, kullanılan dilüsyonlardaki ekimlerde çok yoğun üreme olduğu için izolasyon gerçekleştirilememiştir. *Pseudomonas* CFC Agar Besiyerinden alınan tipik koloniler NA besiyerinde saflaştırılmış ve kolonilerin rengi, görünüşü, kıvamı vb gibi özellikleri incelenmiştir. Saf kültürler tüplere yatık olarak hazırlanan NA besiyerine ekilip +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiş ve kültürler 3 ayda bir yenilenmiştir.

3.2.2. Muhtemel *Pseudomonas* izolatlarında lipolitik aktivitenin belirlenmesi

Çalışmada yer alan her deney iki kez tekrar edilmiştir.

Elde edilen 85 muhtemel *Pseudomonas* izolatının lipolitik aktivitelerinin kalitatif olarak belirlenmesi amacı ile Tribütirin Agar besiyerlerine çizgi ekimleri yapılmış ve plaklar 30 °C'de 3-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda etrafında şeffaf zon oluşan kolonilerin lipolitik aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Meghwanshi vd., 2006).

İzolatların lipolitik aktivitelerinin doğrulanması amacı ile de % 2.5 zeytinyağı ilave edilerek hazırlanan Rhodamine B Agar Besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerine izolatlar çizgi ekim yapıldıktan sonra plaklar 30 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerindeki kırmızı renkli koloniler tespit edilmiştir. Kolonilerin etrafında oluşan turuncu hâleler ve ışımaya dereceleri de U.V. transilluminatörde (UVP, LMS-203 model) 365 nm’de gözlenmiştir (Haba vd., 2000; Litthauer vd., 2002).

3.2.3. Lipolitik aktivitesi olan muhtemel *Pseudomonas*’ların identifikasyonu

Lipolitik aktiviteleri farklı iki yöntemle tespit edilen muhtemel *Pseudomonas* izolatlarının cins düzeyinde Gram boyanma özellikleri, katalaz ve oksidaz reaksiyonları, laktozu ve glukozu fermente etme yetenekleri incelenerek tanımlanmıştır (Cruickshank vd.,1975; Collins vd., 1995).

3.2.3.1. İzolatların Gram boyanma özelliklerinin belirlenmesi

İzolatların saf kültürlerinden NA besiyerine çizgi ekimleri yapılarak 30 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bu petriyerdeki kolonilerden örnekler alınarak Gram boyamaları yapılmış ve mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.3.2. Katalaz etkinliği

Kültürlerin Nutrient Agar besiyerindeki 24 saatlik kolonilerinden öze yardımı ile alınmış ve fizyolojik su ile lam üzerinde dağıtılmıştır. Bunun üzerine % 3’lük H₂O₂’den 2-3 damla damlatılmış ve gaz kabarcıklarının gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bradshaw, 1963).

3.2.3.3. Sitokrom oksidaz testi

Kültürlerin 24 saatlik kolonilerinden, % 1’lik Kovaks ayırıcı emdirilmiş filtre kağıdına platin bir öze yardımı ile sürülmüştür. 10–60 sn içinde koyu mavi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Kovaks, 1956).

3.2.3.4. Laktozu fermente etme yetenekleri

İzolatların laktozu fermente etme yetenekleri Mac Conkey Agar besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Kültürlerin Nutrient Agar'da geliştirilen kolonilerinden Mac Conkey Agar besiyerine ekimleri yapılmış ve 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Mac Conkey Agar besiyerine bulunan ve pH indikatörü olan neutral red laktozun kullanıldığını ya da kullanılmadığını göstermektedir. Laktoz negatif bakteriler, renksiz koloni verirken; laktoz pozitif bakteriler pH'nın düşmesi sonucunda asit olduğundan kırmızı koloni vermekte ve zon ile çevrilmektedir (Mac Faddin,1985). 24 saatlik inkübasyondan sonra bu besiyerinde renksiz koloni veren laktoz negatif izolatlar seçilmiştir.

3.2.3.5. Oksidasyon/Fermentasyon testi

Het tüpte 5 ml olacak şekilde hazırlanan Hugh ve Leifson besi yerinden her izolat için 2'şer tane kullanılmıştır. Steril iğne öze taze kültüre batırılıp her iki besi yerine dikine daldırılmak suretiyle inoküle edilmiştir. Bir tanesine anaerobik koşulları sağlamak için 1 cm kalınlıkta olacak tarzda sıvı steril parafin ilave edilmiştir. Tüplerin ağzı iyice kapatılıp 37 °C'de 1-15 gün kadar inkübasyonda tutulup her gün kontrol edilmiştir.

Parafinsiz tüpte besiyerinin orijinal rengi olan mavi-yeşil sarıya dönerken üstü kapalı olan diğer tüpte ise herhangi bir değişikliğin gözlenmemesi durumu oksidasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir (Collins vd., 1995).

3.2.3.6. API 20NE identifikasyon testi

İzolatların içinde Gram negatif basil, oksidaz pozitif, katalaz pozitif, laktoz negatif ve oksidatif özellik gösterenler (Palleroni, 1984) API 20NE stripleri (BioMerieux) kullanılarak tür düzeyinde identifiye edilmiştir. İdentifikasyon API veri tabanı kullanılarak yapılmıştır.

Bu amaçla Nutrient Broth besiyerinden saf kültürler Nutrient Agar besiyerine ekilmiş ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu petrilerden steril bir plastik öze yardımı ile 1-4 koloni önceden kullanıma hazırlanmış 2 ml'lik % 0.85'lik steril serum fizyolojik tüplerine inoküle edilmiş ve steril mikropipetler kullanılarak

0.5 McFarland bulanıklığında homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan NO₃ testinden PNPG testine kadar hava kabarcığı kalmayacak şekilde sadece tüp kısımlarına inokülasyonlar yapılmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan 200 µl AUX Medium'a eklenerek mikropipet yardımı ile karıştırılmıştır. Bu karışım GLU testinden PAC testine kadar hem tüp hem de küpül kısımları dolacak şekilde inoküle edilmiştir. Son olarak GLU, ADH ve URE testleri için anaerobik bir ortam sağlamak amacıyla mikrotüplerin küpül kısımları steril mineral yağ ile doldurulmuştur.

Bir tabla ve bir kapaktan oluşan inkübasyon kaplarında nemli bir ortam sağlamak amacı ile 5 ml distile su petekli yapıdaki tablaya dağıtılmıştır. Mikrotüplerden oluşan stripler bu tablaya yerleştirilmiş ve kapakları kapatılmış ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda gelişen reaksiyonlar Tablo 3.1'e göre okunmuştur. Buna göre GLU, ADH, URE, ESC, GEL ve PNPG test sonuçları kaydedilmiştir. NO₃ testi için ise önce NIT 1 ve hemen ardından da NIT 2 ayıraçları damlatılarak 5 dk beklenmiş ve sonuç negatif ise 2-3 mg Zn tozu eklenerek 5 dk sonra tekrar sonuç alınmıştır. TRP testi için kuyucuğa 1 damla James ayıracağı damlatılarak reaksiyon sonucu hemen kaydedilmiştir. Asimilasyon testlerinde ise küpül kısmında opak renk gözlenmesi bakteriyel gelişmenin pozitif olduğunu göstermektedir.

İdentifikasyonda tür tespiti, elde edilen sonuçların analitik profil indeksi ile karşılaştırılmasıyla yapılmaktadır. Bu nedenle yapılan bu testlerin sonuçları sonuç çizelgesine kaydedilmiştir (Şekil 3.1). Sonuç çizelgesinde testler 3 testlik gruplar halinde ayrılmış ve gruptaki testler 1, 2 ve 4 sayılarını kodlayacak şekilde numaralandırılmıştır. Sonuç hanesindeki son test ise API 20NE identifikasyon testinde bulunmayan ve ayrı yapılan oksidaz testidir. Her grup içindeki sonuçlara bağlı olarak ortaya 7 haneli bir sayı ortaya çıkmaktadır. Yapılan bu testlerin sonucuna göre identifikasyon API veri tabanı kullanılarak yapılmıştır.

API® 20 NE

CE 07224 B

REF. : _____

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

24 h
48 h

NO₃ TRP GLU ADH URE ESC GEL PNG LGLU LARA IMNE IMAN INAG IMAL LGNT LCAP LADI MLT LGIT LPAC OX

24 h
48 h

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France

Şekil 3.1. API 20NE'ye ait boş sonuç çizelgesi

Tablo 3.1. API 20NE striplerindeki reaksiyonlar ve sonuçları

TESTLER	AKTİF İÇERİKLER	REAKSİYONLAR/ ENZİMLER	SONUÇLAR	
NO ₃	Potasyum nitrat	Nitrattan nitrite indirgenme	NEGATİF	POZİTİF
			<u>NIT1+NIT2/5dk</u> Renksiz pembe- kırmızı	
		Nitrattan nitrojene indirgenme	<u>Zn/5 dk</u> pembe renksiz	
TRP	L-triptofan	İndol üretimi	<u>James/hemen</u> renksiz pembe açık yeşil/sarı	
<u>GLU</u>	D-glukoz	Fermentasyon	mavi yeşil	sarı
<u>ADH</u>	L-arjinin	Arjinin DiHidrolaz	sarı	turuncu/pembe/ kırmızı
<u>URE</u>	Üre	Üreaz	sarı	turuncu/pembe/ kırmızı
ESC	Eskulin	Hidroliz (β-glukosidaz)	sarı	gri/kahverengi/ siyah
GEL	Jelatin	Hidroliz (proteaz)	siyah pigment yaygın değil	siyah pigment yaygın
PNPG	4-nitrofenil-βD-galaktopiranozid	B-galaktosidaz	renksiz	sarı
GLU	D-glukoz	Asimilasyon	şeffaf	opak
ARA	L-arabinoz	Asimilasyon	şeffaf	opak
MNE	D-mannoz	Asimilasyon	şeffaf	opak
MAN	D-mannitol	Asimilasyon	şeffaf	opak
NAG	N-asetil-glukozamin	Asimilasyon	şeffaf	opak
MAL	D-maltoz	Asimilasyon	şeffaf	opak
GNT	Potasyum glukonat	Asimilasyon	şeffaf	opak
CAP	Kaprik asit	Asimilasyon	şeffaf	opak
ADI	Adipik asit	Asimilasyon	şeffaf	opak
MLT	Malik asit	Asimilasyon	şeffaf	opak
CIT	Trisodyum sitrat	Asimilasyon	şeffaf	opak
PAC	Fenilasetik asit	Asimilasyon	şeffaf	opak
OX	Oksidaz testi	Sitokrom oksidaz	renksiz	menekşe moru

3.2.4. Kantitatif ekstraselüler lipaz aktivitesi tayini

3.2.4.1. Lipaz üretimi için uygun besiyerinin seçimi

Suşların ekstraselüler lipaz üretiminin en iyi olduğu besiyerinin seçilmesi amacı ile değişik besiyeri ortamları denenmiştir.

g/L: Nutrient broth 8, pH 7.0

g/L: Glukoz 2.0, pepton 0.5, yeast extract 5.0, Na₂SO₄ 2.0, KH₂PO₄ 1.0, K₂HPO₄ 3.0, MgSO₄.7H₂O 0.1, zeytinyağı 10.0 ml (v/v), pH 7.0 (Meghwanshi vd., 2006).

g/L: Tripton 10.1, yeast extract 0.2, arabic gum 0.2, NaNO₃ 0.2, MgSO₄ 1.0, glukoz 0.3, pH 6.5 (Ruchi vd., 2007).

g/L: Nutrient broth 8, glukoz 1, pH 7.0 (Labuschagne vd., 1997).

g/L: Nutrient broth 8, Tween 80 25, glukoz 1, pH 7.0 (Litthauer vd., 2002).

g/L: Tripton 10, yeast extract 5, NaCl 10, Tween 80 0.5, pH 7.0 (Chen vd., 2007).

g/L: Glukoz 20, yeast extract 10, pepton 10, CH₃COONa.3H₂O 10, MgSO₄ 0.3, MnSO₄ 0.1, KCl 0.5, CuSO₄.5H₂O 1.5 mg, zeytinyağı 20ml, pH 7.0 (Sarkar vd., 1998).

Çalışmada ise en iyi lipaz aktivitesinin gözlemlendiği Litthauer vd., (2002)'nin kullandığı besiyeri ortamı Bazal Medium olarak seçilmiştir.

3.2.4.2. Enzim üretimi

İdentifiye edilen her suş, ön kültür çalışması için Nutrient Broth'da geliştirilmiştir. Kültürlerin gelişme durumu spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 660 nm'de 0.5 OD absorbans verecek şekilde 30 °C'de Nutrient Broth'da geliştirilen

ön kültür 50 ml'lik erlenlerdeki 25 ml Bazal Medium'a % 2 oranında inoküle edilmiş ve 30 °C'de 130 rpm'de orbital çalkalayıcıda 48 saat geliştirilmiştir.

İnkübasyondan sonra kültürler 10 000 rpm'de 10 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde (Thermo-IEC) santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Süpernatant ekstraselüler enzim kaynağı olarak kullanılmış ve lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Lipaz aktivitesinin tayininde Winkler ve Stuckmann (1979)'ın tekniği kullanılmıştır. Fakat bu teknikle hazırlanan substrat solusyonu yeterince şeffaf olmadığı için lipaz aktivitesinin spektrofotometrik ölçümünde sonuç alınamamıştır. Bu nedenle bu teknik Gupta vd., (2002)'nin da belirttiği gibi *p*-NPP'in enzimatik hidrolizinden dolayı açığa çıkan yağ asitlerinin dağılmasına neden olan Triton X-100'ün miktarı artırılarak turbidite problemi ortadan kaldırılmıştır. Bu solusyon 2 saat stabil kalabildiği için (Savitha vd., 2007) her kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır. Substrat solusyonundan 9 ml alınarak 1 ml süpernatant ile karıştırılmış ve 30 °C'de 30 dakika çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir.

3.2.4.3. Ekstraselüler lipaz aktivitesinin tespiti

Suşların ekstraselüler lipaz aktiviteleri, *p*-nitrofenolpalmitat'ın (*p*NPP, Sigma N2752-1G) substrat olarak kullanıldığı, spektrofotometrik yöntemle 410 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Bu ölçüm temel olarak *p*-nitrofenol esterlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda meydana gelen *p*-nitrofenol'ün 410 nm'de kolorimetrik olarak tespit edilmesine dayanmaktadır (Winkler ve Stuckmann, 1979).

Bir lipaz ünitesi (U), dakikada 1 µmol *p*-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.4.4. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde standart olarak *p*-nitrofenol kullanılmıştır. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen (10 mM) *p*-nitrofenol'den seri standart çözeltiler hazırlanmıştır ve OD₄₁₀ nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen regresyon grafiğinden elde edilen eğim değeri aşağıdaki formüle yerleştirilmiş ve bu formülden yararlanılarak enzim aktivitesi U/ml olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = \frac{\Delta C \times V_T \times SF}{T_{(\text{dak})} \times V_E}$$

ΔC : Absorbans/eğim

V_E : Enzim hacmi

$T_{(\text{dak})}$: Zaman

V_T : Toplam reaksiyon hacmi

SF: Seyreltme faktörü

3.2.5. *P. fluorescens* RB02–3 suşunun hücre gelişimi ve lipaz üretimi

En yüksek lipaz aktivitesi gösteren *P. fluorescens* RB02–3 suşu 660 nm’de 0.5 OD absorbans verecek şekilde 30 °C’de Nutrient Broth’da geliştirilmiştir. Bu kültürden 1000 ml’lik erlende 300 ml Bazal Medium bulunan besiyerine % 2 oranında inoküle edilmiş ve 130 rpm’de 30 °C’deki çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Kültürün hücre yoğunluğu ve ekstraselüler lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Rajmohan vd., 2002). Buna göre 0. saatten başlayarak her 4 saatte bir 660 nm’de hücre yoğunluğu ölçülmüştür. Kültürün ekstraselüler lipaz aktivitesi ise *p*-NPP’ in substrat olarak kullanılmasıyla 410 nm’de gözlenmiştir

3.2.6. *P. fluorescens* RB02–3 suşunun protein konsantrasyonunun belirlenmesi

P. fluorescens RB02–3 suşunun protein miktarı standart olarak Bovine Serum Albumin kullanılarak Bradford Protein Tayin Yöntemine göre belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bu yöntemde boya olarak proteinlerdeki pozitif yüklere bağlanan negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G–250 kullanılmıştır.

Bu amaçla 100 mg Coomassie Brilliant Blue boyası, 50 ml % 95’lik etanolde çözülerek homojen mavi renkli bir çözelti elde edilmiştir. Bunun üzerine 100 ml fosforik asit (% 85) yavaş yavaş eklenmiştir. Boya tamamen çözüldükten sonra bu çözeltinin üzerine distile su yavaşça ilave edilerek toplam hacim 1 L’ye

tamamlanmış ve kullanmadan önce filtre kağıdı (Whatman #1) kullanılarak süzülmüştür (Bradford, 1976; Stoscheck, 1990).

Temiz bir tüpün içine protein örneğinden 100 µl alınıp üzerine 5 ml boya solüsyonundan ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. 5 dk sonra, 595 nm'de spektrofotometrede absorbans değeri alınmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinden Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılarak hazırlanan standart eğriye göre total protein miktarları belirlenmiştir.

3.2.7. BSA standart eğrinin hazırlanması

Protein miktarının belirlenmesinde standart olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. BSA'dan 10 mg/ml konsantrasyonda stok solüsyon hazırlanmıştır. Pipet ile 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µl BSA (10 mg/ml) test tüplerine alınmış ve her biri distile su ile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Bunların üzerine 5 ml boya solüsyonu ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. 5 dk sonra, 595 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri alınmıştır.

3.2.8. Ekstraselüler lipaz enziminin saflaştırılması

3.2.8.1. Amonyum sülfat [(NH₄)₂SO₄] çöktürmesi

Çalışmada, çöktürme için öncelikle bazal besiyerinden 1000 ml hazırlanmıştır. Bu besiyerine *P. fluorescens* RB02-3 suşunun NB'de geliştirilen 0.5 Mc Farland standartındaki ön kültüründen % 2 oranında inoküle edilmiştir. 130 rpm'deki çalkalamalı inkübatörde 30 °C'de en iyi aktivitenin gözlemlendiği geç logaritmik faz olan 40. saate kadar geliştirilmiştir. Daha sonra 10 000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant alınmıştır. Optimum amonyum sülfat konsantrasyonunu tespit etmek amacı ile farklı oranlardaki amonyum sülfat ile çöktürme işlemleri yapılmıştır. Bu işlem için süpernatantın hacmi ölçülmüştür ve katı haldeki amonyum sülfat'tan çöktürme için gerekli olan miktar tartıldıktan sonra soğuk ortamda protein çözeltilisine yavaş yavaş karıştırılarak ilave edilmiştir. Daha sonra karıştırma işlemine +4 °C'de 1 saat daha devam edilmiştir.

1 saat sonra çözeltili 10 000 rpm'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu içinde

çözölmüştür ve lipazın hangi % amonyum sülfat çöktürmesinde olduğunu anlamak üzere lipaz aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek lipaz aktivitesi gösteren amonyum sülfat doygunluk derecesi optimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

2.3.8.2. Diyaliz

Diyaliz yönteminde kullanılacak olan diyaliz tüpünün (SERVA, MEMBRACEL, MWCO 7.000) kullanıma hazır hale getirilmesi için tüp distile su içinde 70-80 °C'de tüpe zarar vermeyecek bir aparatla yavaşça karıştırılarak 2 saat ısıtılmıştır. 2 saat sonra bu su dökölmüş ve işlem en az 3 kere tekrarlanmıştır. Tüp, işlemin yapılacağı güne kadar % 0.1 sodyum azid solüsyonunda +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Diyaliz tüpünden diyaliz edilecek olan enzim sıvısını alabilecek uzunlukta kesilmiş ve tüpün içi ve dışı distile su ile iyice yıkanmıştır. Tüpün bir ucu diyaliz klipsleri kullanılarak kapatılmıştır. Diyaliz edilecek örnek diyaliz tüpünün içine konulmuştur ve diyaliz tüpünün en üst kısmında diyaliz tüpünün şişme ihtimali düşünülerek boşluk bırakılmıştır. Tüpteki hava uzaklaştırılarak tüpün en üst kısmı diyaliz klipsi ile sıkıca tutturulmuştur. Tüm bu işlemler sırasında diyaliz tüpünün hiç kurumamasına dikkat edilmiştir.

Hazırlanan diyaliz tüpü 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tamponu içine bırakılmış ve magnet çubuklar yardımıyla çok yavaş bir şekilde tamponun karıştırılması sağlanmıştır. Bu sistem +4 °C'de gece boyunca (yaklaşık 16-18 saat) dengeye ulaşmaya bırakılmıştır.

3.2.8.3. Jel filtrasyon kromatografisi

Saflaştırmanın diğer bir basamağı olan jel filtrasyon kromatografisinde dolgu materyali olarak Sephadex G-100 (Sigma S6147) kullanılmıştır. 8 g Sephadex G-100 tartılarak 300 ml distile suda çözülmüştür ve ışık almaması için şişenin etrafı alüminyum folyo ile sarılmıştır. Oda sıcaklığında Sephadex G-100'ün şişmesi için 3-5 gün beklenmiştir (Söylemez ve Fadiloğlu, 1996). Sephadex G-100 iyice şiştikten sonra 2,5 x 35 cm boyutlarında cam kolona doldurulup kolonda tam olarak

oturması ve hava kabarcığı oluşmaması için hafifçe kolona vurularak yerleşmesi sağlanmıştır.

Kolon içindeki Sephadex G-100'ün kurumamasına dikkat edilerek 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tamponu ile bir gün boyunca yıkanmıştır. Daha sonra 150 ml hacmindeki protein solüsyonu kolona yüklenmiş ve 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tamponu ile yürütülmüştür. Fraksiyon toplayıcı (Isco, Foxy 200 model) ile fraksiyonlar toplanmış ve bu fraksiyonlardaki lipaz aktivitesini belirlemek amacıyla spektrofotometrik olarak aktivite tayinleri yapılmıştır.

