



Determination of lipase activities of actinomycetes isolates from soil

Gizem ARIK ^{*1}, Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ ²
ORCID: 0000-0002-3673-3543; 0000-0003-2485-2016

¹ Ankara Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 06050 Ankara, Turkey
²Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 26470 Eskişehir, Turkey

Abstract

In this study 156 actinomycetes isolates which were isolated from different soil samples were used. Isolates were inoculated proper medium and incubated at 28°C for 7-10 days. In order to investigate the lipolytic activities of the isolates in the culture medium, the transparent zone formed by isolates in the prepared lipase medium was measured with a ruler. 53 of them (34 %) 10 mm and less, 99 of them (63 %) 20 mm and less, 4 of them (3 %) more than 20 mm transparent zone produced. The isolate which showed the highest lipase activity molecular identification has been made which based on 16S rRNA gene sequence. The 16S rRNA sequence information obtained from the isolate was recorded to GenBank with the access number KY172825. As a result of the study has been made on the NCBI database by using BLAST program, it was observed that, isolate showed 97% similarity ‘uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene’ which’s access number on the database is EU283368.1.

Key words: actinomycetes, lipase, soil

----- * -----

Topraktan izole edilen aktinomisetlerin lipaz aktivitelerinin belirlenmesi

Özet

Bu çalışmada farklı toprak örneklerinden izole edilmiş 156 aktinomiset izolatı kullanılmıştır. İzolatlar uygun besiyerine ekilmiş ve 28°C’de 7-10 gün inkübe edilmiştir. İzolatların kültürel ortamda lipolitik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla, hazırlanan lipaz besiyerinde izolatların oluşturdukları şeffaf zon cetvel ile ölçülmüştür. Bunlardan 53 tanesi (%34) 10 mm ve daha az, 99 tanesi (%63) 20 mm ve daha az, 4 tanesi (%3) ise 20 mm’den daha fazla şeffaf zon oluşturmuştur. Tribütirinli besiyerinde en fazla şeffaf zon oluşturan 47 numaralı (21,5 mm) izolatın 16S rRNA gen bölgesine göre yapılan dizi analizi sonucunda GenBank numarası EU283368.1 olan ‘uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene’ e %97 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. İzolatın elde edilen 16S rRNA dizi bilgisi GenBank’a KY172825 erişim numarası ile kaydedilmiştir.

Anahtar kelimeler: aktinomiset, lipaz, toprak

1. Giriş

Aktinomisetler *Actinobacteria* filumunun içinde yer alan gram pozitif, %55’in üzerinde guanin + sitozin oranına sahip bakterilerdir [1]. Filamentli ve dallanan bir yapıya sahip olan bakteriler bu özellikleri nedeniyle küflere benzetilmektedir. Aktinomiset türleri toprak, kompostlar, tatlı su depoları, besin maddeleri ve atmosfer gibi çok çeşitli kaynaklarda bulunabilirler. Asit topraklardan ve turbalardan çok bazik ve nötral topraklarda ve turbalarda yayılış göstermektedirler [2]. Antibiyotik üretme yetenekleri ile tanınmakla beraber diğer intra ve ekstrasellüler metabolitleri ile de endüstri ve biyoteknolojide önemli yerler edinmişlerdir. Antibiyotiklerin yanı sıra antifungal madde üreticisi

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905398723043; Fax.: +905398723043; E-mail: gizemarik1@gmail.com

oldukları bilinmektedir [3]. Triaçilgliserollerin hidrolizini katalizyen lipaz enzimini üretme yeteneği de önemli kullanım alanlarından birisidir. Lipazlar uzun triaçilgliserol zincirlerinin tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Hidroliz sonucu sulu faz ve organik faz arasında diaçilgliserol, monoaçilgliserol, gliserol ve yağ asitleri oluşturmaktadır. Hidrolizin yanı sıra esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını da katalizler [4]. Mikrobiyal lipazlar stabilite, seçicilik ve geniş substrat spektrumu gibi özelliklerinden ötürü biyoteknolojik uygulamalar için önem taşımaktadır. Ekstraselüler bir enzim olması nedeniyle yüksek miktarlarda üretilebilmektedir Bakteri, fungi ve aktinomisetler ekstraselüler lipaz üretici mikroorganizmalardır [5].

Lipazlar keşfedildikleri tarihten bu yana deterjan, gıda ve farmasötik sanayi gibi başlıca endüstriyel kullanım alanlarına sahiptir. Geleneksel deterjanlara göre lipaz içeren deterjanlar daha az çevresel atık içermektedir. Bu deterjanlar biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan, zararlı atıkları olmayan deterjanlardır. Lipazlar ev ve endüstriyel çamaşır, bulaşık deterjanlarında yağ kalıntılarının uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır Alkalın pH'larda (pH: 8-11) çalışabilen lipazların deterjan endüstrisinde kullanım potansiyeli yüksektir. Biyoteknolojik temelli deterjanların kullanımını özellikle endüstride çok yaygındır. Çünkü spesifik temizleme gücüne sahiptirler. Düşük sıcaklıklarda kullanılabilirliği nedeniyle enerji tasarrufu da sağlamaktadır. [6]. Bakteriye lipazlar genellikle nötral ya da alkalın pH'larda optimum çalışabildiğinden bu endüstride kullanım potansiyeli yüksektir [7]. Lipaz tekstil endüstrisinde genellikle kumaşlardan haşıl yağının uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu da kumaşın boyayı emmesini kolaylaştırmaktadır [8]. Yüksek sıcaklık ve pH aralıklarında ve çeşitli substratlarda aktif olmaları nedeniyle geleceğin biyokatalistleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle yeni lipazların keşfi ve bilinen lipazların da kullanımını daha etkin hale getirme çalışmaları büyük önem kazanmıştır [9].

Bu çalışmada Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında daha önceki bir çalışma ile çeşitli toprak örneklerinden izole edilmiş toplam 156 aktinomiset izolatının lipaz aktiviteleri derin difüzyon yöntemi ile araştırılmış ve en yüksek lipaz aktivitesine sahip olan izolat dizi analizi yöntemi ile tanımlanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Aktinomiset izolatları

Lipaz üretme potansiyelleri incelenen 156 adet aktinomiset izolatı daha önceki bir çalışma kapsamında çeşitli toprak örneklerinden izole edilmiştir. -80°C'de muhafaza edilen izolatlar aktif edilmek amacıyla Nutrient Agar (NA) besiyerine ekilmiş ve 28°C'de 7-10 gün inkübe edilerek geliştirilmiştir.

2.2. İzolatların lipaz aktivitesinin belirlenmesi

NA besiyerinde geliştirilmiş olan her bir izolattan 6 mm çaplı agar delici ile agar bloklar çıkartılmıştır. Tributirin içeren Lipaz 1 besiyerine (pepton 5 g/L, maya ekstraktı 3 g/L, tributirin 10 ml/L, agar 10 g/L) iki paralel şekilde aktarılan agar bloklar 28°C'de 1 hafta inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda tributirinin lipaz enzimi ile parçalanması sonucu besiyerinde oluşan şeffaf zon ölçülmüştür [10]. Çalışmalar iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.3. Genomik DNA izolasyonu, 16S rRNA amplifikasyonu ve dizi analizi

Lipolitik aktivitesi yüksek olduğu belirlenen izolatın (47) genomik DNA izolasyonu protokol şu şekildedir: NA ortamında aktinomiset örnekleri inoküle edilmiş ve 28°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Steril santrifüj tüpündeki 200 µl TE (10 mM Tris-HCl pH:8, 1mM EDTA pH:8) tamponuna aktinomisetler aktarılmıştır. Karışıma 400 µl Solüsyon I (%1 (w/v) sarkosyl, 0,5 M NaCl, %1 (w/v) SDS) ilave edilmiş ve iyi bir şekilde karıştırılmıştır. 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiş ve her 5 dakikada bir hafifçe çalkalanmıştır. Eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve ters düz yaparak yavaş yavaş karıştırılmıştır. 10.000 g'de 5 dakika 37°C'de santrifüj edilmiş, üst faz yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 0,1 hacim 3M sodyum asetat (pH 5,2) ve 0,6 hacim soğuk isopropanol ilave edilmiştir. 4-6 kez alt üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır. 10.000 g'de 5 dakika 37 °C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. 1 ml soğuk %70'lik etanol ilave edilmiş ve 10.000 g'de 3dakika santrifüj edilerek pelet yıkanmıştır. Pelet havada kurutulduktan sonra 50 µl steril nükleaz içermeyen steril distile suda çözülmüştür [11]. Elde edilen genomik DNA %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 2).