Fraksiyon toplama işlemi lipaz aktivitesi görülmez oluncaya kadar devam edilmiştir. Kolonun iyice temizlenmesi amacı ile de 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra lipaz aktivitesi belirlenen fraksiyonlar birleştirilerek tekrar kolona yüklenmiş ve işlem tekrarlanmıştır.

Ekstraselüler lipazın saflaştırma basamaklarının her aşamasında lipaz aktivitesi ve protein miktarları hesaplanmış ve toplam hacim, toplam protein, toplam aktivite, spesifik aktivite, ürün verimi ve saflaştırma katsayısı aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\text{Protein}_{(mg/ml)} = \frac{\text{Absorbans}_{(595)} / \text{Eğim} \times \text{Seyreltme Faktörü}}{1000}$$

$$\text{Toplam Protein}_{(mg)} = \text{Protein} \times \text{Toplam Hacim}$$

$$\text{Toplam Aktivite}_{(U)} = \text{Lipaz Aktivitesi} \times \text{Toplam Hacim}$$

$$\text{Spesifik Aktivite}_{(U/mg)} = \frac{\text{Toplam Aktivite}}{\text{Toplam Protein}}$$

$$\text{Ürün Verimi} = \frac{\text{O Basamakta Ölçülen Toplam Aktivite} \times 100}{\text{İlk Basamakta Okunan Toplam Aktivite}}$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{\text{Ölçülen Spesifik Aktivite}}{\text{İlk Okunan Spesifik Aktivite}}$$

3.2.9. Lipazın moleküler ağırlığının belirlenmesi (SDS-PAGE)

Protein ve peptitleri moleküler ağırlıklarına göre ayırma ilkesine dayanan, sodyum dodesil sülfat/poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) enzim çalışmalarında en çok kullanılan elektroforetik yöntemdir (Copeland, 2000). Çalışmada saflaştırma basamaklarından geçirilen örneklerdeki proteinin izolasyonu Pot ve ark. metoduna göre elde edilmiş olup (Pot vd., 1994), proteinin moleküler ağırlığına göre ayırımı SDS-PAGE tekniği ile Laemmli'ye göre yapılmıştır (Laemmli, 1970).

Bu teknikte kullanılan tamponlar ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir:

1. Resolving jel (Ayrıcı Jel) (% 10'luk)

Acryl-Bisacryl (% 30)	11.56 ml
Distile su	14.26 ml
1.5M Tris.HCl. (pH : 8.6)	8.66 ml
Amonyum persulfat (APS) % 10'luk	173.4 µl
TEMED	30 µl

2. Stacking Jel (Yığıma Jel) (% 4'lük)

Acryl-Bisacryl (% 30)	1.64 ml
Distile su	5.86 ml
0.5M Tris.HCl. (pH : 6.8)	2.5 ml
Amonyum persulfat (APS) % 10'luk	60 µl
TEMED	10 µl

3. Running buffer (Yürütme Tamponu)

Trizma-base	1.21 g
Glisin	5.76 g
SDS	1.0 g
Distile su	1000 ml

4. Sample Buffer (Örnek Tamponu) (pH : 6.8)

Trizma-Base	0.75 g
2-merkaptto etanol	5 ml
Gliserol	10 ml
Brom fenol mavisi	1 mg
Distile su	100 ml

5. Staining Solution (Boyama Solüsyonu)

Coomassie Brilliant Blue R 250	1.5 g
İzopropil alkol	250 ml
Asetik asit	100 ml
Distile su	650 ml

6. Destaining Solution (Boya Çıkarıcı Solüsyon)

İzopropil alkol	250 ml
Asetik asit	100 ml
Distile su	650 ml

3.2 9.1. Örneklerin hazırlanışı

Protein örneklerinden 100 µl, 1.5 ml'lik konik uçlu ependorf tüplerine alınmıştır. Örneklerin üzerine 25 µl sample buffer (örnek tamponu) eklenmiş ve vorteksle süspansiyonun iyice karışması sağlanmıştır. Örneklerin üzerine 0.1 ml % 20 SDS ilave edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar 95-100 °C sıcaklıktaki kaynar suda 10 dakika bekletilmiştir.

Elde edilen protein örnekleri % 10'luk SDS-PAGE' de koşuturulmuştur. Yükleme haricinde geri kalan örnekler de - 20 °C' de saklanmıştır. Protein örnekleri

ile birlikte her jelde 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 kDa moleküler ağırlığına sahip 7 saf protein bandı içeren protein moleküler ağırlık markeri (MBI Fermentas, SM 0431) yüklenmiş ve elde edilmiş olan protein örnekleri ile birlikte yürütülmüştür.

3.2.9.2. SDS-PAGE uygulaması

Aparatın camları (0.75mm x 16cm x 21cm) alkolle iyice temizlenip kurulandıktan sonra spacer yerleştirilmiştir. İşlem sonunda spacer, 2 cam arasında kalmış ve arada boşluk oluşması sağlanmıştır. Aparat hazırlandıktan sonra önceden hazırlanmış olan % 10'luk ayırıcı jel (resolving jel) iki cam arasına dökülmüştür. Burada jelin hava ile temasını kesmek için üzeri tamamen saf su ile doldurulmuştur. Jelin polimerize olması için yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Resolving jel polimerize olduktan sonra üzerindeki saf su boşaltılmış ve bunun yerine % 4'lük yığıma jel (Stacking jel) ilave edilmiştir. Bu işlemden sonra yığıma jel içerisine plastik tarak yerleştirilerek örneklerin yükleneyeceği çukurluklar hazırlanmıştır.

Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarılmış ve çukurlukların içi yürütme tamponu ile yıkanmıştır. Elektroforez tankının içi de yürütme tamponu ile doldurulmuş ve hazırlanan protein örnekleri jel çukurluklarına yüklenmiştir. Tüm bu işlemler esnasında jelin içinde ve arasında hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edilmiştir.

Yüklenmiş örnekler 100 Volt, 25 miliamperde elektroföreze tabi tutulmuştur. Daha sonra izleme boyasına bakılarak jelin altında 1.5 cm mesafe kalınca elektroforez durdurulmuştur. Elektroforezden sonra jel camların arasından dikkatlice çıkarılarak boyama solüsyonunda bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün boya çıkarıcı solüsyona alınarak devamlı yıkanmış ve bu solusyonda bir gece bekletilmiştir. Bu işlemlerle jelin boyasının çıkarılarak protein bantlarının görünür hâle gelmesi sağlanmıştır. Protein bantları tamamen görünür hâle gelince white light transilluminator (UVP Model TW-26) cihazı kullanılarak jelin fotoğrafı çekilmiş ve oluşan bantlar marker bantları ile karşılaştırılmıştır.

3.2.10. *P. fluorescens* RB–02–3 suşu lipazının karakterizasyonu

Saflatırılmış *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin sahip olduğu özellikler belirlenerek karakterize edilmiştir. Bu enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değeri belirlenmiştir. Bu amaçla, bu enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değeri belirlenerek, farklı organik çözücüler, ağır metaller ve çeşitli ajanların varlığında aktivite profilinin belirlenmesi amacıyla aktivite testleri yapılmıştır.

3.2.10.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

P. fluorescens RB02–3 suşu lipazının en yüksek aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek üzere yapılan çalışmada, pH'ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 10.6 olan 50 mM'lık farklı tamponlar kullanılmıştır. pH 3.0–6.0 aralığında sitrat fosfat tamponu, pH 7.0-9.0 aralığında Tris-HCl tamponu, pH 10.0-10.6 aralığında da glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. Çalışmada farklı pH değerlerindeki tamponlar kullanılarak substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Substrat solusyonundan 9 ml alınarak 1 ml enzim ile karıştırılmış ve 30 °C'de 30 dakika çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek spektrofotometrik olarak lipaz aktiviteleri belirlenmiştir. Belirlenen pH, bu aşamadan sonra yapılan tüm aktivite testlerinde kullanılmıştır.

3.2.10.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

P. fluorescens RB02–3 suşu lipazının en yüksek aktivite gösterdiği reaksiyon sıcaklığını belirlemek amacıyla; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda lipaz aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmada lipazın en iyi aktivite gösterdiği pH'sı 7.0 olan Tris-HCl tamponu kullanılarak hazırlanan substrat solusyonu kullanılmıştır. Lipazın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık, bundan sonra yapılan tüm aktivite testlerinde kullanılmıştır.

3.2.10.3. Organik çözücülerin *P. fluorescens* RB02–3 suşu lipazı üzerine etkileri

Aynı suşa ait lipaz enziminin aktivitesi üzerine organik çözücülerden hekzan, etil asetat, izopropanol, etanol ve butanolün etkisi araştırılmıştır. 3 ml enzim 1 ml organik çözücü ile karıştırılmış ve 30 °C sıcaklıktaki çalkalayıcı da 1 ve 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında organik solvet içermeyen enzim tampon (3:1) karışımı kullanılmıştır. Ön inkübasyon sonucunda 1. ve 2. saatlerde 1 ml enzim alınmış ve pH'sı 7.0 olan Tris-HCl tamponu kullanılarak hazırlanan substrat solusyonundan 9 ml alınarak karıştırılmıştır. 50 °C sıcaklıkta 30 dk 130 rpm'deki çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiş ve spektrofotometrik olarak lipaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.10.4. Ağır metallerin *P. fluorescens* RB02–3 lipazı üzerine etkisi

Ağır metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile MnCl₂, FeCl₃, CdCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, CuCl₂ ve NiCl₂ kullanılmıştır. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında ağır metal içermeyen örnekler kullanılmıştır. Son derişimi 1 mM olacak şekilde metal iyonu ile enzim karıştırılmış ve 30 dk oda sıcaklığında ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Ön inkübasyon sonunda pH'sı 7.0 olan Tris-HCl tamponu kullanılarak, 50 °C sıcaklıkta lipaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.10.5. Çeşitli ajanların *P. fluorescens* RB02–3 lipazı üzerine etkisi

P. fluorescens RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin aktivitesi üzerine çeşitli ajanların etkisinin araştırılması amacı ile son derişimi 5 mM olacak şekilde, sırasıyla SDS, Tween 80 ve EDTA ile enzim karıştırılmış ve 30 °C sıcaklıkta 30 dk ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında herhangi bir ajan içermeyen örnekler kullanılmıştır. Ön inkübasyon sonunda pH'sı 7.0 olan Tris-HCl tamponu kullanılarak, 50 °C sıcaklıkta lipaz aktivitesi belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Pseudomonas* İzolasyonu

Araştırmada 05.01.2007–27.03.2007 tarihleri arasında Muğla'dan toplanan 5 çiğ süt ve 11 UHT ile pastörize edilmiş süt örneklerinden hazırlanan seri dilüsyonlardan *Pseudomonas*'lar için seçici bir besiyeri olan *Pseudomonas* CFC Agar besiyerine inokülasyonlar yapılmıştır. 30 °C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra koloni morfolojileri değerlendirilerek 85 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar çiğ sütlerden 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 ve 14 pastörize sütlerden 4, 5, 8, 9, 14, 17, 19 ve 20 günlük örneklerden elde edilmiştir. 85 izolatın 50'si çiğ süt örneklerinden, 35 tanesi de UHT süt örneklerinden izole edilmiştir. İzolatlar NA besiyerine alınarak koloni morfolojileri incelenmiştir..

4.2. Muhtemel *Pseudomonas* İzolatlarında Lipolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Elde edilen muhtemel *Pseudomonas* izolatlarının lipolitik aktiviteleri kalitatif olarak Tribütrin Agar besiyerlerinde 30 °C'de 3-5 gün inkübe edilerek belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda tüm izolatlara ait kolonilerinin etrafında şeffaf zon oluştuğu gözlenmiş ve lipolitik aktiviteleri pozitif olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.1'de RB02–3 izolatının Tribütirin Agar besiyerinde lipolitik aktivitesinden dolayı oluşturduğu zon görülmektedir.

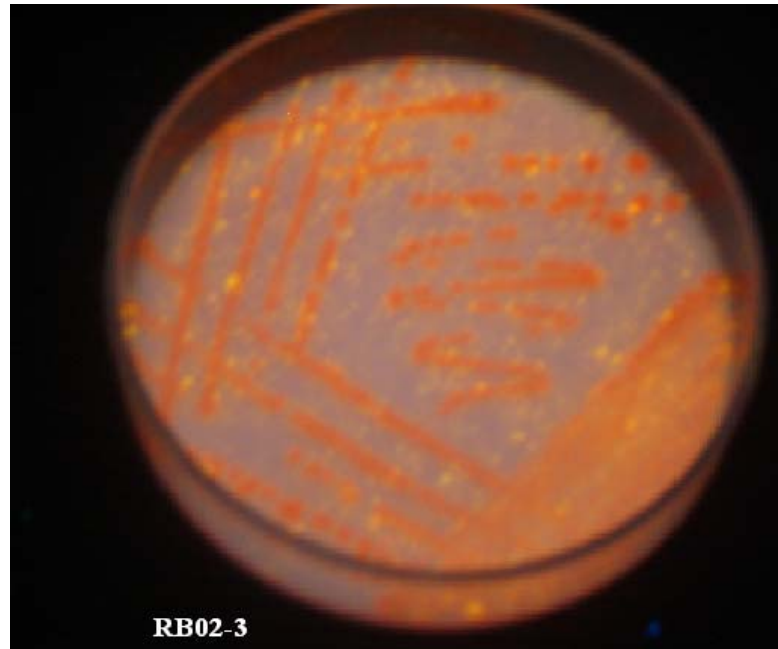


Şekil 4.1. RB02-3 izolatının Tributirin Agar besiyerinde görünümü

Aynı izolatların ekstraselüler lipolitik aktiviteleri Rhodamine B Agar besiyeri kullanılarak tekrar test edilmiştir. Bu amaçla izolatların Rhodamin B Agar besiyerinde 30 °C’de 24 saat’lik inkübasyonları sonunda, tüm izolatların farklı tonlarda pembe renkli koloni oluşturdukları ve 365 nm’deki UV ışığı altında da farklı derecelerde ışımaya yaptıkları gözlenmiştir. İzolat RB02-3’ün Rhodamin B Agar besiyerinde oluşturduğu pembe renkli kolonilerin Şekil 4.2’ de görünür ışıktaki, Şekil 4.3’te UV ışığı altındaki görünümleri verilmiştir.



Şekil 4.2. İzolat RB02-3'ün Rhodamin B Agar besiyerinde görünür ışıktaki oluşturduğu pembe renkli koloniler



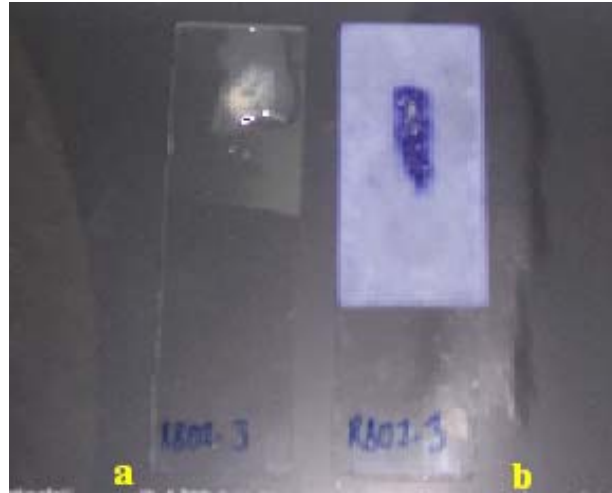
Şekil 4.3. İzolat RB02-3'ün Rhodamin B Agar besiyerinde oluşturduğu pembe renkli kolonilerin UV ışığı altındaki görünümü

4.3. Lipolitik Aktivitesi Olan İzolatların Tanımlanması

Lipolitik aktiviteleri farklı iki yöntemle tespit edilen muhtemel *Pseudomonas* izolatlarının öncelikle Gram boyanma özellikleri, katalaz ve oksidaz reaksiyonları, Mac Conkey Agar besiyerindeki gelişme durumları ve glukozu fermente yetenekleri incelenmiştir.

Pseudomonas CFC Agar besiyerinden izole edilen 85 izolatın Gram boyamaları yapılmış ve mikroskop altında incelenmiştir. Yapılan Gram boyama sonucunda 2 izolatın Gram pozitif kok, 83 izolatın da Gram negatif basil olduğu bulunmuştur ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarına 83 Gram negatif izolat ile devam edilmiştir.

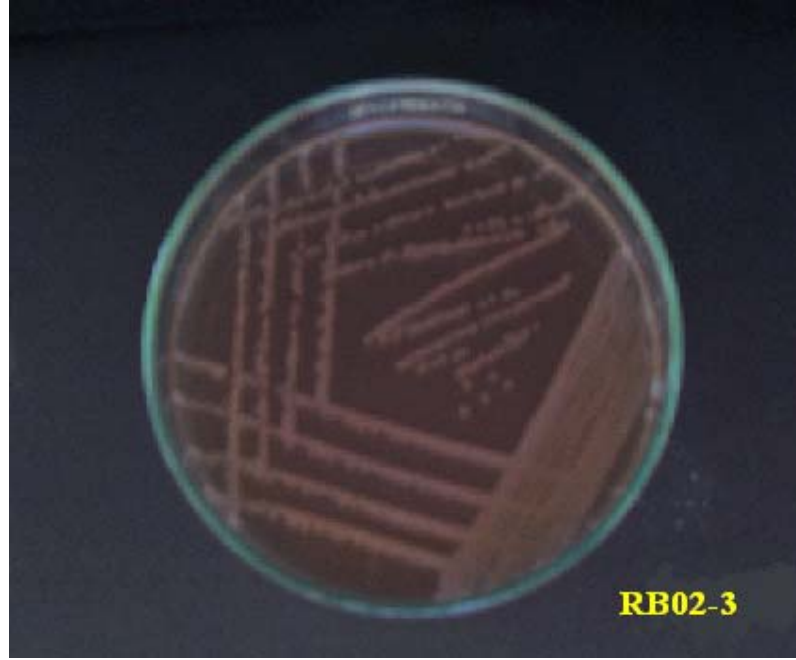
83 Gram negatif izolata yapılan katalaz ve oksidaz testi sonucunda 82 izolatın katalaz (+) özellik, 50 izolatın da oksidaz (+) özellik gösterdiği gözlenmiştir. Şekil 4.4'de izolat RB02-3'ün katalaz ve oksidaz testi sonucunda verdiği pozitif reaksiyon görülmektedir.



Şekil 4.4. İzolat RB02-3'ün katalaz ve oksidaz testleri sonucunda verdiği pozitif reaksiyon a) katalaz b) oksidaz

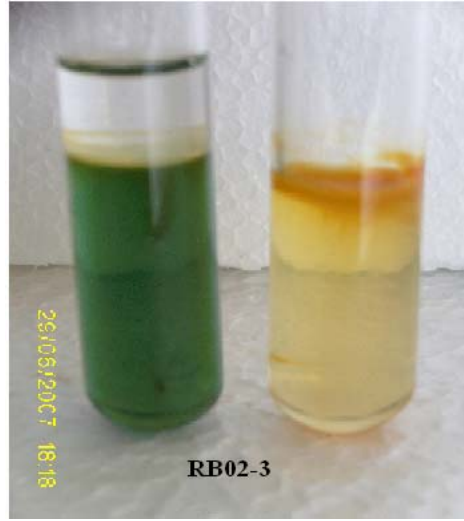
83 Gram negatif izolatın laktozu fermente yeteneklerini saptamak amacıyla, kültürler Mac Conkey Agar besiyerine inoküle edilmiştir. 30 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda 68 izolatın Mac Conkey Agar'da renksiz koloni oluşturduğu

(laktoz negatif) gözlenmiştir. Şekil 4.5’de izolat RB02-3’ün Mac Conkey Agar besiyerinde oluşturduğu renksiz kolonilerin görünümü verilmiştir.



Şekil 4.5. İzolat RB02-3’ün Mac Conkey Agar besiyerindeki görünümü

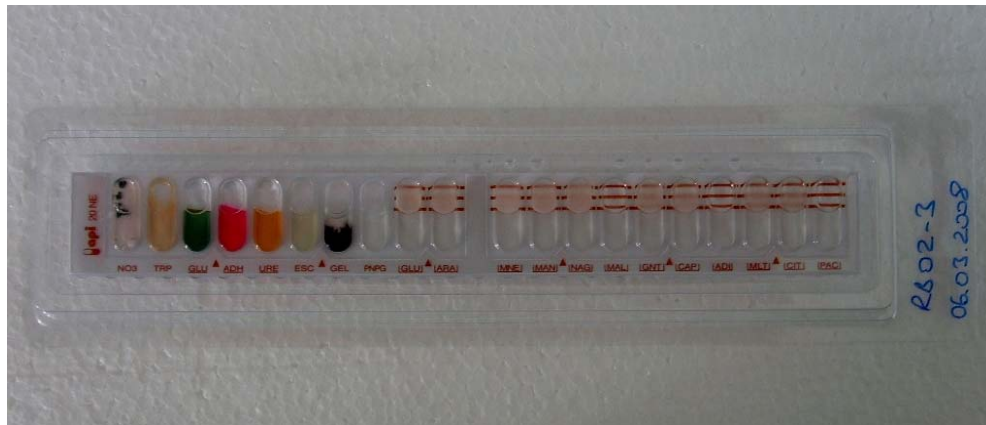
Tüm bu testler sonucunda 83 Gram negatif izolat içinden katalaz (+), oksidaz (+) ve laktoz (-) 45 izolat olduğu saptanmıştır. Bu 45 izolatın glukozu fermente etme yeteneklerini saptamak amacı ile O/F testi yapılmış ve 37 izolatın oksidatif özellik gösterdiği gözlenmiştir. Şekil 4.6’da izolat RB02-3’ün O/F testi sonucunda oksidatif özellik göstermesi nedeni ile açık tüpün orijinal rengi olan mavi-yeşil’in sarıya dönerken kapalı tüpte herhangi bir değişiklik olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.6. İzolat RB02-3'ün O/F testi sonucu görünümü

4.4. İzolatların Tür Düzeyinde Tespiti

Gram negatif basil, katalaz (+), oksidaz (+), laktoz (-) ve O/F testi sonucunda oksidatif özellik gösteren 37 muhtemel *Pseudomonas* izolatının tür düzeyinde tespiti amacı ile API 20NE identifikasyon test kitleri kullanılmıştır. Şekil 4.7'de RB02-3 kodlu izolatın API 20NE stripindeki reaksiyonları görülmektedir.



Şekil 4.7. İzolat RB02-3'ün API 20NE stripindeki reaksiyonları

37 izolata yapılan API 20NE identifikasyon testi sonucunda tüm suşların *Pseudomonas* cinsine ait olduğu doğrulanmıştır. Bu suşların 36 tanesi (% 97.3) *P. fluorescens*, 1 (% 2.7)'de *P. putida* olarak identifiye edilmiştir. Tablo 4.1'de izolatların API 20NE identifikasyon testi sonuçları verilmiştir.

Bu 37 suşun 4 (% 10.81)'ünün UHT, 33 (% 89.19)'unun da çiğ süt kökenli olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlara göre *Pseudomonas* izolasyonu yapılan süt örnekleri ve izolasyonların kaç günlük süt örneklerinden elde edildiği Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1. İzolatların API 20NE identifikasyon testi sonuçları

İzolat No	İdentifikasyon Sonucu	İdentifikasyon (%)
RB01-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB01-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.8
RB02-7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB02-16	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB07-4	<i>Pseudomonas putida</i>	% 99.7
RB07-13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB08-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB08-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-10	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 82.3
RB16-13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-20	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-22	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-23	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-27	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-28	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 99.9
RB16-29	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	% 82.3

Tablo 4.2. *Pseudomonas* izolasyonu yapılan süt örnekleri

Suş	Süt Örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB01-1	8 günlük UHT süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB01-2	8 günlük UHT süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-3	7 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-4	7 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-5	3 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-6	3 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-7	3 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-8	3 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-9	3 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-11	4 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-13	4 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-14	4 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-15	4 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-16	4 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas putida</i> RB07-4	17 günlük UHT süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB07-13	17 günlük UHT süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB08-1	5 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB08-2	5 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-1	3 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-3	3 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-6	4 günlük iğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-7	4 günlük iğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-8	4 günlük iğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-9	4 günlük iğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-10	3 günlük iğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-11	3 günlük iğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-13	3 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-14	5 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-15	5 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-19	6 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-20	4 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-22	5 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-23	5 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-24	7 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-27	7 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-28	5 günlük çiğ süt örneği
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-29	8 günlük çiğ süt örneği

4.5. Kantitatif Ekstraselüler Lipaz Aktivitesi Tayini

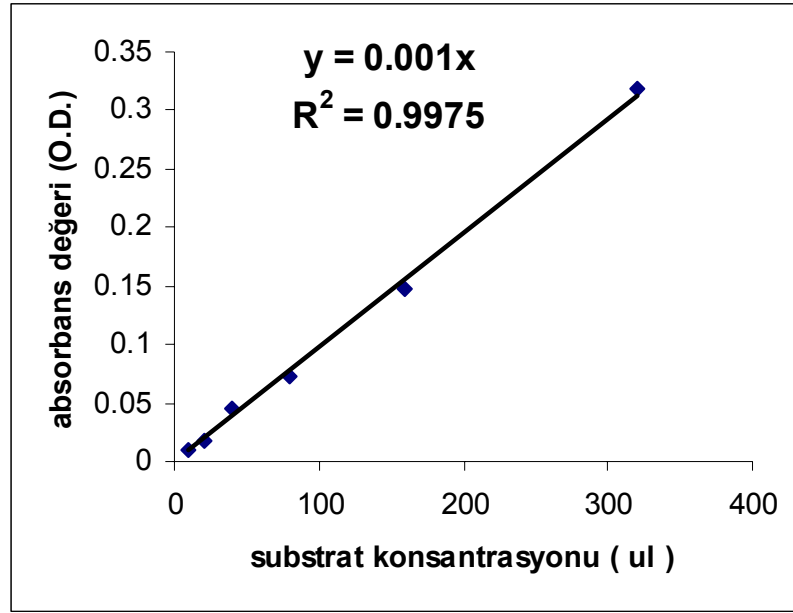
4.5.1. Lipaz üretimi için uygun besiyerinin seçimi

İdentifikasyonu tamamlanan ve *Pseudomonas* olduğu kesinleşen 37 suş ekstraselüler lipaz üretimi için NB'da geliştirilmiştir. Besiyeri içeriğinde yer alan karbon ve azot kaynakları, inorganik tuzların konsantrasyonu gibi faktörlerin ekstraselüler lipaz üretimini etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle suşların lipaz üretimlerinin belirleneceği besiyerinin seçilmesi amacı ile NB dahil 7 farklı besiyeri ortamı denenmiş ve bu besiyerlerinde suşların lipaz aktiviteleri ölçülmüştür. En iyi aktivite Litthauer vd., (2002)'nin *Pseudomonas luteola*'nın enzim üretimi için kullandığı besiyerinde görülmüş ve bu besiyeri Bazal Medium olarak seçilmiştir.

4.5.2. Ekstraselüler lipaz aktivitesinin tespiti

Suşların ekstraselüler lipaz aktiviteleri, *p*-nitrofenolpalmitat'ın substrat olarak kullanıldığı, spektrofotometrik yöntemle 410 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenmiştir.

Derişimi bilinen *p*NPP'ın substrat olarak kullanılmasıyla yapılan spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hazırlanan standart eğriye göre lipaz aktiviteleri belirlenmiştir. Şekil 4.8'de *p*NPP'ın substrat olarak kullanıldığı lipaz aktivitesi standart grafiği görülmektedir.



Şekil 4.8. *p*NPP'in substrat olarak kullanıldığı lipaz aktivitesi standart grafiği

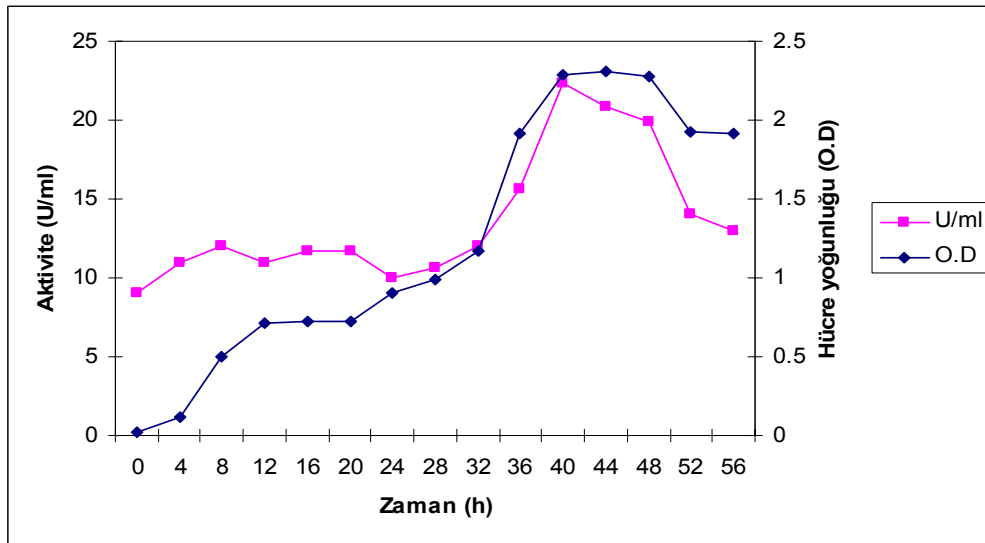
Ekstraselüler lipaz aktivitesinin kantitatif tayini için yapılan spektrofotometrik ölçüm sonucunda suşların farklı oranlarda lipaz aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir. Suşların ekstraselüler lipaz aktiviteleri Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Suşların ekstraselüler lipaz aktiviteleri

Suş	Enzim Aktivitesi (U/ml)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB01-1	18.73
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB01-2	14.00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-3	22.16
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-4	15.00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-5	20.00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-6	13.73
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-7	21.22
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-8	13.70
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-9	18.70
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-11	13.50
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-13	20.56
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-14	19.00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-15	17.06
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB02-16	21.50
<i>Pseudomonas putida</i> RB07-4	19.63
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB07-13	19.03
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB08-1	21.90
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B08-2	21.84
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-1	18.27
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-3	18.30
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-6	18.80
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-7	13.33
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-8	19.70
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-9	19.83
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-10	18.00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-11	17.03
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-13	19.20
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-14	20.30
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-15	20.60
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-19	18.90
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-20	21.20
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-22	17.60
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-23	18.60
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-24	11.60
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-27	17.00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-28	19.30
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RB16-29	10.03

4.6. *P. fluorescens* RB02–3 Suşunun Hücre Gelişimi ve Lipaz Üretimi

En yüksek lipaz aktivitesi gösteren *P. fluorescens* RB02–3 suşunun Bazal Medim’da saatlere göre gelişimi ve ekstraselüler lipaz üretimi spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Suşun hücre yoğunluğu 660 nm’de, lipaz üretimi ise *p*-NPP’in substrat olarak kullanılmasıyla 410 nm’de tespit edilmiştir. *Pseudomonas fluorescens* RB02–3 suşunun Bazal Medium’daki hücre yoğunluğu ve ekstraselüler lipaz aktivitesi Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek lipaz üretimi 40. saatte geç logaritmik fazda gözlenmiştir. 40. saatten sonra ise lipaz aktivitesi azalmaya başlamıştır.



Şekil 4.9. *Pseudomonas fluorescens* RB02–3 suşunun Bazal Medium’daki hücre yoğunluğu (◆) ve ekstraselüler lipaz aktivitesi (■)

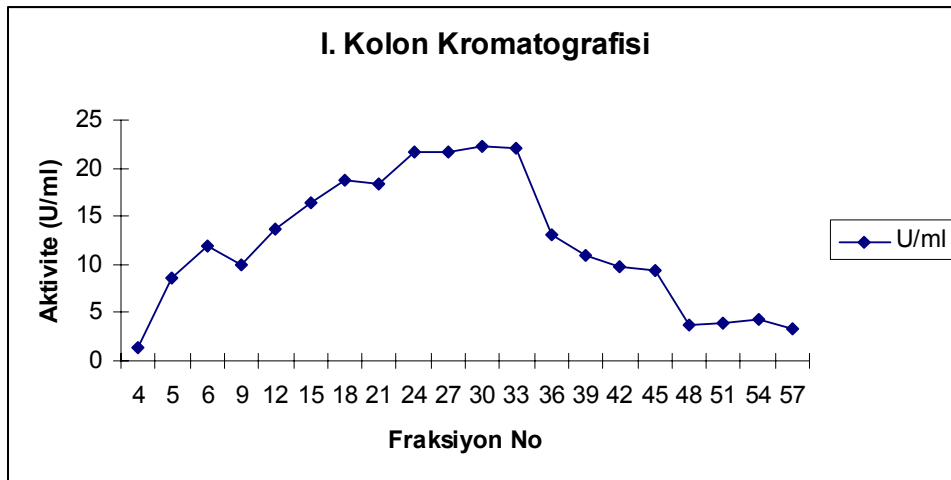
4.7. Ekstraselüler Lipaz Enziminin Saflaştırılması

P. fluorescens RB02–3 suşunun 40 saatlik sıvı kültürü 10 000 rpm’de 10 dakika +4 °C’de santrifüjlenmiş ve süpernatant enzim solusyonu olarak kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen ekstraselüler lipaz enziminin saflaştırılması amacı ile yapılan amonyum sülfat çöktürmesinde en iyi çökmenin sağlandığı izoelektrik noktası olan pH 4’e ayarlanmıştır. Optimum amonyum sülfat konsantrasyonu tespiti için farklı

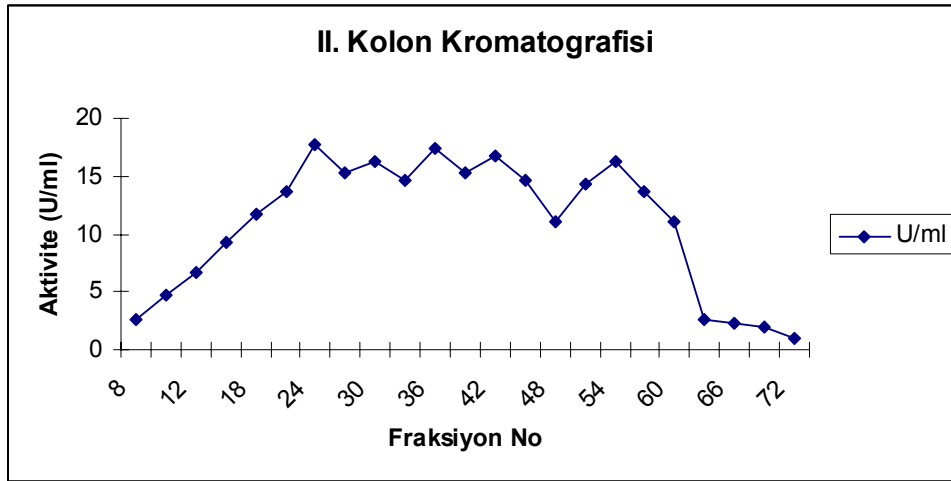
oranlardaki amonyum sülfatta çöktürme işlemleri yapılmış ve en iyi aktivite % 70 konsantrasyondaki amonyum sülfat çöktürmesinde görülmüştür.

Enzim solusyonuna % 70 konsantrasyonda çöktürme oranına göre amonyum sülfat ilave edilerek yavaşça karıştırılmıştır. Karıştırmaya +4 °C'de 1 saat daha devam edilmiştir ve elde edilen ham enzim ile amonyum sülfat karışımı 10 000 rpm'de 30 dakika +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında amonyum sülfat ile çöktürülen proteinlerin oluşturduğu pellet 50 mM Tris-HCl pH 8.0 tamponu kullanılarak çözülmüştür. Ortamdaki amonyum sülfat fazlasını gidermek amacı ile, 50 mM pH 8.0 Tris-HCl tamponu ile +4 °C'de gece boyunca diyaliz yapılmıştır.

Diyaliz işleminden sonra enzim soluyonu, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. Bu amaçla yapılan birinci kolon kromatografisinde 3.7 ml hacminde fraksiyonlar toplanmış ve fraksiyonlarda spektrofotometrik olarak enzim analizleri yapılmıştır. En yüksek lipaz aktivitesi gözlenen 5-45. fraksiyonlar bir araya getirilmiş ve temiz kolona tekrar yüklenmiştir. Bu şekilde yapılan ikinci kolonda da 2.5'er ml'lik fraksiyonlar toplanmış ve fraksiyonlardaki lipaz aktivitesine bakılıp en iyi aktivitenin gözlendiği 15-60. fraksiyonlar bir araya getirilmiştir. Şekil 4.10'da birinci kolondan toplanan fraksiyonlarda gözlenen enzim aktiviteleri, Şekil 4.11'de ise ikinci kolondan çıkan fraksiyonlardaki enzim aktiviteleri gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Birinci kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlarındaki ekstraselüler lipaz aktiviteleri

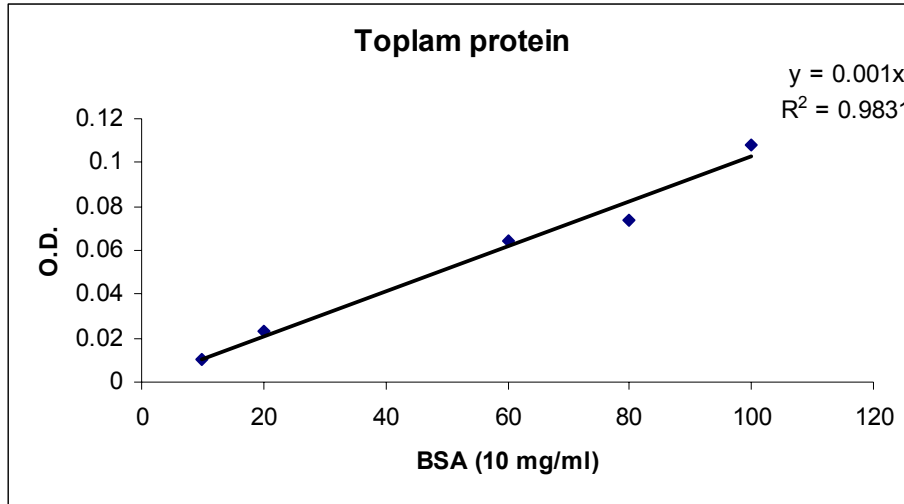


Şekil 4.11. İkinci kolon kromatografisi fraksiyonlarındaki ekstraselüler lipaz aktiviteleri

Ekstraselüler lipazın saflaştırma basamaklarının hepsinde ayrı ayrı lipaz aktivitesi ve protein miktarları hesaplanmış ve toplam hacim, toplam protein, toplam aktivite, spesifik aktivite, ürün verimi ve saflaştırma katsayısı belirlenmiştir. *P. fluorescens* RB02-3 suşu lipazının saflaştırma basamaklarındaki protein ve ekstraselüler lipaz enzim aktivitesi ve miktarları Tablo 4.4'de verilmiştir. Total protein miktarları, Bradford protein tayin yöntemine göre spektrofotometrik olarak elde edilen absorbans değerlerinden BSA kullanılarak hazırlanan standart eğriye göre hesaplanmıştır. Şekil 4.12'de Bovine Serum Albumin kullanılarak hazırlanan standart eğri görülmektedir.

Tablo 4.4. *P. fluorescens* RB02-3 suşuna ait saflaştırma basamaklarındaki protein ve ekstraselüler lipaz enzim aktivitesi ve miktarları

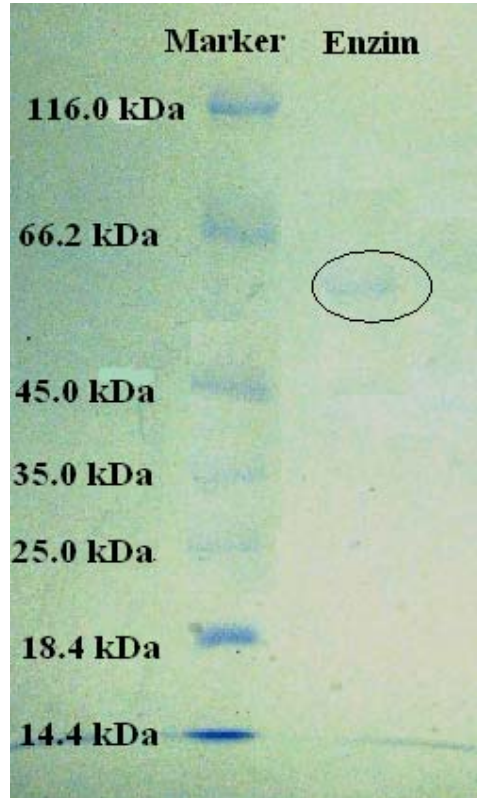
	Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham enzim (süpernatant)	900	387	20097	51.93	100	1
%70 Amonyum sülfat çök.+Diyaliz	150	37.5	4324.5	115.3	21.5	2.19
Sephadex G-100 kolon kromatografisi	114	26.45	4085	154.4	20.3	2.97



Şekil 4.12. Bovine Serum Albumin kullanılarak hazırlanan standart eğri.

4.8. Lipazın moleküler ağırlığının belirlenmesi (SDS-PAGE)

P. fluorescens RB02-3 suşunun üretmiş olduğu ekstraselüler lipazın saflaştırılmasının ardından elde edilen protein örneği SDS-PAGE’de yürütülmüş ve protein bantları görüntülenmiştir. Saflaştırılan lipazın moleküler ağırlığının yaklaşık 57 kDa olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.13’de II. kolon kromatografisi sonucu elde edilen lipazın SDS-PAGE’deki protein profili görülmektedir.