16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyon reaksiyonu: 10X TaqBuffer (+KCl-MgCl₂) 2,5 µl; 25 mM MgCl₂ 2,5 µl; 2,5 mM dNTP mix 2,5 µl; 2,5 mM primer 9F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 2,5 µl; 2,5 mM primer 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 2,5 µl; Taq polimeraz (5 u/µl) 0,25 µl; nükleaz içermeyen steril distile su 11,75 µl; kalıp DNA 1 µl kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şartları: ilk denatürasyon; 94°C'de 3 dk, 30 döngü 94°C'de 30 s, 60°C'de 1 dk, 72°C'de 2 dk, son uzama; 72°C'de 10 dk. Elde edilen PCR ürünü %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3). Promega Wizard® SV Gel-PCR Clean-Up System saflaştırma kiti ile PCR ürünleri saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PCR ürününün dizi analizi için amplifikasyonu yapılmıştır: nükleaz içermeyen steril distile su 1,35 µl; primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ya da 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-

3') 0,65 µl; kalıp PCR ürünü 2 µl; PCR mix 6 µl. Reaksiyon şartları: 96°C'de 20 s, 50°C'de 20 s, 60°C'de 4 dk. Beckman Coulter CEQ8000 Quick Start dizi analizi kitiyle dizi analizi reaksiyonu yapılmış, Beckman Coulter Agencourt Clean SEQ ile saflaştırılmıştır. Beckman Coulter CEQ8000 kullanılarak dizi analizi yapılmıştır.

3. Bulgular

3.1. İzolatların lipaz aktivitesi

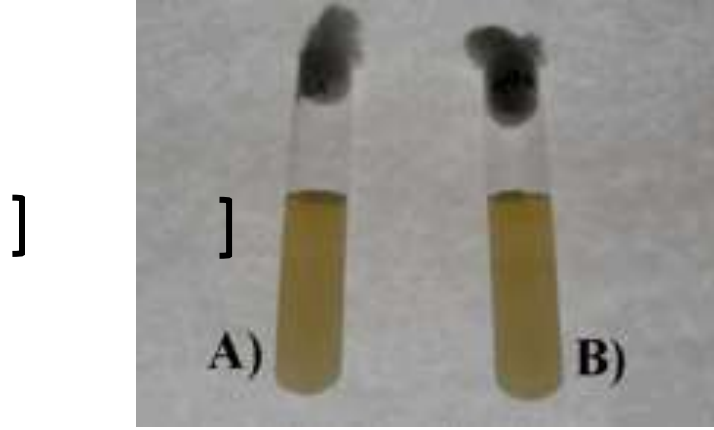
Toplam 156 adet aktinomiset izolatının lipaz üretme potansiyelleri araştırılmış ve sonuçlar Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. Şekil 1'de ise lipolitik aktivite sonucu besiyerinde oluşan şeffaf son gösterilmiştir.

Tablo 1. Elde edilen izolatların lipolitik aktiviteleri sonucu oluşturdukları şeffaf zon (mm)

İzolat no	Şeffaf zon	İzolat No	Şeffaf zon	İzolat no	Şeffaf zon	İzolat no	Şeffaf zon
2	11	56	9	120	11,5	169	10,5
3	14,5	59	12,5	123	10	170	15,5
6	10,5	60	13,5	124	7,5	171	15,5
7	8,5	62	13,5	125	8,5	172	13
8	7,5	64	15,5	126	10	173	12,5
9	13	65	10,5	127	15,5	174	20
10	11,5	66	17,5	128	17	175	15
12	10	67	13	129	13,5	176	18,5
13	12	68	13,5	130	18	177	19,5
14	12,5	69	7	131	13	178	12
15	12,5	70	9,5	132	14,5	179	11
16	14,5	71	17,5	133	17,5	180	11
18	8,5	72	16,5	134	17,5	181	8,5
19	9	73	9,5	135	10	182	15
20	10,5	74	10	136	6,5	184	8
21	7,5	75	6,5	137	6,5	185	12,5
22	10,5	76	16,5	138	10	186	6
23	7,5	77	10	139	16	187	6
24	10	78	14,5	141	14	190	11,5
25	10,5	79	20	142	19	192	11,5
26	12	80	18	146	19,5	195	8,5
35	10,5	81	19	147	10,5	196	15,5
36	10,5	85	19	148	5	204	12,5
37	13,5	86	7	149	7,5	205	11
38	14	87	15	150	15	209	18
39	17,5	89	16,5	151	10	211	17,5
40	13	91	18,5	152	7,5	212	12,5
41	14	92	14	153	17	213	18,5
42	19	93	04	154	8,5	215	14,5
43	15	94	07	158	18,5	216	5,5
44	19,5	95	9	159	13	218	16,5
45	16,5	97	16	160	5	219	4,5
46	21	98	10	161	20,5	220	3,5
47	21,5	99	4	162	13,5	221	8
51	8,5	113	13,5	163	7,5	222	20,5
52	9	114	11,5	164	12,5	229	6,5
53	17,5	116	11,5	165	4,5	243	13,5
54	6,5	117	12,5	167	14,5	244	11
55	5	118	10	168	9,5	230A	10