Şekil 4.13. *P. fluorescens* RB02-3 suşu ekstraselüler lipazının II. kolon kromatografisi sonucu SDS-PAGE’deki protein profili

4.9. *P. fluorescens* RB02-3 Suşuna Ait Lipazın Karakterizasyonu

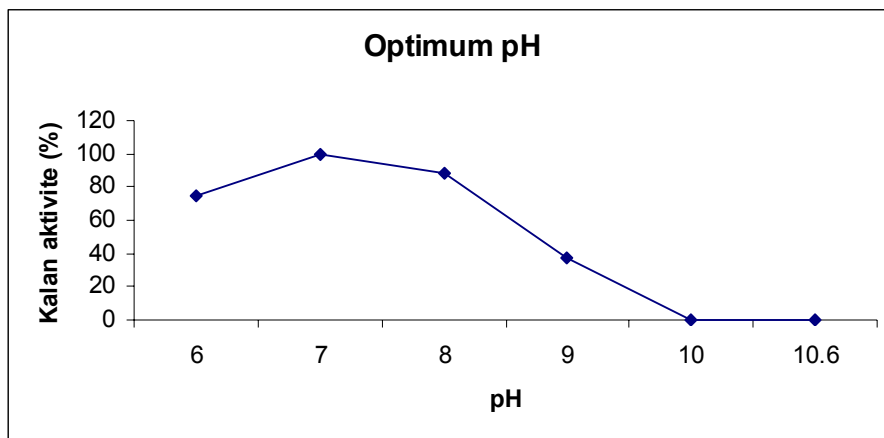
4.9.1. Optimum pH’nın belirlenmesi

Saflaştırılmış *P. fluorescens* RB02-3 lipazının optimum pH değerinin belirlenmesi amacı ile farklı pH’larda hazırlanan tamponlar ile aktivite çalışmaları yapılmıştır. Reaksiyon ortamının sahip olduğu pH’nın *P. fluorescens* RB02-3 suşuna

ait lipaz aktivitesine etkisi 3-10.6 aralığında Tablo 4.5'te verilmiştir. Ancak lipazlar tarafından serbest bırakılan *p*-nitrofenolün asidik bir metabolit olmasından dolayı absorbans yoğun olarak etkilenmektedir ve bu esterlerin asidik pH'larda ölçümü doğru sonuçlar vermektedir. Bu nedenle asidik pH'lardaki lipaz aktivite değerleri dikkate alınmamıştır. pH 6-10.6 aralığında ölçülen lipaz aktivite değerleri Şekil 4.14'de verilmiştir. Bulgularda da net olarak görüleceği üzere pH 7.0 en yüksek lipaz aktivitesinin görüldüğü noktadır. pH 7.0'deki lipaz aktivite değeri % 100 kabul edilmiştir ve diğer pH değerlerindeki aktiviteler buna oranlanmıştır. Enzimin pH 6.0–9.0 aralığında da aktif olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.5. *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin farklı pH değerlerinde enzim aktivitesi

pH	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Kalan Aktivite (%)
3	57.83	-
4	31.5	-
5	29.16	-
6	20.5	74.5
7	27.5	100
8	24.16	87.8
9	10.5	38.2
10	-	0
10.6	-	0



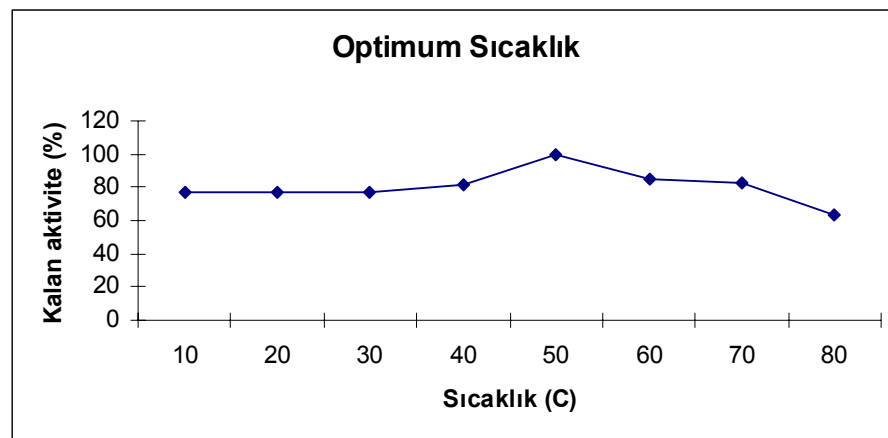
Şekil 4.14. *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin farklı pH değerlerinde enzim aktivitesi

4.9.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

P. fluorescens RB02–3 suşuna ait lipazın optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacı ile farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi belirlenmiş ve lipazın optimum reaksiyon sıcaklığı 50 °C olarak tespit edilmiştir. Bu sıcaklıkta enzim aktivitesi 41.33 U/ml olarak belirlenmiştir. Enzimin 10–80 °C aralığında aktif olduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin aktivitesine etkisi Tablo 4.6’da verilmiştir. 50 °C’deki aktivite değeri % 100 kabul edilmiştir ve diğer sıcaklık değerlerindeki aktiviteler buna oranlanarak Tablo 4.6 ve Şekil 4.15’de verilmiştir. Bu basamaktan sonra yapılan bütün karakterizasyon çalışmaları 50 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.6. *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki enzim aktivitesi

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Kalan Aktivite (%)
10	31.83	77
20	31.83	77
30	31.83	77
40	33.66	81.44
50	41.33	100
60	35.5	85.9
70	34.33	83
80	26	63



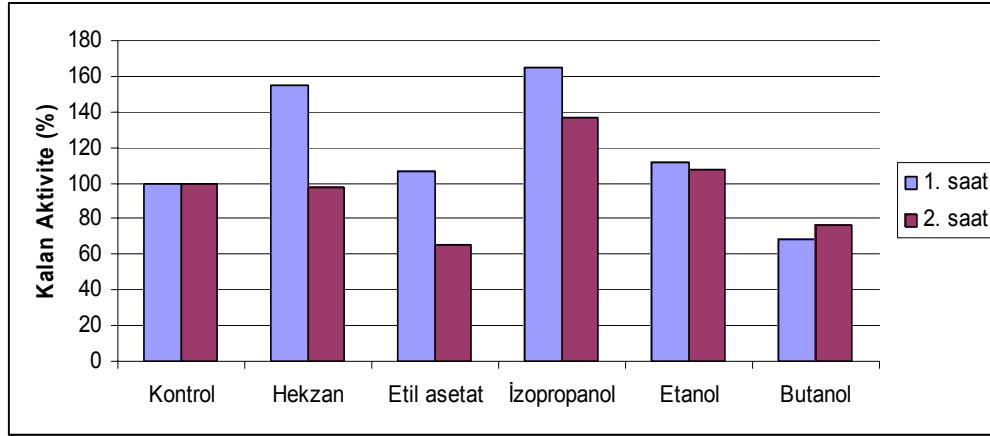
Şekil 4.15. *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enziminin farklı sıcaklık değerlerindeki enzim aktivitesi

4.9.3. Organik çözücülerin *P. fluorescens* RB02–3 suşu lipazı üzerine etkisi

P. fluorescens RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine hekzan, etil asetat, izopropanol, etanol ve butanolün etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 3 ml enzim 1 ml organik solvent ile karıştırılmış ve 30 °C sıcaklıktaki çalkalayıcı da 1 ve 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında organik solvent içermeyen enzim tampon (3:1) karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri U/ml olarak belirlenmiş ve çıkan değerlerden kontrol % 100 kabul edilip diğerleri kontrole göre kıyaslanmıştır. *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine çeşitli organik solventlerin etkisi Tablo 4.7 ve Şekil 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.7. *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı organik solventlerin etkisi

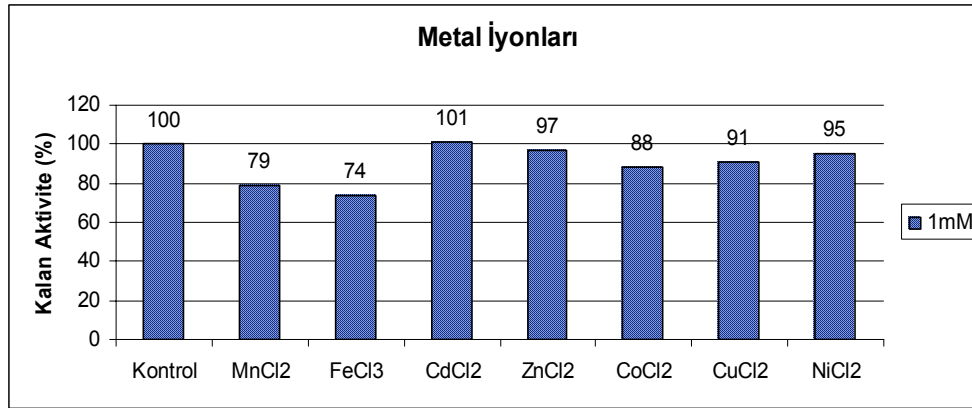
Solvent	Kalan Aktivite (%)	
	1 saat	2 saat
Kontrol	100	100
Hekzan	155	98
Etil asetat	107	65
İzopropanol	165	137
Etanol	112	108
Butanol	68	76



Şekil 4.16. *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine farklı organik solventlerin etkisi

4.9.4. Ağır metallerin *P. fluorescens* RB02–3 suşu lipazı üzerine etkisi

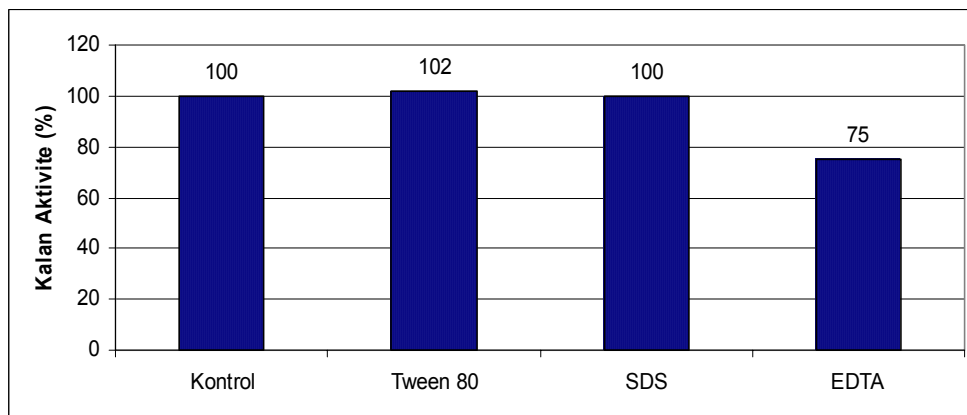
P. fluorescens RB02–3 suşuna ait lipazın enzimatik aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi amacı ile $MnCl_2$, $FeCl_3$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$ ve $NiCl_2$ kullanılmıştır. *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipazın belirtilen metal tuzları ile son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde karıştırılmasının ardından elde edilen veriler, metal iyonu içermeyen kontrole göre değerlendirilmiştir. Kontrol % 100 kabul edilip diğer sonuçlar buna kıyaslanmıştır. Şekil 4.17’de metal iyonlarının *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Ağır metallerin *P. fluorescens* RB02-3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine etkisi

4.9.5. Çeşitli ajanların *P. fluorescens* RB02-3 lipazı üzerine etkisi

SDS, Tween 80 ve EDTA'nın *P. fluorescens* RB02-3 suşunu lipazı üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada son derişimi 5 mM olacak şekilde, sırasıyla SDS, Tween 80 ve EDTA ile enzim karıştırılmış ve 30 °C sıcaklıkta 30 dk ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol olarak aynı deneysel koşullar altında herhangi bir ajan içermeyen örnekler kullanılmıştır. Kontrol % 100 kabul edilip diğer değerler buna kıyaslanmıştır. Şekil 4.18'de çeşitli ajanların *P. fluorescens* RB02-3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Çeşitli ajanların *P. fluorescens* RB02-3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine etkisi

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Yapılan çalışmada *Pseudomonas* izolasyonu amacı ile çiğ ve UHT ile pastörize edilmiş olmak üzere toplam 16 süt örneğinden, *Pseudomonas* CFC Agar besiyeri kullanılarak 85 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların kalitatif lipolitik aktiviteleri Tribütirin Agar ve Rhodamin B Agar besiyerinde belirlenmiştir. Yapılan identifikasyon sonucunda; 37 izolatın *Pseudomonas* olduğu, bunlardan birinin (% 2.7) *P. putida*, 36'sının (% 97.3) da *P. fluorescens* olduğu belirlenmiştir. Suşların ürettiği ekstraselüler lipaz enziminin miktarı *p*-NPP'ın substrat olarak kullanılması ile spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. En yüksek lipaz aktivitesi gösteren suşun *P. fluorescens* RB02-3 olduğu saptandıktan sonra bu suşa ait lipaz saflaştırılarak moleküler ağırlığı belirlenmiş ve karakterize edilmiştir.

Pseudomonas spp.'nin işlem görmemiş ve pastörize sütlerde bozulma esnasında en yaygın bulunan organizma olduğu bilinmektedir (Sørhaug ve Stepaniak, 1997; Deeth vd., 2002; Mc Phee ve Griffiths, 2002). Bu bilgiden hareketle bu çalışmada, izolasyon amacı ile çiğ ve UHT ile pastörize edilmiş sütler bozulma görülünceye kadar +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Değişik amaçlarla birçok çalışmada, *Pseudomonas* izolasyonu için çiğ ve pastörize sütler kullanılmıştır (Wiedmann vd., 2000; Dogan ve Boor, 2003).

Çalışmada izolasyon için seçici bir besiyeri olan *Pseudomonas* CFC Agar kullanılmıştır. Bu besiyeri içinde ceftrime, fucidin ve cephalosporin bulunmaktadır. Bu 3 farklı antibiyotik Gram pozitif ve diğer Gram negatif rekabetçi florayı baskılamaktadır. Araştırmacılar da CFC ortamının çeşitli tipteki gıdalardan *Pseudomonas sp.* sayımında kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Jeppesen, 1995). Bu besiyeri *Pseudomonas*'ların gelişimini etkilememekle beraber, Gram pozitif ve diğer Gram negatif bakterilerin ise gelişimini baskılamaktadır (Jeppesen, 1995). Kristiansen (1983) çiğ sütlerde yaptığı çalışmada *Pseudomonas* CN (Ceftrimid, nalidiksik asit) ve *Pseudomonas* CFC besiyerini kullanmıştır. *Pseudomonas* CN ve *Pseudomonas* CFC besiyerinde *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. cepecia*'nın üreme gösterdiği saptanmıştır (Kristiansen, 1983). Baird vd. (1987) yaptıkları çalışma sonucunda ise, özellikle mikroorganizma sayısının düşük olduğu durumlarda *Pseudomonas sp.* için hiçbir besiyerinin yeterince selektif olmadığını

bildirmişlerdir. Bununla birlikte CFC besiyerinin gıdalardan *Pseudomonas sp.* izolasyonunda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmada inokülasyonların yapıldığı plaklar 30 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Çiğ süt örneklerinden 14. günden sonra, UHT süt örneklerinde ise 20. günden sonraki zaman dilimlerinde gerçekleştirilen inokülasyonların yapıldığı plaklarda çok yoğun üreme olduğu için izolasyon gerçekleştirilememiştir. Stead (1986)’nın yaptığı çalışmada, 7 °C’de depolanan sütlerde bakteri sayısının zamanla arttığı bildirmiştir. Çalışmada, başlangıçta sütün ml’sinde 10^4 olan psikrofil bakteri sayısının giderek arttığı ve 3. günde ml’de 10^6 olduğunu saptamıştır. Rajmohan vd. (2002)’de yaptıkları çalışmada 4 °C’de depolanan yağlı süt örneğinden 4–37. yarım yağlı süt örneğinden 33–47. ve yağsız süt örneğinden de 4–37. günlerde *Pseudomonas* CFC agar besiyerine inokülasyonlar yapmışlar ve *Pseudomonas* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Bu çalışmada 50’si çiğ süt örneklerinden, 35 tanesi de UHT süt örneklerinden olmak üzere 85 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar çiğ sütlerden 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 ve 14 günlük örneklerden, pastörize sütlerden ise 4, 5, 8, 9, 14, 17, 19 ve 20 günlük örneklerden 10^{-4} 10^{-9} dilüsyonlardan elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar NA besiyerine alınmış ve koloni morfolojileri incelenmiştir.

Mikrobiyal kültürlerin salgılamış olduğu ekstraselüler lipaz katı besiyeri ortamında belirlenebilmektedir (Kulkarni, 2002). Bu amaçla elde edilen 85 muhtemel *Pseudomonas* izolatlarının lipolitik aktivitelerinin kalitatif olarak belirlenmesi amacı ile Tribütirin Agar besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri karbon kaynağı olarak dört karbonlu sentetik bir trigliserit olan tribütirin içermektedir (Gao vd., 2000). İzolatlar % 1 oranında tribütirin içeren Tribütirin Agar besiyerine inoküle edilmiş ve kolonilerin etrafında açık zon oluşumu incelenmiştir (Şekil 4.1). Çalışma sonucunda tüm izolatların zon oluşturduğu görülmüştür.

Ancak yapılan bazı çalışmalarda tribütirinin, lipaz aktivitesine özgül bir substrat olmadığı ve esteraz aktivitesi sonucunda da hidrolize edilebildiği belirtilmiştir (Brockerhoft ve Jensen, 1974; Lee ve Rhee, 1993; Kim vd., 2001; Lopes vd., 2002). Yapılan bazı çalışmalarda esteraz aktivitesinin tahmin edilmesi için tribütirin kullanılırken (Kaiser vd., 2006), bir çok çalışmada tribütirin lipaz aktivitesinin

belirlenmesi için kullanılmıştır (Jarvis ve Thiele, 1997; Lee vd., 1999; Ben-Gigirey vd., 2000; Braun vd., 2001b; Meghwanshi vd., 2006; Kiran vd., 2007).

Bu nedenle muhtemel 85 *Pseudomonas* izolatının ekstraselüler lipolitik aktiviteleri Rhodamin B agar besiyeri kullanılarak tekrar test edilmiştir. Bu metotta indikatör boya içeren büyüme ortamına emülsiyeye yağlar eklenmektedir (Kulkarni, 2002). Rhodamin, serbest yağ asitleriyle floresan bir kompleks oluşturmakta böylece lipaz üreten koloniler UV ışığı altında floresan hâleler oluşturmaktadır (Kouker ve Jaeger, 1987). Çalışmada tüm izolatların farklı tonlarda pembe koloni oluşturduğu (Şekil 4.2) ve UV ışığı altında farklı oranlarda floresan hâleler meydana getirdikleri (Şekil 4.3) gözlenmiştir. Rhodamin B Agar besiyerinde substrat olarak zeytinyağı bulunduğu ve zeytinyağındaki oleik asitin 18 C'lu olması nedeni ile Rhodamin lipaz aktivitesini vermektedir. Rhodamin B Agar metodu, tribütirinin lipazlara spesifik bir substrat olmamasından dolayı lipaz üretiminin araştırılmasında geniş çapta kullanılmaktadır (Winteler, 1996; Kumura vd., 1998; Hube vd., 2000; Kim vd., 2001; Martinez ve Soberón-Chávez, 2001; Castro-Ochoa vd., 2005; Meghwanshi vd., 2006).

Lipolitik aktiviteleri farklı iki yöntemle tespit edilen muhtemel *Pseudomonas* izolatlarının yapılan Gram boyamaları sonucunda 83'ünün Gram negatif basil 2'sinin de Gram pozitif kok olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada ise 81 çiğ ve pastörize süt örneği, 5 °C'de ve 7 °C'de 2-4 gün depolanmıştır. 5 °C'de depolanan çiğ süt örneklerinin ml'sinde Gram negatif bakterilerin oranı % 80, 7 °C'de ise bu oran % 65 olarak bulunmuştur. 5 °C'de depolanan pastörize sütlerde ise Gram negatif bakteri oranı % 65 iken 7 °C'de bu oran % 52 olarak bulunmuştur (Ternström vd., 1993).

83 Gram negatif izolata yapılan katalaz ve oksidaz testi sonucunda 82 izolatın katalaz (+) özellik, 50 izolatın da oksidaz (+) özellik gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.4). Mac Conkey Agar besiyerinde bulunan kristal viyole ve safra tuzları Gram pozitif organizmaların gelişimini inhibe etmektedir. pH indikatörü olan neutral red, laktozun kullanıldığını ya da kullanılmadığını göstermektedir. Laktoz negatif bakteriler, renksiz koloni verirken, laktoz pozitif bakteriler pH'nın düşmesi sonucunda asit oluştuğundan kırmızı koloni vermekte ve zon ile çevrilmektedir (Mac

Faddin, 1985). 83 izolatın Mac Conkey Agar besiyerine yapılan inokülasyonları sonucunda 68 izolatın renksiz koloni oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.5).

Tüm bu testler sonucunda 83 Gram negatif izolat içinden katalaz (+), oksidaz (+) ve laktoz (-) 45 izolat olduğu saptanmıştır. Bu 45 izolatın glukozu fermente yeteneklerini saptamak amacı ile yapılan O/F testi sonucunda da 37 izolatın oksidatif özellik gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.6).

Fischer (1987) çiğ süt örneklerinde yaptığı çalışmasında *Pseudomonas* izolasyonu amacı ile katalaz, oksidaz ve O/F testini uygularken, Litthauer vd. (2002) ise bu testlere ek olarak Mac Conkey Agar besiyerindeki gelişimi de incelemiştir.

37 izolata yapılan API 20NE identifikasyon testi sonucunda (Şekil 4.7) tüm izolatların *Pseudomonas* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1). Bu suşların 4 (% 10.81) tanesi UHT, 33 (% 89.19) tanesi de çiğ süt örneklerinden izole edilmiştir (Tablo 4.2).

Yapılan bir çalışmada 6 çiğ süt örneğinden 348 izolat elde edilmiştir. Yapılan API 20NE identifikasyon testine göre izolatların çoğunluğu *Pseudomonas* olarak tanımlanmıştır (Alatossava ve Alatossava, 2006). Benzer bir çalışmada +4 °C'de 1 hafta depolanan çiğ süt örneklerinden izole edilen psikrotrofların % 70-90'ının (Adam vd., 1975), pastörize süt örneklerinden izole edilen psikrotrofik bakterilerin ise % 87'sinin (Craven ve Macauley, 1992) *Pseudomonas* olduğu kaydedilmiştir.

Bu çalışmada, 37 *Pseudomonas*'ın 36 (% 97.30) tanesi *P. fluorescens*, 1'i (% 2.70) de *P. putida* olarak tanımlanmıştır. *P. fluorescens*'in süt ve süt ürünlerinde en çok karşılaşılan tür olduğu bildirilmiştir (Stevenson vd., 2003). Yapılan bir çalışmada, *P. fluorescens*'in çiğ süt örneklerinin % 84'ünde mevcut olduğu (Gennarl ve Dragotta, 1992) ve çiğ süttten izole edilen tüm bakterilerin % 55.6'sından daha fazlasını oluşturduğu (Ternström vd., 1993) kaydedilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, 6 °C'de depolanan çiğ süt örneğinden izole edilen 9 izolatın 8'inin *P. fluorescens* ve 1'inin de *P. putida* olduğu (Rowe vd., 2003), yağsız süt, yarım yağlı süt ve yağlı süt örneklerinden izole edilen 37 *Pseudomonas*'ın ise tamamının *P. fluorescens* olduğu kaydedilmiştir (Rajmohan vd., 2002). Dogan ve Boor (2003)'un yaptığı benzer bir çalışmada ise 338 *Pseudomonas*'ın % 51'i *P. fluorescens*, % 14'ü *P. putida* ve % 25'i ya *P. fluorescens* ya da *P. putida* olarak

identifiye edilmiştir. Bu çalışmada daha önceki yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi sütlerde *P. fluorescens*'in dominant organizma olduğu görülmüştür.

Daha önceki çalışmalar *Pseudomonas* gibi Gram negatif psikrotrof bakterilerin ticari amaç ile yapılan pastörizasyonla canlı kalamadıklarını göstermiştir (Cousin, 1982). Diğer taraftan taze pastörize sütlerde Gram negatif bakterilerin varlığı genellikle pastörizasyon sonrası kontaminasyonu göstermektedir (Cousin, 1982). Fakat bazı durumlarda başlangıç bakteriyel populasyon oldukça fazla ise ısıya duyarlı *Pseudomonas* gibi bakteriler ticari amaç ile yapılan pastörizasyonda kullanılan ısı işlemleri ile canlı kalabilmektedirler (Griffiths vd., 1984).

Çalışmada bir sonraki adım, izole ve identifiye edilen suşların ekstraselüler lipaz aktivitelerinin belirleneceği besiyeri seçimi olmuştur. Zira karbon ve azot kaynakları, sıcaklık, pH, inorganik tuzların konsantrasyonu ve oksijen varlığı gibi faktörlerin lipaz seviyesini etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle besiyeri ortamına bakterinin ekstraselüler lipaz aktivitesini teşvik edecek çeşitli ajanlar eklenmiş ve lipaz aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda Litthauer vd., (2002)'nin *Pseudomonas luteola*'nın enzim üretimi için kullandığı besiyerinde aktivitenin diğer besiyerlerine göre daha yüksek olduğu görülmüş ve bu besiyeri Bazal Medium olarak belirlenmiştir. Bu besiyerinde ekstraselüler lipaz aktivitesini indükleyici olarak Tween 80 bulunmaktadır (Labuschagne vd., 1997).

Lipaz üretimi aynı zamanda şekerler, şeker alkoller, polisakkaritler, süt suyu, kazamino asitleri ve diğer kompleks kaynaklar gibi diğer karbon kaynaklarından da önemli ölçüde etkilenmektedir (Gilbert vd., 1991a; Lotrakul ve Dharmstithi 1997; Dharmstithi ve Kuhasuntisuk 1998; Ghanem vd., 2000; Rashid vd., 2001). Bu nedenle bu çalışmada kullanılan besiyerinde glukoz bulunmaktadır. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, çiğ deve sütünden izole edilerek *P. fluorescens* RM₄ olarak tanımlanan suşun kültür besiyerine 4 g/L glukoz eklenmesinin lipaz üretimini teşvik ettiği belirtilmiştir (Al-Saleh ve Zahran, 1999).

Kültürün çalkalanması ile lipaz aktivitesi (Brune ve Gotz 1992; Aires-Barros vd., 1994; Jaeger vd., 1994; Kim vd., 1996) ve gelişim oranının arttığı (Birkeland vd., 1985) bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada sıvı kültür 130 rpm'de çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Birkeland vd. (1985) kültürün çalkalanması

ile *P. fluorescens* suşunun gelişim oranının arttığını bildirirken, Al-Saleh ve Zahran (1999) 100 rpm'de *P. fluorescens* RM₄ kültürünün çalkalanması ile lipaz aktivitesinin artırdığını belirtmiştir.

Lipaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi için spektrofotometrik, titrimetrik, kromatografik, immünolojik vb gibi farklı yöntemler bulunmaktadır. Fakat hızlı ve basit olduğu için spektrofotometrik ölçüm en çok tercih edilen yöntemdir. Lipaz aktivitesinin spektrofotometrik ölçümünde, farklı zincir uzunluğuna sahip *p*-nitrofenil esterleri kullanılabilir. Asetat ya da bütirat gibi kısa zincirli esterlerin esteraz aktivitesinin ölçümünde kullanılırken laurat, palmitat ya da oleat gibi uzun zincirli esterlerin lipaz aktivitesinin araştırılması amacı ile kullanıldığı bildirilmektedir (Gilham ve Lehner, 2005).

Lipazlar uzun zincirli triaçilgliserollere spesifik olduğu için bu çalışmada lipaz aktivitesinin kantitatif ölçümünde 16 C'lu sentetik bir substrat olan *p*-nitrofenil palmitat kullanılmıştır. Spektrofotometrik lipaz ölçüm metodları hızlı ve basit olduğu gibi ya doğal substratlar ya da sentetik substratlarla kullanılabilir (Jaeger vd., 1994). Bu nedenle ekstraselüler lipaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem kullanılmış ve 410 nm'de absorbans alınmıştır.

Bu çalışmada, substrat solusyonu Winkler ve Stuckmann (1979)'ın tekniğine göre hazırlanmıştır. Bu solusyonda arabic gum *p*-NPP'in emülsiyeye olması için eklenmiştir. Çünkü lipazlar yağ su arayüzeyinde iş görmektedirler. Lipazların doğal substratları olan triaçilgliseroller suda çözünmezler. Bu nedenle reaksiyon yüzeyinin arttırılması için bunları emülsiyeye etmek gerekmektedir (Kulkarni, 2002). Goodman ve Durgan (1969) yaptıkları çalışmada zeytinyağının arabic gum ile sonike edilmesiyle ölçümün hassasiyetinin arttığını belirtmişlerdir.

Substrat solusyonunda şeffaf bir solusyon elde edebilmek için de Triton X-100 eklenmiştir. Triton X-100'ün eklenmesi ile turbidite problemi ortadan kaldırılabilir. Triton X-100 bir sürfaktandır ve *p*-NPP'in enzimatik hidrolizinden dolayı açığa çıkan yağ asitlerinin dağılmasına neden olmaktadır. Sonuçta da solusyon şeffaf bir hal almaktadır (Gupta vd., 2002).

Fakat Winkler ve Stuckmann'ın metoduna göre hazırlanan substrat solusyonu yeterince şeffaf bir hal almamıştır. Bu nedenle bulanıklık spektrofotometrik ölçümde yanlış sonuçlara neden olmuştur. Türbidite sorununu ortadan kaldırmak amacı ile

Gupta vd. (2002)'nin bir çalışmada belirttiği gibi substrat solusyonundaki Triton X-100 miktarının hacmi, 2.5 reksiyon hacmi için 50 µl'den az olmayacak şekilde artırılarak şeffaf bir solusyon elde edilmiştir. Çalışmada, bir müddet sonra substrat solusyonunun renginde sararma meydana gelmektedir. Bazı çalışmalarda bu solusyonun 2 saat stabil kalabildiği bildirilmektedir (Mahadik vd., 2002; Savitha vd., 2007). Bu nedenle substrat solusyonu her kullanım öncesi taze hazırlanmıştır.

Ekstraselüler lipaz aktivitesinin kantitatif tayini için yapılan spektrofotometrik ölçüm sonucunda suşların farklı oranlarda lipaz aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. Tüm suşların lipaz aktiviteleri 10.03 U/ml ile 22.16 U/ml arasında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Bu suşların içinde en yüksek lipaz aktivitesinin *Pseudomonas fluorescens* RB02-3'e ait olduğu görülmüştür. Çalışmada en yüksek lipaz aktivitesi gösteren *P. fluorescens* RB02-3 suşu 7 günlük çiğ süttten, en küçük aktivite gösteren *P. fluorescens* RB16-29 suşu ise 8 günlük çiğ süttten izole edilmiştir. Tek *P. putida* RB07-4 suşu ise 17 günlük UHT ile pastörize edilmiş süttten izole edilmiş ve enzim aktivitesi 19.63 U/ml olarak belirlenmiştir.

Benzer bir çalışmada çiğ süt, pastörize süt ve süt işletmeleri çevrelerinden alınan örneklerden izole edilen 338 *Pseudomonas* izolatının % 67'sinin lipaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmada *P. fluorescens* olarak tanımlanan izolatların % 69'unun lipolitik, proteolitik ve lekitinaz aktivitelerinin tamamı pozitif iken, *P. putida* suşlarının % 87.5'inin bütün enzim aktiviteleri negatif olarak bulunmuştur (Dogan ve Boor, 2003). Başka bir çalışmada ise 66 *Pseudomonas* izolatının 33 (% 58)'i lipaz aktivitesi göstermiştir (Wiedmann vd., 2000).

Matselis ve Roussis (1998)'un yaptıkları çalışmada çiğ süttten izole edilen *P. fluorescens* MR1'in skim milk kültürlerinde 25 °C'de 800 U/ml, 5 °C'de ise 700 U/ml lipaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. *Pseudomonas* ve *Bacillus*'lar ile yapılan bir çalışmada en yüksek lipaz aktivitesi *Pseudomonas* GK-80 suşunda 30 U/ml olarak bulunurken, en düşük aktivite ise *Pseudomonas* GK-117 suşunda 0.95 U/ml olarak bulunmuştur (Meghwanshi vd., 2006).

P. fluorescens NS2W 10 U/ml (Kulkarni ve Gadre, 2002), *Pseudomonas* sp. MSI057 750 U/ml (Kiran vd., 2007), *Pseudomonas* sp. G6 suşu ise tek karbon kaynağı olarak n-hekzadekan bulunan kültür ortamında maksimum oranda 25 U/ml lipaz ürettiği bildirilirken (Kanwar vd., 2002), *P. mendocina* PK-12CS 20 saatlik

fermentasyon peryodu sonucunda 3510 U/ml (Jinwal vd., 2003), *Pseudomonas sp.* 3AT'de 2748 U/L, *P. aeruginosa* ATCC 111'de 1703.8 U/L (Haba vd., 2000), *Pseudomonas sp.*'de ise triolein karbon kaynağı olarak kullanıldığı zaman 7.4 U ml lipaz üretimi gözlenmiştir (Kulkarni ve Gadre, 1999).

İnkübasyon peryodu birkaç saatten birkaç güne kadar değiştirildiğinde, bakterilerin maksimum lipaz üretimi için en uygun olduğu inkübasyon süresi belirlenebilmektedir. Bu nedenle en yüksek lipaz aktivitesi gösteren *P. fluorescens* RB02-3 suşunun Bazal Medium'da gelişimi ve ekstraselüler lipaz üretimi saatlere göre spektrofotometrik olarak incelenmiştir. En yüksek lipaz üretimi 40. saatte geç logaritmik fazda gözlenmiş ve 22.33 U/ml olduğu belirlenmiştir. 40. saatten sonra ise lipaz aktivitesi azalmaya başlamıştır (Şekil 4.9).

Yapılan pek çok çalışmada çoğu bakteriyel lipazın üremenin geç logaritmik fazında ve duraklama fazının başında üretildiği bildirilmiştir (Fox ve Stepaniak, 1983; Stuer vd., 1986; Jaeger vd., 1994; Pabai vd., 1996; Matselis ve Roussis, 1998; Sidhu vd., 1998; Al-Saleh ve Zahran, 1999; Dong vd., 1999). *Pseudomonas sp.* KLB1 suşu maksimum aktiviteyi 72 saat sonra logaritmik fazın sonunda 72.1 U/ml (Bhumibhamon vd. 2002), *P. aeruginosa* LST-03 suşu ise 35 saat sonra duraklama fazında 96 U/ml değerinde lipaz aktivitesi göstermiştir (Ito vd., 2001). *P. aeruginosa* PseA ile yapılan çalışmada da 24. saatte lipaz üretiminin başladığı ve 48 saat sonra geç logaritmik fazda maksimuma ulaştığı bildirilmiştir (Ruchi vd., 2007).

Yapılan bazı çalışmalarda psikrotrofik bakterilerin genellikle aynı eş zamanlı olarak hem lipaz hem de proteaz üretebildikleri ve üretilen bu proteazın da ham enzim solusyonundaki lipazı inaktive edebildiği bildirilmiştir (Christen ve Marshall, 1980). Yapılan bu çalışmada 40. saatten sonra lipaz aktivitesinin düşmesinin enzim solusyonundaki proteazdan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Benzer bir çalışmada *Pseudomonas sp.* no. 33 suşunun üretmiş olduğu lipazın proteaz tarafından kısmi olarak inaktive edildiği bildirilmiştir (Kumura vd., 1991). Kojima ve Shimizu (2003) ise *P. fluorescens* HU380 suşunun hücre gelişimi ve ekstraselüler lipaz aktivitesini incelemişlerdir. Çalışmada 20 saatlik kültürde maksimum lipaz aktivitesi 16 saat sonra gözlenmiş ve bu saatten sonra lipaz aktivitesinin giderek azaldığını belirtilmiştir.

Ekstraselüler lipazın saflaştırılmasında ilk adım santrifüj ya da filtrasyon ile hücrelerin uzaklaştırılmasıdır. Bu nedenle saflaştırmanın ilk basamağında santrifüj yapılarak *P. fluorescens* RB02–3 suşuna ait hücreler uzaklaştırılmıştır. Bu işlemden sonra proteinlerin çöktürülmesi amacı ile amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve en iyi çöktürme oranının pH 4’te % 70 amonyum sülfat doygunluk derecesinde olduğu saptanmıştır.

Çöktürme işlemlerinde en çok tercih edilen yöntem tuz çöktürmesi olup, amonyum sülfat ucuz ve iyi çözünür olduğu için en çok kullanılan tuzdur. Çöktürmede kullanılan amonyum sülfat oranı ve amonyum sülfat ile gerçekleştirilecek çöktürmenin kaç basamakta yapılacağı, saflaştırılması istenen proteinin yüzeyinde konumlanan ve hidrofobik yan zincirler taşıyan aminoasitlerin miktarına, çözeltinin pH’sına ve sıcaklığa bağlı olarak farklılıklar göstermektedir (Scopes, 1994).

Literatürde amonyum sülfatın değişik derişimlerinin kullanıldığı çeşitli örnekler bulunmaktadır. *P. aeruginosa* LST–03 suşu lipazı % 45, *Pseudomonas sp.* AG-8 (Ogino vd., 2000) ve *Pseudomonas sp.* G6 (Kanwar vd., 2002) suşu lipazları % 60 ve *P. aeruginosa* san-ai suşu lipazı (Karadzic vd., 2006) da % 80 amonyum sülfat ile çöktürülmüştür.

Çalışmada ortamdaki amonyum sülfat fazlasını gidermek amacı ile de diyaliz işlemi gerçekleştirilmiş ve ardından Sephadex G–100 kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak enzim saflaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan Sephadex G–100, polimerleştikten sonra 5 kDa ve üzeri proteinleri ayrıştırabilecek yapıda por çaplarına sahip bir dolgu materyalidir. Çalışmada ardışık iki kolon kromatografisi yapılmıştır. Yapılan birinci kolonda yüksek lipaz aktivitesi gözlenen 5–45. fraksiyonlar (Şekil 4.10), ikinci kolonda ise 15–60. fraksiyonlar (Şekil 4.11) toplanarak çalışılmıştır. Ekstraselüler lipazın saflaştırma basamaklarının her aşamasında lipaz aktivitesi ve protein miktarları hesaplanmış ve toplam hacim, toplam protein, toplam aktivite, spesifik aktivite, ürün verimi ve saflaştırma katsayısı belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Yapılan amonyum sülfat çöktürmesinde % 21.5 verim ile 2.19 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivite 115.3 U/mg olarak belirlenmiştir. Ardından yapılan 2 jel filtrasyon kromatografisi sonucunda ekstraselüler lipaz % 20.3 verim ile 2.97 kat

saflaştırılmış ve spesifik aktivite 154.4 U/mg olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan lipazın moleküler ağırlığı da SDS-PAGE ile yaklaşık 57 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).

Yapılan benzer bir çalışmada, *P. aeruginosa* san-ai suşunun ekstraselüler lipazının saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi kullanılmış ve ardından diyaliz edilmiştir. Elde edilen enzim solusyonu Butyl Toyopearl kolonu ardından da Toyopearl HW-55 kolon kromatografi yöntemleri ile lipaz % 16 verim ile 12.5 kat saflaştırılmıştır. Saf lipazın moleküler ağırlığı 54 kDa olarak tespit edilmiştir (Karadzic vd., 2006). Ogino vd. (2000) LST-03 organik solvent toleranlı lipazı % 12.6 verim ile 34.7 kat saflaştırılmıştır. Saf lipazın moleküler ağırlığı 27.1 kDa olarak belirlenmiştir. *P. fluorescens* HU380 lipazı % 14 verim ile 24.3 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 9854 U/mg olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan lipazın moleküler ağırlığı 67 kDa olarak belirlenmiştir (Kojima ve Shimizu, 2003). Kanwar vd. (2002) ise yaptıkları çalışmada *Pseudomonas sp.* G6 suşu lipazını amonyum sülfat çöktürmesi ve Silicone 21 Defoamer kullanarak % 83'lük verim ile 1.45 kat saflaştırmışlar ve spesifik aktiviteyi 20.1 U/mg olarak belirlemişlerdir. Yapılan bir çalışmada *B. thermoleovorans* CCR11 suşuna ait lipazın moleküler ağırlığı 11 kDa olarak belirlenmiştir. Çalışmada, bu lipazın bilinen en küçük moleküler ağırlığa sahip lipaz olduğu belirtilmiştir (Castro-Ochoa vd., 2005).

Stepaniak ve Fox (1983), *P. fluorescens* AFT36 suşu ekstraselüler lipazının amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak inaktive olduğunu kaydetmiştir. Bu nedenle bu çalışmada bu saflaştırma basamağı kullanılmamıştır. Sütlerden izole edilen *P. fluorescens* ile yapılan bir çalışmada ise ekstraselüler lipazı saflaştırma girişimleri başarısız olmuştur (Rajmohan vd., 2002).

Çöktürme işlemi için organik çözücüler de kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa* MTCC5113 suşunun üretmiş olduğu lipazın çöktürülmesi amacı ile farklı çöktürme ajanları (aseton, etanol, poli etilen glikol ve amonyum sülfat) kullanılmıştır. Poli etilen glikol ve etanol ile yapılan çöktürmede lipaz aktivitesi ihmal edilebilecek kadar küçük çıkmıştır. Fakat aseton ve amonyum sülfattaki aktivite ise fark edilir derecede olduğu bildirilmiştir. Maksimum lipaz aktivitesi ise 1:2 (süpernatant:aseton) oranında aseton ile çöktürüldüğü zaman gözlenmiştir. Aseton ile enzim verimi % 42 olarak bulunmuştur. Aseton

çöktürmesinden sonra Q-sepharose kolon kromatografisi yapılmış ve % 4 enzim verimi ile 30 kat saflaştırılmıştır. En son ise Sephacryl-S200 kolon kromatografisi yapılmış ve % 2'lik verim ile enzim 21 kat saflaştırılmıştır. Saf lipazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE'de 59.4 kDa olarak belirlenmiştir (Singh ve Banerjee, 2007).

Pseudomonas pseudoalcaligenes F-111'den elde edilen lipazın saflaştırılması amacı ile aseton çöktürmesi, 2 kez Sephadex G-100, Fractogel phenyl 650M kolon kromatografi yöntemleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *P. pseudoalcaligenes* F-111 lipazı, % 15 verimle 144 kat saflaştırılmıştır. Son saflaştırma basamağında ise spesifik aktivite 5.920 U/mg olarak belirlenmiştir (Lin vd., 1996). *Pseudomonas mendocina* PK-12CS lipazı aseton çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak % 14.8 verim ile 240 kat saflaştırılmıştır (Jinwal vd., 2003).

Pseudomonas sp. S5 lipazı Con A-Sepharose ve DEAE-Sephacel kolon kromatografisi ile % 52 verim ile 387.5 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 1240 U/mg olarak belirlenmiştir. Saf lipazın moleküler ağırlığı da 60 kDa olarak tespit edilmiştir (Rahman vd., 2005). Solvent dirençli *Pseudomonas putida* 3K'ya ait ekstraselüler lipaz iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılarak % 5.3 verim ile 21 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 45 kDa olarak belirlenmiştir (Lee ve Rhee, 1993).

Çeşitli yöntemlerle saflaştırılan lipazın karakterize edilmesi, lipazın endüstriyel kullanım alanının belirlenmesi açısından son derece gereklidir. Deterjan endüstrisinde kullanılmak üzere alkali pH'larda çalışabilen lipazların yanı sıra, farklı endüstriyel kullanım alanlarında yüksek sıcaklıklarda ve çeşitli organik çözücüler varlığında aktivite gösterebilen lipazlara gereksinim artmıştır. Bu nedenle son yıllarda araştırmalar, yüksek sıcaklığa ve pH'ya dayanıklı lipazların yanı sıra organik çözücüler varlığında aktivite gösterebilen lipazların elde edilmesine yönelmiştir (Dharmstithi ve Luchai, 1999; Hun vd., 2003). Tüm bu nedenlerden dolayı elde edilen lipazın karakterizasyonu yapılmalıdır. Bu amaçla çalışmada, saflaştırılan enzim sıcaklık, pH, metal iyonları, organik solventler ve çeşitli ajanların etkisi açısından karakterize edilmiştir.

P. fluorescens RB02-3 suşuna ait lipazın en iyi aktivite gösterdiği pH'nın belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada, suşun en iyi aktiviteyi pH 7.0'de gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Fakat pH 3.0, 4.0 ve 5.0'de de enzim aktivitesinin

yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.5). Çünkü lipazlar tarafından serbest bırakılan *p*-nitrofenolün asidik bir metabolit olmasından dolayı absorbans yoğun olarak etkilendiği için bu estrelerin asidik pH'larda ölçümü doğru sonuçlar vermemektedir (Kademi vd., 2000). Bu nedenle 3.0, 4.0 ve 5.0 pH'lardaki sonuçlar dikkate alınmamıştır. Daha sonraki karakterizasyon çalışmalarında aktivitenin % 100 kabul edildiği pH 7.0 kullanılmıştır.

Benzer şekilde yapılan birçok çalışmada *Pseudomonas* lipazlarının optimum pH'sının nötral ya da alkali olduğu kaydedilmiştir. Bunlara *P. tolaasii* (Baral ve Fox 1997), *Pseudomonas sp.* MSI057 (Kiran vd., 2007), *P. mendocina* PK-12CS (Jinwal vd., 2003), *P. aeruginosa* PseA (Ruchi vd., 2007), *P. putida* 3SK (Lee ve Rhee, 1993), *P. fluorescens* HU380 (Kojima ve Shimizu 2003), *P. aeruginosa* MTCC 5113 (Singh ve Banerjee 2007), *P. fluorescens* NS2W (Kulkarni ve Gadre 2002) lipazları örnek olarak verilebilir. Ancak pH 4.8 gibi asidik pH'da optimum aktivite gösteren *P. fluorescens* SIK W1 lipazı (Andersson vd., 1979) gibi istisnalar da mevcuttur.

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada elde edilen bulgulara göre 50 °C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.6) (Şekil 4.15). Aynı zamanda 70–80 °C gibi yüksek ısılarda da aktivite göstermesi enzimin yüksek bir ısıl kararlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Reaksiyon hızının artması, ortam viskozitesinin düşük olması, substrat çözünürlüğünün yüksek olması ve mikrobiyal kontaminasyonların minimuma inmesi gibi özelliklerinden dolayı yüksek sıcaklıklarda yürütülen enzim katalizli işlemler ilgi görmektedir ve bu sıcaklıklarda aktivitesini koruyabilen enzim arayışları devam etmektedir. Bu çalışmada *P. fluorescens* RB02–3 suşu lipaz aktivitesinin sıcaklık ile artış göstermesinin bu enzimin endüstriyel ihtiyaçlara katkıda bulunabilecek bir potansiyel olabileceğini ortaya koymaktadır.