Tablo 2. İzolatların Lipaz 1 besiyerinde oluşturdukları şeffaf zon

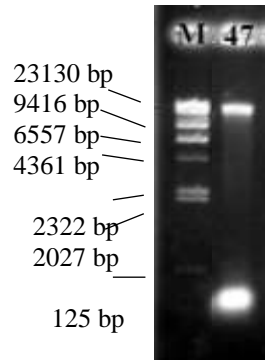
Şeffaf zon	İzolat sayısı
10 mm ve daha az	53
20 mm ve daha az	99
20 mm'den fazla	4



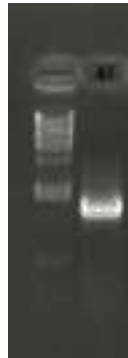
Şekil 1. 47 numaralı izolatın Lipaz 1 besiyerinde oluşturduğu şeffaf zon. A) ve B) çalışmanın paralellerini göstermektedir

3.2. Genomik DNA izolasyonu ve 16S rRNA amplifikasyonu

47 numaralı izolatın genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra %1'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil 2). Şekil 3'te 1533 bp uzunluğundaki 16S rRNA PCR ürünü gösterilmiştir.



Şekil 2. 47 numaralı izolatın genomik DNA'sının agaroz jelde görüntüsü. M: Lambda DNA/HindIII (Fermentas)



Şekil 3. 9F ve 1541R primerleri ile elde edilen PCR ürünü. Marker: Lambda DNA/HindIII (Fermentas)

4. Sonuçlar ve tartışma

Aktinomisetler sahip oldukları intraselüler ve ekstraselüler biyoaktif metabolitleri nedeniyle önemli bir bakteri grubudur. Biyoteknolojik olarak kullanılan yeni metabolitlerin keşfi için farklı kaynaklardan aktinomiset izolasyonu yapılmaktadır. Aktinomisetlerin yoğun olarak bulunduğu topraktan izolasyon çalışmaları araştırmacılar tarafından yapılmaya devam etmektedir [12,13]. Yapılan bir çalışmada çeşitli toprak örneklerinden izole ettikleri 526 aktinomisetin lipaz aktivitesini incelemiştir. *Streptomyces* cinsi mikroorganizmalar tarafından üretilen lipazlar doğal olmayan substratlar kullanılarak birkaç reaksiyonda test edilmiştir. Sonuçta *Candida rugosa*'dan elde edilen ticari lipazlardan daha iyi aktivite gösteren üç lipaz elde edilmiştir. *Streptomyces halstedii*'den elde edilen lipazın sekonder alkollerin resolüsyonunda iyi aktivite gösterdiği saptanmıştır [14]. Aktinomiset lipazları ile ilgili moleküler çalışmalarda yüksek lipaz aktivitesi gösteren lipaz geninin klonlama çalışmaları yapılmaktadır. Yüksek kopya sayılı vektör taşıyan aktinomisetlerin orijinal izolattan çok daha yüksek lipaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir [15].