Benzer şekilde *Pseudomonas* GK–80 suşuna ait lipaz optimum aktiviteyi 50 °C sıcaklıkta göstermiştir (Meghwanshi vd., 2006). *P. aeruginosa* EF2 (Gilbert vd., 1991), *P. fluorescens* NS2W (Kulkarni ve Gadre 2002) lipazları en yüksek aktiviteyi 55 °C'de gösterirken, *Pseudomonas sp.* (Yamamoto ve Fujiwara, 1988), *Pseudomonas sp.* KWI-56 (Iizumi vd., 1990), *P. aeruginosa* MTCC 5113 (Singh ve Banerjee 2007) lipazları da optimum aktiviteyi 60-80 °C aralığında göstermiştir. *Pseudomonas sp.* (Gao vd., 2000), *P. fluorescens* HU380 (Kojima ve Shimizu 2003)

lipazları 45 °C, *P. tolaasii* (Baral ve Fox, 1997) *P. mendocina* PK-12CS (Jinwal vd., 2003), *P. putida* 3SK (Lee ve Rhee, 1993), *P. aeruginosa* LST-03 (Ogino vd., 2000) lipazları da 37 °C de maksimum aktivite göstermiştir.

Lipaz substratları genellikle suda çözünmeyen ya da kısmen çözülebilen bileşiklerdir. Bazı reaksiyonlar için organik çözücülerden veya sulu organik çözücülerden yararlanılmaktadır. Bununla birlikte organik çözücülerin, enzimler ve mikroorganizmalar üzerinde zararlı etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Organik çözücü varlığında birçok organizma işlevini kaybeder ve büyümesi durur. Enzimler genel olarak organik çözücü varlığında denatüre olarak aktivitelerini kaybettiklerinden organik çözücülere tolerans gösteren enzimler endüstride oldukça geniş bir uygulama alanı bulabilmektedir (Hun vd., 2003).

Bu çalışmada, çeşitli organik çözücülerin *P. fluorescens* RB02-3 suşuna ait lipaz enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. % 25 etanol varlığında, 1 saatlik ön inkübasyon sonunda kalan enzim aktivitesi % 112 iken, 2 saatlik ön inkübasyon sonunda bu oran % 108 olmuştur. İzopropanol varlığında ise 1 saatlik ön inkübasyon sonunda kalan enzim aktivitesi % 165 iken, 2 saatlik ön inkübasyon sonunda % 137 olarak belirlenmiştir. Hekzan ve etil asetatta ise 1 saatlik ön inkübasyon sonunda enzim aktivitesi artarken 2 saatlik ön inkübasyon sonunda bir miktar inhibe olmuştur. Butanolde ise her iki inkübasyonda da enzim kısmen inhibe olmuştur (Tablo 4.7).

Elde edilen bu sonuçlara göre 1 saatlik ön inkübasyon sonucunda butanol varlığında enzim aktivitesi azalırken, etil asetatta dikkate alınmayacak kadar az bir artma gözlenmiştir. En iyi aktivite ise izopropanolda gözlenmiştir. 2 saatlik ön inkübasyon sonunda ise tüm solventlerde enzim aktivitesi azalırken butanolde çok az miktarda artma gözlenmiştir (Şekil 4.16).

Literatürde *B. thermoleovorans* CCR11 lipazının etanolde 1 satlik ön inkübasyon sonunda kalan aktivitesi % 98.6 iken bu oranın 2 saatlik ön inkübasyon sonunda % 71.8'e düştüğü bildirilmiştir (Castro-Ochoa vd., 2005). *Pseudomonas sp.* AG-8 lipazı aktivitesinin ise % 20 etanol varlığında 2.9 kat arttığı rapor edilmiştir (Sharma vd., 2001). *P. aeruginosa* KKA-5 lipazında % 50 etanol varlığında aktivite kaybı saptanmamıştır (Sharon vd., 1998). *Rhizopus oryzae* lipazının % 30 etanol varlığında kalan aktivitesi % 33 olarak belirlenmiştir (Hiol vd., 2000). *Aspergillus carneus* lipazı ile yapılan diğer bir çalışmada ise 30 dk sonunda etanol varlığında aktivite

yaklaşık % 50'ye düşmüş ve 24 saat boyunca aynı oranda korunmuştur (Saxena vd., 2003b).

B. thermoleovorans CCR11 lipazının izopropanolde 1 saatlik ön inkübasyon sonunda kalan aktivitesi % 101.3, 2 saatlik ön inkübasyon sonunda ise % 82.8 olduğu bildirilmiştir (Castro-Ochoa vd., 2005). *P. aeruginosa* PseA lipazı izopropanol ve butanolde inhibe olurken hekszanda aktive olmuştur (Ruchi vd., 2007). *P. aeruginosa* LST-03 lipazının butanol varlığında kalan aktivitesinin % 20'den düşük olduğu belirlenmiştir (Ogino vd., 2000). *Pseudomonas* GK-80 lipazının aktivitesi ise butanolde değişmezken hekszanda inhibe olmuş, *Bacillus* GK-8 lipazı da butanolde %120 oranında aktivite gösterirken hekszanda inhibe olduğu kaydedilmiştir (Meghwanshi vd. 2006).

Pseudomonas sp. suşu S5 lipazı (Rahman vd., 2005), *P. aeruginosa* LST-03 lipazı (Ogino vd., 2000) ve *P. cepacia* lipazının (Sugihara vd., 1992) hekszanda güçlü bir şekilde inhibe olurken, *P. mendocina* PK-12CS lipazında ise önemli bir değişiklik olmamıştır (Jinwal vd., 2003). *B. stearothermophilus* MC 7 lipazı butanol, etanol ve izopropanol varlığında inhibe olmuştur (Kambourova vd., 2003). % 30 izopropanol varlığında 21 saat sonunda *B. thermocatenulatus* lipazının ise biraz inhibe olduğu bildirilmiştir (Rua vd., 1997).

Metal iyonlarının, genellikle enzimin spesifik bölgelerdeki negatif yüklü aminoasit birimlerine bağlanarak enzimin aktif ve kararlı yapısını korumasında etkili bir rol oynadığı bilinmektedir (Şişik, 2003). Aktivite üzerine etkisi incelenen metal iyonlarından Mn^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} varlığında enzim kısmen inhibe olurken Cd^{2+} 'da önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bir araştırmacı tarafından Fe^{2+} , Zn^{2+} ve özellikle Cu^{2+} 'nın dilüe solüsyonlarının bile lipaza yüksek oranda toksik olduğu (Wills, 1960), pek çok araştırmacı tarafından da Zn^{2+} ve Cu^{2+} gibi metal iyonlarının *Pseudomonas* lipazlarına inhibitör etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir (Yamamoto ve Fujiwara 1988, Iizumi vd., 1990, Kumura vd., 1993, Chartrain vd., 1993). Bu çalışmada ise *P. fluorescens* RB02-3 suşundan izole edilen lipaz bu metallere karşı aktivitesini yüksek oranda korumuştur (Şekil 4.17).

Benzer çalışmalarda *P. mendocina* PK-12CS lipazı Mn^{2+} ve Zn^{2+} (Jinwal vd., 2003) ve *Pseudomonas* lipazı Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} (Gao vd., 2000) tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilmiştir. *P. fluorescens* HU380 lipazı Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} ,

Zn²⁺ (Kojima ve Shimizu, 2003), *P. aeruginosa* (Karadzic vd., 2006), ve *Bacillus cereus* C71 lipazı (Chen vd., 2007) Zn²⁺ ve Cu²⁺ tarafından, *P. aeruginosa* MTCC 5113 lipazı Ni²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ ve Zn²⁺ (Singh ve Banerjee 2007), *Pseudomonas* sp. S5 suşu lipazı Fe³⁺, Zn²⁺ ve Cu²⁺ (Rahman vd., 2005), *Pseudomonas* sp. AG-8 lipazı Fe³⁺, Zn²⁺ (Sharma vd., 2001), *P. putida* 3SK lipazı Co²⁺ (Lee ve Rhee, 1993), *Pseudomonas* lipazı da Cu²⁺ (Gao vd., 2000) varlığında güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir.

P. pseudoalcaligenes F-111 suşuna ait lipaz aktivitesinde (Lin vd., 1996) 1 mM Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ ve Mn²⁺ varlığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. *P. aeruginosa* KKA-5 lipazı ise Mn²⁺, Cd²⁺ ve Cu²⁺ tarafından kısmi olarak inaktive edilmiştir (Sharon vd., 1998). *P. fluorescens* HU380 (Kojima ve Shimizu 2003) ve *P. fluorescens* NS2W (Kulkarni 2002) lipazları ise Mn²⁺ tarafından aktive edilirken, *Pseudomonas* sp. MSI057 lipazı Zn²⁺ ve Co²⁺ (Kiran vd., 2007) ve *B. coagulans* BTS-3 lipazı da Fe³⁺ ve Mg²⁺ (Kumar vd., 2005) tarafından aktive edilmiştir.

P. fluorescens RB02–3 suşuna ait lipaz enzimi aktivitesi üzerine SDS, Tween 80 ve EDTA'nın etkisi araştırılmış ve enzimin EDTA varlığında % 25 oranında inhibe olurken, Tween 80 varlığında % 2 oranında bir artış gözlenmiştir. SDS varlığında ise enzim aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.18).

Mevcut çalışmalarda EDTA'nın bazı lipazların aktivitesini inhibe ettiği kaydedilmiştir (van Oort vd., 1989; Baral ve Fox 1997; Sharon vd., 1998; Kulkarni 2002; Snellman vd., 2002; Jinwal vd., 2003; Kojima ve Shimizu, 2003; Castro-Ochoa vd., 2005). 1 mM EDTA *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazının aktivitesi üzerinde etkili olmamıştır (Sharma vd., 2002a). Aynı sonuçlar *Pseudomonas* sp. S5 (Rahman vd., 2005), *P. pseudoalcaligenes* F-111 (Lin vd., 1996), *Penicillium roqueforti* IAM7268 (Mase vd., 1995) lipazlarında da gözlenmiştir. *P. aeruginosa* MTCC 5113 (Singh ve Banerjee 2007) ve *P. aeruginosa* san-ai suşlarına ait lipaz enzimleri de (Karadzic vd., 2006) EDTA'nın varlığında aktive olmuştur.

P. aeruginosa MTCC 5113 (Singh ve Banerjee 2007), *P. aeruginosa* san-ai suşu (Karadzic vd., 2006), *Pseudomonas* sp. MSI057 (Kiran vd., 2007), *B. cereus* C71 (Chen vd., 2007) lipazları Tween 80 tarafından aktive olmuştur. *P. mendocina* PK-12CS lipazında (Jinwal vd., 2003) herhangi bir değişiklik olmazken *P. aeruginosa* PseA (Ruchi vd., 2007), *B. thermoleovorans* CCR11 (Castro-Ochoa vd., 2005),

Pseudomonas sp. (Gao vd., 2000) ve *Burkholderia cepacia* (Rathi vd., 2001) lipazları Tween 80 varlığında inhibe olmuştur.

Güçlü iyonik deterjanlardan birisi olan SDS'in *B. thermoleovorans* CCR11 (Castro-Ochoa vd., 2005), *Pseudomonas sp.* (Gao vd., 2000), *Aspergillus carneus* (Saxena vd., 2003b), *P. mendocina* PK-12CS (Jinwal vd., 2003), *P. aeruginosa* PseA (Ruchi vd., 2007), *B. cereus* C71 (Chen vd., 2007) ve *P. aeruginosa* san-ai suşu (Karadzic vd., 2006) lipazlarını kuvvetli bir şekilde inhibe ederken, *Pseudomonas sp.* MSI057 lipazının ise SDS'de aktivitesi artmıştır (Kiran vd., 2007).

Enzimlerin endüstride en çok kullanıldıkları alanlardan birisi hiç kuşkusuz ki organik sentezlerdir. Sentez reaksiyonları genellikle yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücü bulunan ortamlarda gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, bu amaca hizmet etmek için kullanılacak bir enzim yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücü ortamlarında kararlı olması ve bu şartlarda katalitik fonksiyonunu yüksek oranda gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Lipazlar da sentetik kimya, ilaç, gıda ve deterjan sanayi gibi alanlarda çok kullanılan enzimlerdir. Bu açıdan ele alındığında *P. fluorescens* RB02-3 suşuna ait lipaz enziminin yüksek ısı kararlılığına sahip olması nedeni ile organik sentezlerde ve yukarıda belirtilen sanayi kollarında kullanılması uygun olabileceği sonucuna varılabilir. Ancak bunun için enzimin daha yüksek oranda saflaştırılıp daha ileri derecede de karakterize edilmesi yanında organik çözücü ortamlarındaki kararlılığı ve kimyasal sentez reaksiyonlarında kullanılabilirliği ayrıntılı bir şekilde ele alınmalıdır. Aynı zamanda *P. fluorescens* RB02-3 suşu lipazının metal iyonları ve çeşitli ajanlara karşı davranışı, bu enzimin farklı sanayi kollarında, farklı reaksiyonların katalizinde kullanımına olanak sağlayabilecek türden olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abramic, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W., Pigac, J. 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 522–529.
- Adam, D., M., Barach, J. T., Speck, M. L. 1975. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Dairy Science*, 58, (6): 828–834.
- Adlercreutz, D., Budde, H., Wehtje, E. 2002, Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction. *Biotechnology And Bioengineering*, 78, (4): 403–411.
- Aires-Barros, M. R., Taipa, M. A., Cabral, J. M. S. 1994. Isolation and purification of lipases. In: P. Wooley and S. Petersen, Editors, *Lipases: Their structure, biochemistry, and application*, Cambridge University Press, Cambridge, UK pp, 243–270.
- Aisaka, K., Terada, O. 1981. Purification and Properties of Lipase from *Rhizopus japonicus*. *J. Biochem.*, 89, (3): 817-822.
- Akbulut, N. Yerel İzolat *Bacillus sp.* GYTE-L15 Lipazının Üretilmesi, Saflaştırılması ve Nitelendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü. Türkiye. 2006.
- Alatossava, M., Alatossava, T. 2006. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol. Res.*, 161, (4): 334–346.
- Al-Saleh, A.A., Zahran, A.S. 1999. Synthesis of extracellular lipase by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw camel milk. *Food Microbiology*, 16, (2): 149–156.
- Andree, H., Muller, W. R., Smid, R. D. 1980. Lipases as detergent components. *J. Appl. Biochem.*, 2: 218–229.
- Andrews, A.T. 1991. Indigenous enzymes in milk. In: P.F. Fox, Editor, *Food enzymology*, Elsevier Science Publishers, New York, USA. 54–61.
- Andersson, R. E., Hedlund, G. B., Jensson, V. 1979. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J. Dairy Sci.*, 62: 361–367.

- Angultra, J., Rodrigue, Z., Aparicio, L. B., Naharrao, G. 1993. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl Environ Microbiol.*, 59: 2411–2417.
- Angkawidjaja, C., Kanaya, S. 2006. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63: 2804–2817.
- Anonim, 1992. Enzyme Nomenclature, Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB), California.
- Arpigny, J. L., Jaeger, K. E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.*, 343: 177–183.
- Ateslier, Z. B. B., Metin, K. 2006. Production, and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus sp.* *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 628–635.
- Balashev, K., Jensen, T. R., Kjaer, K., Bjørnholm, T. 2001. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie.*, 83, (5):387–397.
- Balcão, V.M., Paiva, A.L., Malcata, F.X. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microbial Technology*, 18: 392–416.
- Balcão, V. M., Kennippen, A., Malcata, F. X., Kalo, P. J. 1998. Lipase catalyzed acidolysis of butter fat with oleic acid: characterization of process and product. *Enzyme Microb. Technol.*, 33: 118–128.
- Baral, A., Fox, P. F. 1997. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas tolaasii*. *Food Chemistry*. 58,(1–2): 33–38.
- Barbaro, S. E., Trevors, J. T., Inniss, W. E. 2001. Effects of low temperature, cold shock, and various carbon sources on esterase and lipase activities and exopolysaccharide production by a psychrotrophic *Acinetobacter sp.* *Can J Microbiol.*, 47: 194–205.
- Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., Verger, R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 133–153.
- Belarbi, E. H., Molina, E., Chisti, Y. 2000. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microb Technol.*, 26: 516–29.

- Bendikienė, V., Surinėnaitė, B., Juodka, B., Safarikova, M. 2004. Insights into catalytic action mechanism of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. *Enzyme and Microbial Technology.*, 34, (6): 572–577.
- Bendikienė, V., Surinėnaitė, B., Bachmatova, I., Marcinkevičienė, L., Juodka, B. 2005. The specificity of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. *Hydrolysis. Biologija.* Nr. 1. P. 27–30.
- Ben-Gigirey, B., Vieites, J. M., Villa, T. G. Y., Barros-Velazquez, J. 2000. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology.*, 57: 19–31.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. 2002. *Biochemistry* 5th Edition, New York: W. H. Freeman and Co.
- Berglund, P., Hutt, K. 2000. Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. In: Patel RN, editor. *Stereoselective biocatalysis*. New York: Marcel Dekker.
- Bhumibhamon, O., Kopraserak, A., Fungthong, S. 2002. Biotreatment of high fat and oil wastewater by lipase producing bacteria. *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)*, 36: 261–267.
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S. E., Kirk, O. 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.*, 9: 360–363.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1990. Triglyceride interesterification by lipases: cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67: 519–524
- Bora, L., Kalita, M. C. 2007. Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus sp.*LBN4. *Inter. J. Microbiol.*, 4, (1): 1–12.
- Borgstrom, B., Brockmann, H. L. 1984. *Lipases*, 1 st ed. Elsevier, Amsterdam.
- Bornscheuer, U., Reif, O.W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kollis, F.N., Menge, U. 1994. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: Purification, crystallization and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1201: 55–60.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 73–81.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Bradoo, S., Saxena, R. K., Gupta, R., 1999. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15: 87–91.
- Bradshaw, L. J. 1963. *Laboratory microbiology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Braun, P., Fehlhaber, K., Klug, C., Kopp, K., 1999. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. *Food Microbiol.*, 16: 531–540.
- Braun, P., Ockhuijsen, C., Eppens, E., Koster, M., Bitter, W., and Tommassen, J. 2001. Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Biol Chem.*, 276: 26030–26035.
- Baird, R.M., Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., 1987. *Pharmacopeia of culture media for food microbiology*. *Int. J. Food Microbiol.*, 5: 221–222.
- Birkeland, S. E., Stepaniak, L., Sorhaug, T. 1985. Quantitative Studies of Heat-Stable Proteinase from *Pseudomonas fluorescens* P1 by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Applied And Environmental Microbiology.*, 382–387
- Briand, D., Dubreucq, E., Galzy, P. 1994. Enzymatic Fatty Esters Synthesis in Aqueous Medium with Lipase From *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice. *Biotechnol. Letters*, 16, (8): 813–818.
- Brockeroft, H., Jensen, R.G. 1974. Lipases In: “Lipolytic Enzymes”. 139–167. Academic Press, New York.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A. 1998. *Medical Microbiology. Pseudomonas and Related Organisms*, Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, 258-264p.
- Brune, A. K., Gotz, F. 1992. Degradation of lipids by bacterial lipases. In: Winkelman G (ed) *Microbial degradation of natural products*. VCH, Weinheim, pp 243–266.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A., Thim, L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 351: 491–494.

- Cardenas, F., de Castro, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V., Valmaseda, M., Elson, S. W., Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microb Technol.*, 28: 145–154.
- Carriere, F., Moreau, H., Raphel, V., Laugier, R., Benicourt, C., Junien, J.L., Verger, R. 1991. Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *Eur. J. Biochem.*, 202: 75–83.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R.O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microb. Technol.*, 37: 648–654.
- Chartrain, M., Katz, L., Marcin, C., Thien, M., Smith, S., Fisher, F., Golken, K., Salmon, P., Brix, T., Price, K., Greasham, R. 1993. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 575–580.
- Chandler, R. E., McMeekin, T. A. 1985. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized homogenized milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 40: 37–41
- Chen, S. J., Cheng, C. Y., Chen, T. L. 1998. Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *J Ferment Bioeng.*, 86: 308–12.
- Chen, J. Y., Wen, C. M., Chen, T. L., 1999. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol. Bioeng.*, 62: 311–316.
- Chen, J. C., Tsai, S. W. 2000. Enantioselective synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on accurel MP1000. *Biotechnol Prog.*, 16: 986–92.
- Chen, L., Daniel, R. M., Coolbear, T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk powders. *International Dairy Journal*, 13: 255–275.
- Chen, L., Coolbear, T., Daniel, R.M. 2004. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus sp.* isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal* 14: 495–504.
- Chen, S., Qian, L., Shi, B. 2007. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71; *Process Biochemistry*, 42: 988–994.
- Cho, A. R., Yoo, S. K., Kim, E. J. 2000. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiological Letters.*, 186: 235–238.

Chowdary, G.V., Ramesh, M. N., Prapulla, S. G. 2001. Enzymic synthesis of isoamly isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis. *Process Biochemistry.*, 36: 331–339.

Christen, G. L., R. T. Marshall. 1980. Thermostability of selected lipase produced by psychrotrophic bacteria. *J. Dairy Sci.* 63 (Suppl. 1): 46.

Christen, G. L., Marshall, R. T. 1984. Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media. *J. Dairy Sci.*, 67: 1680–1687.

Coleman, M.H., Macrae, A. R. 1980. Rearrangement of fatty acid. esters in fat reaction reactants. UK Patent. 1 577 933:44pp.

Collins, N. C., Lyne, P. M., Grange, J. M. 1995. *Microbiological Methods*. Seventh edition. Butterworth Heinemann Pres.

Converse, C. A., Cooper, A., Nutley, M. A., 1981. A radial-diffusion assay for serum lipase. *Biochem. Soc. Trans.* 9: 320–321.

Copeland, R. A. 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis* (2nd Ed.), Wiley-VCH, New York.

Cortez, J., Mangiapane, H., Cortez, L., Griffin, M. 1999. *Application of Enzyme Technology in the Textile Industry*. The Nottingham Trent University, ISBN 0–905488–45–8.

Côté, A., Shareck, F. 2008. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Enzyme and Microbial Technology*, 1–27.

Cousins, C. M., Bramley, A.J. 1981. The microbiology of raw milk, p. 119–163. *In* R. K. Robinson (ed.), *Dairy microbiology*, vol. 1. Applied Science Publishers, Englewood, N.J.

Cousin, M. A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection.*, 45, (2): 172–207.

Craven, H. M., Macauley, B. J. 1992. Microorganisms in pasteurised milk after refrigerated storage 1. Identification of types. *Australian Journal of Dairy Technology.*, 47, (5): 38–45.

Cruickshank, J. M., Neil-Dwyer, G., Lane, J. 1975. The effect of oral propranolol upon the ECG changes occurring in subarachnoid haemorrhage. *Cardiovasc Res.*, 9, (2): 236–245.

- Davranov, K. 1994. Microbial lipases in biotechnology. *Appl Biochem Microbiol.*, 30: 527–534.
- Deeth, H. C., Touch, V. 2000. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology.*, 55: 153–168.
- Deeth, H. C., Khusniati, T., Datta, N., Wallace, R. B. 2002. Spoilage patterns of skim and whole milks. *Journal of Dairy Research.*, 69: 227–241.
- Degrassi, G., Uotila, L., Klima, R., Venturi, V., 1999. Purification and Properties of an Esterase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and Identification of the Encoding Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3470–3472.
- Dennison, C. 2002. A guide to protein isolation, USA: Kluwer Academic Publishers.
- Dharmsthiti, S., Kuhasuntisuk, B. 1998. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, 21: 75–80.
- Dharmsthiti, S., Pratuangdejkul, J., Theeragool, G.T., Luchai, S. 1998. Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *J Gen Appl Microbiol.*, 44: 139–145.
- Dharmsthiti, S., Luchai, S. 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus sp.* THL027. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179: 241–246.
- Dogan, B., Boor, K. J. 2003. Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. *Applied And Environmental Microbiology.*, 130–138.
- Dong, H., Gao, S., Han, S., Cao, S., 1999. Purification and characterization of a *Pseudomonas sp.* lipase and properties in non-aqueous media. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30: 251–256.
- Ducret, A., Trani, M., Lortie, R. 1998. Lipase catalysed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity. *Enzyme Microb Technol.*, 22: 212–6.
- Dunhaupt, A., Lang, S., Wagner, F., 1991. Properties and partial purification of *Pseudomonas cepacia* lipase. In: Alberghina, L., Schmid, R.D., Verger, R.(Eds.), lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering. GBF Monographs. VCH, Weinheim, 389-392p.

Dröge, M.J. 2004. Selection of novel lipases and esterases for enantioselective biocatalysis. Ridderprint BV (Ridderkerk, The Netherlands).

Eijkman C. 1901. Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen, Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskr., 29: 841–848.

Elwan, S. H. 1985. Lipases production by *Bacillus circulans* under mesophilic and osmophilic conditions: [b] effect of certain vitamins and nitrogenous compounds on lipases production. Egyptian Journal of Microbiology, 20: 115–28.

Emanuilova, E., Kambourova, M., Dekovska, M., Manolov, R., 1993. Thermoalkalophilic lipase-producing *Bacillus* selected by continuous cultivation. FEMS Microbiol. Lett., 108: 247–250.

Erarslan, A. 2006. Enzim Stabilizasyonu Notları. Enzim karakterizasyonu ve stabilizasyonu uygulamalı eğitim kursu. 10–14 Temmuz 2006. Tübitak Gen Müh. ve Biyotek. Araştırma Enstitüsü.

Ertuğrul, S., Döñez, G., Takaç, S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. Journal of Hazardous Materials, In Press.

Faber, K. 1997. Biotransformations in Organic Chemistry, third ed. Springer-Verlag, New York.

Falch, E. A. 1991. Industrial enzymes - developments in production and application. Biotechnology Advance., 9: 643–658.

Feller, G., Thiry, M., Arpigny, J. L., Mergeay, M., Gerday, C. 1990. Lipases from Psychrotrophic Antarctic bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 66: 239–244.

Foglia, T. A., Villeneuve, P. 1997. *Carica papaya* latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. J. Am. Oil Chem. Soc., 74: 1447.

Fomuso, L. B., Akoh, C. C. 1998. Structured lipids: lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein. J. Am. Oil Chem. Soc., 75, (3): 405–410.

Ferrer, M., Cruces, M. A., Plou, F. J., Bernabe, M., Ballesteros, A. 2000. A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and n-dodecyl maltosides. Tetrahedron, 56: 4053–4061.

Finkelstein, A. E., Strawich, E. S., Sonnino, S. 1970. Characterization and partial purification of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta., 206: 380–391.

- Fitz-Gerald, C. H., Deeth, H. C., Coghill, D. M. 1982. Low temperature inactivation of lipases from psychrotrophic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 37, (6): 51–54.
- Fox, P. F., Stepaniak, L. 1983. Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. *J. Dairy Research*, 50, (1): 77–89.
- Gandolfi, R., Marinelli, F., Lazzarini, A., Molinari, F. 2000. Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 870-875.
- Gao, X. G., Cao, S. G., Zhang, K. C. 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 74–82.
- Gennarl, M., F. Dragotto. 1992. A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *J. Appl. Bacteriol.*, 72: 281–288.
- Gerhartz, W. 1990. Industrial uses of enzymes. In: *Enzymes in industry production and application*. Weinheim, Germany: VCH. 77–148.
- Ghanem, E. H., Al-Sayeed, H. A., Saleh, K. M. 2000. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 459– 464.
- Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents *Tetrahedron: Asymmetry*, 15: 3331–3351.
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., Davidson, S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Science progress.*, 79, (2): 119–157.
- Gilbert, E. J., Cornish, A., Jones, C. W., 1991a. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2223–2229.
- Gilbert, E. J., Drozd, J. W., Jones, C. W., 1991b. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2215-2221.
- Gilham, D., Lehner, R. 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36: 139–147.

- Gill, J., Parish, J.H. 1997. Minireview: Lipases-Enzymes at an Interface. *Biochemical Education*, 25, (1) : 2–5.
- Gill, I., Valivety, R. 1997a. Polyunsaturated fatty acids: Part 1. Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.*, 15: 401–9.
- Gill, I., Valivety, R. 1997b. Polyunsaturated fatty acids: Part 2. Biotransformations and biotechnological applications. *Trends Biotechnol.*, 15: 470–8.
- Gilmour, A., Rowe, M.T., 1990. Micro-organisms associated with milk. In: Robinson, R.K. (Eds.), *The Microbiology of Milk*, vol. 1, Dairy Microbiology, second ed. Elsevier Applied Science, London, pp. 37–75.
- Gitlesen, T., Svensson, I., Aldercreutz, P., Mattiasson, B., Nilsson, J. 1995. High oleic-acid rape seed oil as starting material for the production of confectionery fats via lipase-catalysed transesterification. *Ind. Crops Products.*, 4: 167–171.
- Gitlesen, T., Bauer, M, Adlercreutz, P. 1997. Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim Biophys Acta*, 1345: 188–196.
- Godtfredsen, S. E. 1990. Microbial lipases. In: Fogarty WM, Kelly ET (eds) *Microbial enzymes and biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, pp 255–274.
- Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G. 1999. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry* ,35: 85–90.
- Goodman, L. P., Durgan, L. R. 1969. The effect of sonication on lipase activity. *Lipids*, 5: 362–364.
- Gowland, P., Kernick, M., Sundaram, T.K. 1987. Thermophilic bacterial isolates producing lipase. *FEMS Microbiology Letters*, 48, (3): 339- 343.
- Graile, J., Pina, M., Montet, D., Muderhwa, J.M. 1991. Making value added products from palm oil by 1,3- regioselective enzymatic interesterification. *Elaeis*, 41: 10–13.
- Gram, L., Huss, H.H. 1996. Microbial spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 33, (1): 121–137.
- Griffiths, M. W., Phillips, J. D., Muir, D. D. 1984. Post-pasteurization contamination-the major cause of failure of fresh dairy products. *Hannah Res.*, 1984: 77–87.

- Gulati, R., Isar, J., Kumar, V., Parsad, A.K., Parmar, V.S., Saxena, R.K. 2005. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. *Pure Appl Chem*, 77: 251–262.
- Gunstone, F.D. 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1535–1549.
- Gupta, N., Rathi, P., Gupta, R. 2002. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal Biochem.*, 311: 98–99.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S. 2003. Lipase assay for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37: 63-71.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 763–781.
- Gupta, A., Khare, S. K. 2006. A protease stable in organic solvent from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour. Technol.*, 97: 1788–1793.
- Gupta, N., Rathi, P., Singh, R., Goswami, V. K., Gupta, R. 2007. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 67: 648–653
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J., Martínez, A.T. 2001. The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends in Biotechnology.*, 19, (9): 340–348.
- Haba, E., Bresko, O., Ferrer, C., Marqués, A., Busquets, M., Manresa, A. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology.*, 26: 40–44.
- Hamsaveni, D. R., Prapulla, S. G., Divakar, S. 2001. Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochemistry.*, 36: 1103–1109.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A. 2005. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235–251.
- Hassing, G.S. 1971. Partial purification and some properties of a lipase from *Corynebacterium acne*. *Biochem Biophys Acta* 242: 331.
- Heler, L. 29-Aug-2006. US enzyme market poised for continued growth. <http://www.foodnavigator-usa.com/news/ng.asp?id=70180-enzymes-lipases-proteases>.

- Higaki, S., Morohashi, M. 2003. *Propionibacterium acnes* lipase in seborrheic dermatitis and other skin diseases and Unsei-in. *Drugs Exp Clin Res.* 29: 157–9.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. 2004. Lipases and their industrial applications, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 118: 155–170.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretchmar, M., Schäfer, W. 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.*, 174: 362–374.
- Hayes, M. C., Boor, K. 2001. Raw milk and fluid milk products. In: Marth, E.H., Steele, J.L. (Eds.), *Applied Dairy Microbiology*, second ed. Marcel Dekker, New York, pp. 59–76.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sadra, L., Comeau, L. C. 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb Technol.*, 26: 421–30.
- Holmes, P. E., Kornacki J. A. 1993. A novel lipase from *Pseudomonas alcaligenes* and its manufacture for use in laundry detergents. (Olin Corp., USA). U.S. US 5227300 A 13. CA 119: 220517.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 71-101p.
- Hou, C. T., 1994. pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. *J. Ind. Microbiol.*, 13: 242–248.
- Hou, C.T. 2002. Industrial Uses of Lipase New York, USA, *Lipid Biotechnology*, 387–394.
- Horiuti, Y., Imamura, S. 1977. Purification of lipase from *Chromobacterium viscosum* by chromatography on palmitoyl cellulose. *J Biochem.*, 81: 1639–1649.
- Hun, C. J., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., Basri, M. 2003. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal.*, 15, (2): 147–151
- Iizumi, T., Nakamura, K., Fukase, T. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas sp.* KWI-56. *Agric Biol Chem.*, 54: 1253–1258.

Inter-esterification, enzyme technology, Dr. Gordon Bickerstaff, Department of Biological Sciences, University of Paisley.
<http://wwwbiol.paisley.ac.uk/Courses/Enzymes/glossary/Esterif.htm>.

Irimescua, R., Furihataa, K., Hataa, K., Iwasakib, Y., Yamaneb, T. 2001. Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 743–748.

Ishida, R., Suzuki, M., Kotsuka, T., Sakimoto K. 1995. Novel alkaline lipase and its preparation from *Pseudomonas*. (Showa Denko K. K., Japan) PCT Int. Appl WO 9506720 A1. CA 122: 309812.

Ito, T., Kikuta, H., Nagamori, E., Honda, H., Ogino, H., Ishikawa, H., Kobayashi, T. 2001. Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, (3): 245–250.

Iwai, M., Shimada, Y., Tsujisaka, Y. 1980. Modification of *Rhizopus delemar* Lipase by Its Binding with Phospholipids. *Biochem.*, 88, (2): 533–538.

Jackson, G. J. 1990. Public health and research perspectives on the microbial contamination of foods, *J. Amin. Sci.*, 68: 884–891.

Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, (1): 29–63.

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

Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews Microbiology*, 53, (1): 315–351.

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

Jang, S. S., Ha, W. S., Jo, W. H., Youk, J. H., Kim, J. H., Park, C. R. 1998. Monte Carlo simulation of copolymerization by ester interchange reaction in miscible polyester blends. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 36, (10): 1637 – 1645.

Jarvis, G. N., Thiele, J. H. 1997. Qualitative rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. *J Microbiol Methods*, 29: 41–47.

Jennings, B.H., Akoh, C.C. 2000, Lipase-catalyzed modification of rice bran oil to incorporate capric acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (9): 4439–4443.

Jensen, R. G., deJong, F. A., Clark, R. M., 1983. Determination of lipase specificity. *Lipids*, 18 (3): 239–252.

Jensen, R. G., Hamosh, M. 1996. *Engineering of/with lipases*. Kluwer Academic Publishers, Boston, London. 17–29.

Jeppesen, C., 1995. Media for *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas spp.* from food and environment. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 25–41.

Jesus, P. C., Rezende, M.C., Nascimento, M.G. 1995. Enzymatic resolution of alcohols via lipases immobilized in microemulsion-based gels. *Tetrahedron Asymm.* 6: 63–66.

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

Joerger, R.D., Haas, M.J. 1993. Overexpression of a *Rhizopus delemar* lipase gene in *Escherichia coli*. *Lipids.*, 28 (2): 81–88.

Jos, H.J., Veld, H.I. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food. Microbiol.*, 33: 1–18.

Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., Baratti, J. C. 2000. Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*. *Applied Microbiol. and Biotechnol.*, 54: 173–179.

Kaiser, P., Raina, C., Parshad, R., Johri, S., Verma, V., Andrabi, K. I., Qazi, G. N. 2006. A novel esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): purification and characterization of the enzyme. *Protein Expr Purif.*, 45, (2): 262–8.

Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22: 307-313.

Kanwar, L., Goswami, P. 2002. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme and Microb. Technol.*, 31: 727–735.

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

Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L. I., Fujiwara, N. 2006. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Putrid Mineral Cutting Oil as Component of Metalworking Fluid. *J. Bioscience and Bioengineering*, 102, (2): 82–89.

Karakuş, M. 1993. Gıda Sanayinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları. 82–100. Gebze-Kocaeli.

Kashyap, M. L., Meelies, M. J. Brady, D. Hnd B. A., Robinson K. 1980. A micromethod using gas-liquid chromatography from measuring individual fatty acids liberated during interaction of triglyceride -rich lipoproteins and lipoprotein lipase. *Anal. Biochem.*, 107, (2): 432–435.

Kato, K., Nakamura, S., Sakugi, T., Kitai, K., Yone, K., Suzuki, J., Ichikawa, Y. 1989. Tumor necrosis factor and its activators for the treatment of malignant tumors, Japanese Patent 1,186,820.

Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U.T. 1998. Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G, Stadler A, Kelly PJW, editors. *Biotechnology*. vol. 8. New York: VCH, pp. 37–192.

Khyami-Horani, H. 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World J Microbiol Biotechnol.*, 12: 399–401.

Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, Dostbil, N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları KSÜ. *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1).

Kim, E. K., Jang, W. H., Ko, J. H., Kang, J. S., Noh, M., J., Yoo, O. J. 2001. Lipase and Its Modulator from *Pseudomonas sp.* Strain KFCC 10818: Proline-to-Glutamine Substitution at Position 112 Induces Formation of Enzymatically Active Lipase in the Absence of the Modulator. *Journal of Bacteriology*, 183, (20): 5937–5941.

Kim, K. R., Kwon, D. Y., Yoon, S. H., Kim, W. Y., Kim, K. H. 2004. Purification, refolding and characterization of recombinant *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Protein Expression & Purification*, 39, (1): 124-129.

Kim, K.R., Kwon, D.Y., Yoon, S.H., Kim, W.Y., Kim, K.H. 2005. Purification, refolding and characterization of recombinant *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Protein Expression & Purification* 39, (1): 124–129.

- Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, R., Arunkumar, M., Thangavelu, T., Natarajaseenivasan, K. 2007. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas sp.* (MSI057). *Bioprocess Biosyst Eng.* DOI 10. 1007/s00449-007-0186-0.
- Kirchner, G., Scollar, M. P., Klibanov, A. M. 1985. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *Biosci Biotechnol Biochem.*,107: 7072-251.
- Kiyota, H., Higashi, E., Koike, T., Oritani, T. 2001. Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron: Asymmetry.*, 12: 1035-1038.
- Klibanov, A. M. 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.*, 15: 97-101.
- Klibanov, A.M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, 409: 241-246.
- Kojima, Y., Shimizu, S. 2003. Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *J. Bioscience and Bioengineering*, 96, (3): 219-226.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D., Schmid, R.D. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas sp.* strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction Data. *Journal of Bacteriology*, 173, (15): 4836-4841.
- Kouker, G., Jaeger, K.E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology.*, 53, (1) : 211-213.
- Kovaks, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanae* by the oxidase reaction. *Nature*, 178-703.
- Krishna, S. H., Karanth, N. G. 2001. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A kinetic study. *Biochim Biophys Acta*, 1547: 262-267.
- Kristiansen, A.K., 1983. Evaluation of two selective media for rapid isolation of *Pseudomonas* strains. *Danks veterianertid skrift.*, 66, (3): 83-91.
- Kulkarni, N., Gadre, R. V., 1999. A novel alkaline, thermostable, protease-free lipase from *Pseudomonas sp.* *Biotechnology Letters*, 21: 897-899.

- Kulkarni, N. Studies on lipase enzyme from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. Doktora Tezi. Chemical engineering Division National Chemical Laboratory India. 2002.
- Kulkarni, N., Gadre, R. V. 2002. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 344 – 348.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., Gupta, R. 2005. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein expression & purification*, 41, (1): 38-44.
- Kumura, H., Mikawa, K., Saito, Z. 1991. Effect of protease on concomitant lipase produced by *Pseudomonas sp.* No. 33. *Milchwissenschaft*, 46: 215–218.
- Kumura, H., Hirose, S., Sakurai, H., Mikawa, K., Tomita, F., Shimazaki, K. 1998. Molecular cloning and analysis of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* No. 33. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62: 2233-2235.
- Kurooka S., Okamoto S. and Hashimoto M. 1977. A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. *J. Biochem.* (Tokyo) 81: 361–369.
- Labuschagne, R. B., Tonder, A., Litthauer, D. 1997. *Flavobacterium odoratum* lipase: Isolation and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, (1): 52–58.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680–685.
- Lanser, A. C., Manthey, L. K., Hou, C. T., 2002. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein. *Curr Microbiol.*, 44: 336-340.
- Larsson, K. 1994. *Lipids–Molecular Organization, Physical Functions and Technical Applications*, The Oily Press, Bridgewater, UK.
- Law, B. A., Sharpe, M. E., Chapman, H. R. 1976. The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 43,(3): 459–468.
- Lawler, D., Smith, S. 2000. Enzyme- producing strain of *Bacillus* bacteria. (Roebic Laboratories, Inc., USA) U. S. US 6162634 A. CA 134:41190
- Lawrence, R. C., Frayer, T. F., Reiter, B. 1967. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature* 213: 1264–1265.

- Lee, S. Y., Rhee, J. S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 617–623.
- Lee, K-T, Akoh, C.C. 1996. Immobilized lipases catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, (5): 611–615.
- Lee, D. W., Koh, Y. S., Kim, K. J., Kim, B. C., Choi, H. J., Kim, D. S., Suhartono, M. T., Pyun, Y. R. 1999. Isolation and characterisation of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters.*, 179: 393–400.
- Lee, E. G., Won, H. S., Ro, H. S., Ryu, Y. W., Chung, B. H. 2003. Preparation of enantiomerically pure (*S*)-flurbiprofen by an esterase from *Pseudomonas sp.* KCTC 10122BP. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26: 149–156.
- Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem*, 216: 155–160.
- Li, H., Zhang, X. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus sp.* TW1. *Protein Expression and Purification*, 42: 153–159.
- Lin, S. F., Chiou, C. M., Yeh, C. M., Tsai, Y. C. 1996. Purification and partial characterization of an Alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, (3): 1093–1095.
- Linko, Y. Y., Lamsa, M., Wu, X., Uosukainen, E., Seppala, J., Linko, P. 1998. Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J Biotechnol.*, 66, (1): 41–50.
- Litthauer, D., Ginster, A., Skein, E. V. E. 2002. *Pseudomonas luteola* lipase : A new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme and Microbial Technology.*, 30: 209–215.
- Lopes, M. F. S., Leitao, A. L., Regalla, M., Marques, J. J. F., Carrondo, M. J. T., Crespo, M. T. B. 2002. Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*. 76: 107–115.
- Lotrakul, P., Dharmstithi, S., 1997. Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13: 163-166.
- Lott, J. A., Lu, C. J. 1991. Lipase isoforms and amylase isoenzymes—assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis. *Clin Chem.*, 37: 361–8.

- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J. L., Brocca S., Valero, F., Lafuente, J., 1998. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem. Phys. Lipids.*, 93: 143-148.
- Macedo, G.A., Lozano, M.M.S., Pastore, G.M. 2003. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus sp.* *J Biotechnol* 6, (1).
- Mac Faddin, J. F. 1985 *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Vol.1. Baltimore, MD.: Williams & Wilkins.
- Macrae, A. R. 1983. Extracellular microbial lipases. In W. M. Fogarty (Ed.), *Microbial enzymes and biotechnology* (pp. 225–249). New York, USA: Applied Science Publishers.
- Macrae, A. R., Hammond, R. C. 1985. Present and future applications of lipases. *Biotech Genet Eng Rev* 3: 193–217.
- Mahadik N.D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., Gokhale, D. V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38, (5): 715-721(7).
- Mahler, G. F., Kok, R. G., Cordenons, A., Hellingwerf, K. J., Nudel, B.C. 2000. Effects of carbon sources on extracellular lipase production and lipA transcription in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 24: 25–30.
- Makhzoum, A., Knapp, J. S. Owusu, R. K. 1995. Factors affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. *Fd. Microbiol.*, 12, (4): 277–290.
- Makhzoum, R. K., Owusu-Apenten, R. K., Knapp, J. S., 1996. Purification and Properties of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* Strain 2D. *Int. Dairy Journal*, 6: 459–472.
- Mangos, T.J., Jones, K.C., Foglia, T.A. 1999. Lipase catalysed synthesis of low-calorie triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76: 1127–1132.
- Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K. 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1258 (3): 272-276.
- Martinez, A., Soberón-Chávez, G. 2001. Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 731-735.