Bu çalışmada farklı toprak örneklerinden daha önceki bir çalışma sonucu izole edilmiş 156 adet aktinomiset izolatının kültürel ortamda lipolitik aktivitelerinin belirlenmesi sonucu 53 izolatın (%34) 10 mm ve daha az, 99 izolatın (%63) 20 mm ve daha az, 4 izolatın ise (%3) ise 20 mm'den daha fazla şeffaf derinlik oluşturduğu tespit edilmiştir. İzolatlar arasında en yüksek lipolitik aktiviteyi 21.5 mm derinlik ile 47 numaralı izolatın gösterdiği belirlenmiştir. 47 numaralı izolatın 16S rRNA gen bölgesine göre yapılan dizi analizi sonucunda GenBank numarası EU283368.1 olan 'uncultured actinobacterium clone AS42 16S ribosomal RNA gene' e %97 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. İzolatın elde edilen 16S rRNA dizi bilgisi GenBank'a KY172825 erişim numarası ile kaydedilmiştir. Böylece GenBank kütüphanesine katkı sağlanmıştır.

İleriki çalışmalarda lipaz üretiminin optimizasyonu için çalışmalar gerçekleştirilebilir. Besiyerine eklenen farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının kullanımı, besiyerinin pH'nın değiştirilmesi, inkübasyon süresi ve sıcaklığının değiştirilmesi ile optimum şartların belirlendiği çalışmalar mevcuttur [16,17,18]. Ayrıca aktinomiset kaynaklı lipazın enzim karakterizasyonu yapılarak endüstride kullanıma potansiyeli açıklığa kavuşturulabilir.

Teşekkür

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi 1005F114 nolu Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495–548. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- [2] Boyd, R.F. (1988). General microbiology. Mosby College Pub
- [3] Demirel, R., Sariözlü Yılmaz, N., Tay, T., Kıvanç, M. (2016). Screening the antifungal activity of soilborne actinomycetes. *Biological Diversity and Conservation*, 9(2), 207-213.
- [4] Salleh, A. B., Zaliha, R. N., Rahman, R. A., Basri, M. (2006). New Lipases and Proteases. Nova Science Publishers, Inc. New York, U.S.A.
- [5] Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182–196. <http://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>
- [6] Hasan F., Shah, A. A., Javed, S., Hameed, A. (2010). Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), 4836-4844. <http://doi.org/10.5897/AJBx09.026>
- [7] Sangeetha, R., Arulpandi, I., Geetha., A. (2011). Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview. *Research Journal of Microbiology*, 6(1), 1-24. <http://doi.org/10.3923/jm.2011.1.24>
- [8] Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. (2006). Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- [9] Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–781. <http://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- [10] Ko, W.H., Wang, I. T., Ann, P. J. (2005). A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 37(3), 597– 599. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.006>
- [11] Sharma, A. D., Singh, J. (2005). A nonenzymatic method to isolate genomic DNA from bacteria and actinomycete. *Analytical Biochemistry*, 337(2), 354–356. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2004.11.029>
- [12] Ramesh, S., Mathivanan, N. (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2103–2111. <http://doi.org/10.1007/s11274-009-0113-4>
- [13] Shah, A. M., Shakeel-u-Rehman, Hussain, A., Mushtaq, S., Rather, M. A., Shah, A., Ahmad, Z., Khan I. A., Hassan, Q. P. (2017). Antimicrobial investigation of selected soil actinomycetes isolated from unexplored regions of Kashmir Himalayas, India. *Microbial Pathogenesis*, 110(2017), 93–99. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.017>

- [14] Cardenas, F., Alvarez, E., De Castro-Alvarez, M.S., Shchez-Montero, J.M., Elson, S., Sinisterra, J.V. (2001). Three New Lipases From Actinomycetes And Their Use In Organic Reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, 19(4), 315-329. <http://doi.org/10.3109/10242420109003647>
- [15] Vujaklija, D., Schröder, W., Abramić, M., Zou, P., Leščić, I., Franke, P., Pigac, J. (2002). A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. *Archives of Microbiology*, 178(2), 124–30. <http://doi.org/10.1007/s00203-002-0430-6>
- [16] Hasan, N. A., Nawahwi, M. Z., Yahya, N., Othman, N. A. (2018). Identification and optimization of lipase producing bacteria from palm oil contaminated waste. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 10(2S), 300-310. <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v10i2s.23>
- [17] Praveen Kumar, P., Sagaya Jansi, R., Saravana Kumar, P., Nimal Christhudas, I. V. S., Preetam Raj, J. P., Vijayakumar, A., Agastian, P., Ignacimuthu, S. (2017). Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. Loyola Lipase-1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12(10), 241–247. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.011>