- Mase, T., Matsumiya, Y., Akiba, T. 1995. Purification and characterization of a new lipase from *Fusarium sp.* YM-30. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 1771–1772.
- Masse, L., Kennedy, K. J., Chou, S. P. 2001. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *J Chem Technol Biotechnol.*, 76: 629-635.
- Matselis, E., Roussis, I. G. 1992. Influence of culture conditions and hydrogen peroxide on growth and extracellular enzyme production by *Pseudomonas* UICD31. *Fd. Sci. Technol.*, 25, (5): 433–437.
- Matselis, E., Roussis, I. G. 1998. Proteinase and lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. Proteolysis and lipolysis in thermized ewe's milk, *Food Control*, 9, (5): 251–259.
- Matsumae, H., Furui, M., Shibatani, T. 1993. Lipase catalysed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of Ditiagem hydrochloride. *J Ferment Bioeng.*, 75: 93–8.
- Maurer, K. 2004. Detergent proteases, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 330–334.
- Maurich, V., Moneghini, M., Zacchigna, M., Pitotti, A., Lencioni, E., 1991. High-performance liquid chromatographic assay of pancreatic lipase activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 9, (5): 427–431.
- Mauvernay, R. Y., Labreur, P., Labrousse, M. 1970. Composition and its products, United States Patent 3,513,073.
- Mc Phee, J.D., Griffiths, M.W., 2002. Psychrotrophic bacteria, *Pseudomonas spp.* In: Roginsky, H., Fuquay, J. W., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 4. Academic Press, New York, pp. 2340–2351.
- Meghwanshi, G. K., Agarwal, L., Dutt, K., Saxena, R. K., 2006. Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40: 127–131.
- Metin, K., Akpınar, M.A. 2000. *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972 Karaciğer lipaz enziminin bazı kinetik özellikleri. *Turk J. Biol.*, 24: 489–502.
- Meyers, S. A., Cuppett, S.L., Hutkins, R.W. 1996. Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiology.*, 13: 383–389.
- Misset, O., Gerritse, G., Jaeger, K-E., Winkler, U., Colson, C., Schanck, K., Lesuisse, E., Dartois, Y., Blaawoo, M., Ransac, S., Dijkstra, B. W. 1994. The

structure function relationship of the lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Protein Eng.*, 7: 523–529.

Miura, T., Yamane, T. 1997. Screening for fungi that have high lipolytic and acidolytic activities in biomass support particles. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61: 1252–1257.

Muir, D. D. 1996. The shelf-life of dairy products 3. Factors influencing intermediate and long life dairy products, *Journal of the Society of Dairy Technology* 49: 119–124

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

Mukoyama, K., Umehara, K. 1989. Lipase-containing detergents. (Lion Corp., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01161096 A2. CA 111:235670

Muraoka, T., Ando, T., Okuda, H. 1982. Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *J Biochem.*, 92: 1933–1939.

Muralidhar, R. V., Chirumamilla, R. R., Marchant, R., Ramachandran, V. N., Ward, O. P., Nigam, P. 2002. Understanding lipase stereoselectivity. *World J Microbiol Biotechnol.*, 18: 81–97.

Nashif, S. A., Nelson, F. E. 1953. The lipase of *Pseudomonas fragi* II: factors affecting lipase production. *J Dairy Sci* 36,471–480.

Nawani, N., Singh, R., Kaur, J. 2006. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology.*, Vol.9 No.5.

Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* Volume 43, (1–4): 142–147.

Nishio, T., Chikano, T., Kamimura, M. 1987. Substrate Specificity and Mode of Action of the Lipase Produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B, *Agric. Biol. Chem.* 51: 2525–2529.

Ogino, H., Miyamoto, K., Ishikawa, H. 1994. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes organic solvent-stable lipolytic enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3884±3886.

Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M., Ishikawa, H. 2000. Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from

- organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. J. Ferment. Bioeng., 8: 451–457.
- Oh, B. C., Kim, H. K., Lee, J. K., Kang, S. C., Oh, T. K. 1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. FEMS Microbiol Lett 179,385–392.
- Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y. 1976. Positional specificities of four kinds of microbial lipases *Agric. Biol. Chem.*, 40, (4): 655–660.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. and Goldman, A. 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5: 197–211.
- Omar, I.C., Nishio N, Nagai S. 1987. Fat hydrolysis and esterification by a lipase from *Humicola lanuginosa*. *Agric Biol Chem.*, 51: 2153–2159.
- Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A. 1995a. Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. *World J Microbiol Biotechnol.*, 11: 669–77.
- Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A. 1995b. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 43: 42–51.
- Pabai F, Kermasha S, Morin A. 1996. Use of continuous culture to screen for lipase-producing microorganisms and interesterification of butterfat by lipase isolates. *Can J Microbiol.*, 42: 446–452.
- Palekar, A.A., Vasudevan, P.T., Yan, S. 2000. Purification of lipase: a review. *Biocatal Biotransform.*, 18: 177–200.
- Palleroni, N. J. 1984. *Pseudomonas* Migula 1894. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg, N.R., Holt, J.G., Eds.), Vol.1., Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 140-223p.
- Palmeros, B., Güereca, L., Alejandro A., C., Soberón-Chávez, G. 1994. Biochemical Characterization of the Lipolytic Activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83. *Process Biochemistry*, 29: 207-212.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, U. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29: 119–131.

- Patel, R. N. 2003. Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 6: 902–20.
- Patkar, S. ve Björkling, F. 1994. Lipase inhibitors. In *Lipases: their structure, biochemistry and application* (Woolley, P. and Petersen, S.B., Eds.). Cambridge University Press., pp. 207–224. Cambridge.
- Pencreac'h, G., Leullier, M., Baratti, J. C. 1997. *Biotechnol Bioeng.* 56, (2): 181–9.
- Petschen, I., Malo, E. A., Bosch, M. P., Guerrero, A. 1996. Highly enantioselective synthesis of long chain alkyl trifluoromethyl carbinols and β -thiotrio-fluoromethyl carbinols through lipases. *Tetrahedron Asymmetry*, 7: 2135–2143.
- Pot, B., Vandamme, P., Kersters, K. 1994. Analysis of Electrophoretic Whole-Organism Protein Fingerprints. In : *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics* (Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., Eds.). John Wiley and Sons Ltd. West Sussex, England. pp. 493–521.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Baharum, S.N., Basri, M., Salleh, A. B. 2005. High- yield purification of an organic solvent- tolerant lipase from *Pseudomonas sp.* strain S5. *Analytical Biochemistry*, 341: 267–274.
- Rajan, M. 2004. Global market for industrial enzymes to reach \$2.4 million by 2009 Business Communications Company, Inc. RC-147U Enzymes for Industrial Applications. <http://www.bccresearch.com/editors/RC-147U.html>.
- Rajmohan, S., Dodd, C.E.R., Waites, W.M. 2002. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology* 93: 205–213.
- Rao, P., Divakar, S. 2001. Lipase catalyzed esterification of α -terpineol with various organic acids. application of the Plackett-Burman design. *Process Biochemistry*, 36: 1125–1128.
- Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T. 2001. Low temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas sp.* Strain KB700A. *Appl Environ Microbiol.*, 67,4064–4069.
- Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R. K., Gupta, R., 2000. A hyper-thermostable, alkaline from *Pseudomonas sp.* with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, 22: 495–498.
- Rathi, P., Saxena, R. K., Gupta, R., 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepaia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37: 187–192.

Reetz, M.T., Jaeger, K.-E. 1998. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases, *Chem Phys Lipids*, 93: 3–14.

Reetz, M. T. 2001. Combinatorial and evolution-based methods in the creation of enantioselective catalysts. *Angew Chem Int Ed* 40: 284–310.

Reetz, M. 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 145–150.

Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Verger, R. 1993. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality.*, 5: 24–30

Rohit, S., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv.*, 19,627–62.

Rollof, J., Hedstrom, S.A., Nilsson-Ehle P.1984. A simple turbidometric method for specific measurement of *Staphylococcus aureus* lipase activity. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, Sect B, 92B(3), 155-158. CA 101: 186656.

Rowe, M., Gilmour, A. 1985. The present and future importance of psychrotrophic bacteria. *Dairy Industry International.*, 50, (11): 14–29.

Rowe, M. T., Dunstall, G., Kilpatrick, D., Wisdom, G. B. 2003. Effect of growth phase on the subsequent growth kinetics of psychrotrophic bacteria of raw milk origin. *International Journal of Dairy Technology.*, 56, (1): 35–38.

Rúa, M. L., Schmidt-Dannert, C., Wahl, S., Sprauer, A., Schmid, R. D. 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*, 56, (2): 89–102.

Rubin, B., Dennis, E. A, editors. 1997. Lipases: Part B. Enzyme characterization and utilization *Methods in enzymology*. vol. 286. New York: Academic Press, pp. 1–563.

Ruchi, G., Anshu, G., Khare, S.K. 2007. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application; *Bioresource Technology*, In Press.

Ruiz, L., Roudriguez-Fernandez, M. F. C.1982. Kinetic study of hepatic triglyceride lipase from rat liver soluble fraction. *Enzyme* 27: 215–219.

Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Pastor, F. I. J., Diaz, P., Saso, L. 2004. Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*-related lipases by saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1672: 184–191.

- Sakiyama, T., Yoshimi, T., Miyake, A., Umeoka, M., Tanaka, A., Ozaki, S., Nakanishi, K. 2001. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from *Pseudomonas sp.* LP7315. *J. Bioscience and Bioengineering*. 91, (1): 27–32.
- Samad, M. Y. A., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., Zin Van Yunus, W. M., Ampon, K., Basri, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Methods*, 9: 51–56.
- Sarkar, S., Sreekanth, B., Kant, S., Banerjee, R., Bhattacharyya, B. C. 1998. Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*., 19, (1): 29–32.
- Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S., Gulati, R. 1999. Microbial lipases: potential biocatalyst for the future industry. *Current Science*, 77: 101–115.
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S. 2003a. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological methods*., 52: 1–18.
- Saxena, R. K., Davidson, W. S., Sheoran, A., Giri, B. 2003b. Purification and characterisation of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 39: 239–247.
- Saxena, R. K., Agarwal, L., Meghwanshi, G. K in: Satyanarayana, T., Johri, B.N. (Eds.). 2005. Diversity of Fungal and Yeast Lipases: Present and Future Scenario for the 21st Century, I.K. International Pvt. Ltd., New Delhi, p. 796 (Chapter 43).
- Savitha, J., Srividya, S., Jagat, R., Payal, P., Priyanki, S., Rashmi, G. W., Roshini, K. T., Shantala, Y. M. 2007. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *African Journal of Biotechnology*, 6, (5): 564–568.
- Sayari, A., Frikha, F., Miled, N., Mtibaa, H., Ali, Y. B., Verger, R., Gargouri, Y. 2005. N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. *FEBS Letters*, 579: 976–982.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U., Schmid, R.D. 1994. Screening purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochim Biophys Acta* 1214, 43–53.
- Schmidt-Dannert, C., Luisa Rua, M., Schmid, R.D. 1997. Two novel lipases from the thermophile *Bacillus thermocatenuatus*: Screening, purification, cloning, overexpression and properties. *Methods Enzymol.*, 284: 194–219.

- Schmid, U. 1998. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides, *Journal of American Oil Chemists Society* 75: 1527–1531.
- Schmidt-Dannert, C. 1999. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg. Med. Chem.*, 7: 2123–2130.
- Schmid, R., Verger, R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37: 1608–1633
- Schuepp, C., Kermasha, S., Michalski, M.C., Morin, A. 1997. Production, partial purification and characterisation of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *Process Biochemistry*, 32, (3): 225-232.
- Schulz, T., Plesis, J., Schmid, R. D. 2000. Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: a quantitative model. *Protein Sci* 9: 1053–1062.
- Scopes, K. R. 1994. *Protein Purification, Principles and Practise* 3 Edition, New York: Springer-Verlag New York Inc.
- Sellappan, S., Akoh, C. C. 2001, Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalyzed by lipozyme IM60. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, (4): 2071–2076.
- Semeriva, M., Benzonana, G., Desnuelle, P. 1967. *Rhizopus arrhizus* lipase. I. Positional specificity. *Bull. SOC. Chim. Biol.*, 49: 71–79.
- Shah, N. P. 1994. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*, 49: 432–437.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627–662.
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L., Gupta, J. 2002a. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. *Proc. Biochem.*, 37: 1075–1084.
- Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Jolly, R. S., Gupta, L. K., Gupta, J. K. 2002b. Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus sp.* RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Ind J Microbiol*, 42: 49–54.
- Sharma, N.M., Kumar, S., Sawhney, S.K. 2003. A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 137: 141–148.

Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H., Kato, Y. 1998. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J. Int. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 304–307.

Shirazi, S.H., Rehman, S.R., Rehman, M.M. 1998. Short communication: production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol.*, 14: 595–597.

Sidhu, P., Sharma, R., Soni, S. K., Gupta, J. K. 1998. Effect of cultural conditions on extracellular alkaline lipase production from *Bacillus sp.* RS-12 and its characterization. *Ind J Microbiol.*, 38: 9–14.

Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23: 15–22.

Simons, J. W., Van Kampen, M. D., Riel, S., Götzt, F., Egmond, M. R., Verheij, H. M. 1998. Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*-comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *Eur J Biochem.*, 253: 675–83.

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

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

Sneath, P. 1986. *Bergey's Manual of systematic bacteria*. Vol.2. Williams and Wilkins Co. Baltimore, Maryland

Snellman, E. A., Sullivan, E. R., Colwell, R. R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, Lip A, of *Acinetobacter sp.* RAG-1. *Eur J Biochem.*, 269: 5771–5779.

Sørhaug, T., Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology.*, 8: 35–41.

Stead, D. 1986. Microbial lipases: Their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research.*, 53: 481–505.

- Stepaniak, L., 2000. Bacteria other than *Pseudomonas* spp. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 1. Academic Press, New York, pp., 2345–2351.
- Stepaniak, L., Fox, P.F. 1983. Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* AFT36. *Journal of Dairy Research*, 50: 77–89.
- Stevenson, R. G., Rowe, M. T., Wisdom, G. B., Kilpatrick, D. 2003. Growth kinetics and hydrolytic enzyme production of *Pseudomonas* spp. isolated from pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*, 70: 293–296.
- Stoscheck, C. M. 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50–69.
- Stuer, W., Jaeger, K., Winkler, U.K. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 168, (3): 1070–1074.
- Sugiura, M., Isobe, M., Muroya, N., Yamaguchi, T. 1974. Purification and properties of a *Chromobacterium* lipase with a high molecular weight. *Agric Biol Chem*, 38: 947–952.
- Sugiura, M., Oikawa, T., Hirano, K., Inukai, T. 1977. Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim Biophys Acta.*, 488:353–358.
- Sugihara, A., Shimada, Y., Torninaga, Y. 1988. Purification and characterisation of *Aspegillus niger* lipase. *Journal of Agriculture Biological Chemistry.*, 52: 1591–1592.
- Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J Biochem* 109: 211–216.
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. 1992. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.*, 112: 598–603.
- Suhren, G. 1989. Producer microorganisms. Chapter 1. Pages 3–27 in *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Foods*. R. C. McKellar, ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Sunna, A., Hunter, L., Hutton, C.A., Bergquist, P.L. 2002. Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. *Enzyme and Microbial Technology.*,31: 472–476.

- Surinenaite, B., Bendikienė, V., Juodka, B., Bachmatova, I., Marcinkevichienė, L. 2002. Characterization and physicochemical properties of a lipase from *Pseudomonas mendocina* 3121-1. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 36: 47–55.
- Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., Esaki, N. 2001. Cold-active lipolytic activity of Psychrotrophic *Acinetobacter* sp. Strain No.6. *J. Bioscience and Bioengineering*, 92,(2): 144–148
- Svendsen, A. 1994. Sequence comparisons within the lipase family. In: P. Wooley and S.B. Petersen, Editors, *Lipases: Their Structure Biochemistry and Application*, Cambridge University Press. pp. 1–21.
- Swaigood, H. E., Bozoglu, F. 1984. Heat inactivation of the extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MC50. *J. Agric. Fd Chem.* 32: 7–10.
- Sztajer, H., Maliszewska, I., Wiczorek, J. 1988. Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, 10: 492–497.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. 1989. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett.*, 11: 895–8.
- Şişik, D. Yeni Bir Termofilik Bakterinin, *Anoxybacillus gonensis*, Polihidroksibutirat Parçalama Yeteneğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon. 2003.
- Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. 1992. Purification of lipases. *Journal of Biotechnology.*, 26: 111–142.
- Takagi, Y., Teramoto, J., Kihara, H., Itoh, T., Tsukube, H. 1996. Thiocrown ether as regulator of lipase-catalyzed trans-esterification in organic media—practical optical resolution of allyl alcohols. *Tetrahedron Lett* 37: 4991–4992.
- Tan, K. H., Gill, C. O. 1985. Effect of culture conditions on batch growth of *Pseudomonas fluorescens* on olive oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, (1): 27–32.
- Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C., Deng, L. 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry.*, 39: 459–465.
- Taylor, M. W., MacGibbon, A. K. H. 2002. General Characteristics. In *Encyclopaedia. of Dairy Science*, Vol. 3 pp. 1544–1550.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çeşme, İzmir-Türkiye, 326p.

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

Telefoncu, A. 1997. *Enzimoloji*. Lisansüstü yaz okulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın-Türkiye. 1- 446p.

Ternström, A., A. M. Lindberg, G. Molin. 1993. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 25–34.

Toida, J., Arikawa, Y., Kondou, K., Fukuzawa, M., Sekiguchi, J. 1998. Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62, (4): 759–763.

Tornqvist, H., Belfrage, P. 1976. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolysing enzyme of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 251: 813–819.

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

Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S. 2001. Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochem.*, 36: 933–9.

Ünlütürk, A., Turantaş, F. 1998. *Gıda Mikrobiyolojisi*. Megi-Tan Basımevi. 1. Baskı. Ege Üniv. Çınarlı. İzmir.

Wakelin, N.G., Forster, C.F. 1997. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases, *Bioresour. Technol.*, 59: 37–43.

Van Oort, M. G., Dever, A. M. T. J., Dijkman, R., Tjeenk, M. L., Verheij, H. M., Haas, G. H. de, Wenzig, E., Gotz, F. 1989. Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* 28: 9278–9285.

Vasil, M.L. 1981. *Pseudomonas aeruginosa*: Biology, mechanism, virulence, epidemiology. *J.Pediatr.* 108,(5) : 800–805.

Veerraghavan, K. 1990. A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. *Anal. Biochem.*, 186, (2): 301–305.

Verger, R. 1997. Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol.*, 15, 32–38.

Victor, S., Lin, Y., Kianoush, M., Dancil, K.-P.S., Sailor, M.J., Ghadiri, R.M., 1997. A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor. *Science*, 278: 840–843.

- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, 9: 113–148.
- Vitolo S., Petarca L., Bresci B. 1998. Treatment of olive oil industry wastes. *Biores. Technol.*, 67: 129–137.
- Von Tigerstrom, R.G., Stelmaschuk, S., 1989. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. *Can. J. Microbiol.*, 35: 511-514.
- Vulfson, E. N. 1994. Industrial applications of lipases. In: Lipases-their structure, biochemistry and applications (edited by P. Woolley and S.B. Peterson) Cambridge: Cambridge University Press. Pp. 271–288.
- Wang, Y., Srivastava, K. C., Shen, G. J., Wang, H.Y. 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30–1 (ATCC 53841). *J. Ferment. Bioeng.*, 79: 433–438.
- Wang, L., Jagarao, B.M., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. *J. Dairy Sci.*, 84:1421–1429.
- Wang, S.P., Laurin, N., Himms-Hagen, J., Rudnicki, M.A., Levy, E., Robert, M.F., Pan, L., Oligny, L., Mitchell, G.A. 2001. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res.*, 9: 119–128.
- Wei, Y.L., Kurihara, T., Suzuki, T., Esaki, N. 2003. A novel esterase from a psychrotrophic bacterium, *Acinetobacter sp.* strain no.6, that belongs to the amidase signature family. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23: 357–365.
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., Boor, K. J. 2000. Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas spp.* Isolated from Milk. *Appl Environ Microbiol.*, 66, (5): 2085–2095.
- Wills, E. D. 1960. The relation of metals and –SH groups to the activity of pancreatic lipase, *Biochim. Biophys. Acta*, 40: 481–490.
- Winkler, U. K., Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 138: 663–670.
- Winkler, F. K., D'arcy, A., Hunziker, W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343: 771 – 774.

Winkler, F.K., Gubernator, K., 1994. Structure and mechanism of human pancreatic lipase. In: Wooley, P., Petersen, S.B. (Eds.), *Lipases: their Structure, Biochemistry and Application*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 139–157.

Winteler, H. V., Schneidinger, B., Jaeger, K.-E., Haas, D., 1996. Anaerobically controlled expression system derived from the arcDABC operon of *Pseudomonas aeruginosa*: application to lipase production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3391–3398.

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

Xie, Y.C., Liu, H. Z., Chen, J. Y. 1998. *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification of racemic ibuprofen and chemical hydrolysis of S-ester formed. *Biotechnol. Lett.*, 20: 455–8.

Xin, J.Y., Li, S. B., Xu, Y., Chui, J. R., Xia, C. G. 2001. Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor. *J Chem Technol Biotechnol.*, 76: 579–85.

Yadav, R. P., Saxena, R. K., Gupta, R., Davidson, W. S. 1998. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus* *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28: 243–249.

Yadav, G.D., Trivedi, A.H. 2003. Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in nonaqueous media. *Enzyme Microb. Technol.*, 32: 783–789.

Yamaguchi, S., Mase, T. 1991. Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150, *Applied Microbiological Biotechnology*, 34: 720–725.

Yamamoto, K., Fujiwara, N. 1988. Purification and Some Properties of a Castor-oil-hydrolyzing Lipase from *Pseudomonas sp.* *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, (12): 3015–3021.

Zaks, A., Klibanov, A. M. 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3192–3196.

<http://www.au-kbc.org/frameresearch.html>.

<http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html>.

<http://www.biowise.org.uk/docs/2000/publications/leather.pdf#search='lipases%20in%20leather%20industry>.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Adana'da tamamladı. 2001 yılında Muğla Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü'nde öğrenime başladı. 2005 yılında bu programdan mezun oldu. Aynı yıl Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.