



***ENTEROCOCCUS DURANS* İLE EKSTRASELÜLER LİPAZ ÜRETİMİ VE KAREKTERİZASYONU**

Esra Acu, Volkan Kılıç, Merih Kıvanç*

Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye.

Geliş / Received: 14.01.2021; Kabul / Accepted: 08.03.2021; Online baskı / Published online: 22.03.2021

Acu, E., Kılıç, V., Kıvanç, M. (2021). *Enterococcus durans* ile ekstraselüler lipaz üretimi ve karakterizasyonu. GIDA (2021) 46(2) 474-487 doi: 10.15237/gida. GD21020

Acu, E., Kılıç, V., Kıvanç, M. (2021). Production and characterization of extracellular lipase from *Enterococcus durans*. GIDA (2021) 46(2) 474-487 doi: 10.15237/gida. GD21020

ÖZ

Süt ve ürünlerinden izole edilen 50 laktik asit bakterisinin lipaz aktivitesi taranmıştır. E114 ve E114.11 numaralı izolatlarda yüksek aktivite görülmesi nedeniyle enzim üretimi için seçilmiştir. 16S rRNA gen bölgesine göre test bakterilerinin dizi analizi sonuçları *Enterococcus durans* olarak belirlenmiştir. Lipaz üretimi için optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Bu koşullar: Azot ve karbon kaynağı olarak %5 pepton ve %5 glikoz ile hazırlanan besi ortamının sağlanması, pH 6.5'te 48 saat 120 rpm'de çalkalama ve 40-60°C de inkübasyondur. *E. durans* izolatlarına ait enzimler en yüksek aktiviteyi pH'ı 9 olan ve %20 tuz içeren ortamda göstermiştir. Çeşitli katyonların ve yüzey aktif maddelerin etkisinin farklı olduğu saptanmıştır. Enzimler düşük ve yüksek sıcaklıklarda aktivite göstermektedir. Ayrıca 5°C de 48 saat boyunca enzim aktivitesinin stabil kalması da gıda endüstrisi için önem taşımaktadır. Özellikle et ve süt ürünleri gibi fermente ürünlerde lezzet kazandırılması amacıyla kullanılabilirliği umut vericidir.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus durans*, lipaz, enzim aktivitesi

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR LIPASE FROM *ENTEROCOCCUS DURANS*

ABSTRACT

Lipase activity of 50 lactic acid bacteria isolated from milk and milk products were screened. E114 and E114.11 isolates were chosen for enzyme production due to their high activity. Sequence analysis results of test bacteria according to 16S rRNA gene region were determined as *Enterococcus durans*. Optimum production conditions for lipase production have been determined. These conditions are: Providing a medium prepared with 5% peptone and 5% glucose as nitrogen and carbon source, shaking at 120 rpm for 48 hours at pH 6.5 and incubating at 40-60°C. Enzymes belonging to *E. durans* isolates showed the highest activity in the environment with pH 9 and containing 20% salt. It has been found that the effects of various cations and surfactants are different. Enzymes show activity at low and high temperatures. Stability of enzyme activity for 48 hours at 5°C is also important for the food industry. Its usability in fermented products such as meat and dairy products is promising.

Keywords: *Enterococcus durans*, lipase, enzyme activity

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ mkivanc@eskisehir.edu.tr

☎ (+90) 505 923 50 03

Esra Acu; ORCID no: 0000-0002-6704-3430

Volkan Kılıç; ORCID no: 0000-0003-3535-8013

Merih Kıvanç; ORCID no: 0000-0002-8647-3428

GİRİŞ

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu kolaylaştırır ve denge reaksiyonlarının hızlı şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Katalizör olarak bazı kimyasallar da görev yapmaktadır. Ancak asitler ve bazlar gibi kimyasallar, yüksek sermaye yatırımlarına, özel ekipman ve kontrol sistemlerine yol açan yüksek sıcaklık, basınç, asidik veya alkali pH gerektirmektedirler (Aravindan vd., 2007). Ayrıca istenmeyen yan ürünler oluşturabilmektedir. Bu nedenle araştırmacılar kimyasal katalizörlerin yerine kullanılabilir, spesifik, biyolojik olarak parçalanabilen, geri kazanılması kolay ve yeniden kullanılabilir biyomoleküllere yönelmişlerdir. Bu biyolojik katalizörler hem hücre dışı hem de hücre içi enzimleri içermektedir (Karigar ve Rao, 2011). Biyolojik lipaz enzimi kimyasallara göre reaksiyonda daha az yan ürün oluşturmaktadır (Treichel vd., 2010). Bu da enzimin biyoteknolojik amaçla özellikle de gıda, ilaç, deterjan, kozmetik, tekstil, kâğıt, enerji ve biyoremediasyon gibi birçok endüstri alanında daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır (Treichel vd., 2010; Adrio ve Demain, 2014). Lipaz enzimi, doğada yaygın olarak bulunan bir enzim çeşidi olup trigliseritleri serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolize eden hidrolaz enzim sınıfına aittir (Sharma vd., 2011). Ayrıca esterleştirme, trans-esterifikasyon, hidroliz, asidoliz ve aminoliz gibi farklı reaksiyonları yönetme yeteneğine de sahiptirler (Rajendran vd., 2009).

En çok mikrobiyal lipazların tercih edilme nedeni ise, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktif olmaları, geniş substrat spesifikliğinin olması, kolay özütleme ve çok fazla üretim yapabilme kabiliyetleri, kullanım alanlarının fazla olması gibi özelliklerinin bulunmasıdır (Treichel vd., 2010).

Enterococcus spp. lipolitik ve esterolitik aktiviteye sahip olup, uçucu aromatik bileşikler sentezleme özelliğine sahip olduğu için gıdalarda probiyotik ve starter kültür olarak kullanılmaktadır (Giraffa, 2003). *Enterococcus* spp. peynirlerin olgunlaştırılmasında (Franz vd., 2003), lipolitik ve proteolitik aktivitesi nedeniyle sucuk aromasının oluşmasına (Hugas vd., 2003) katkıda bulunduğu için geniş çapta kullanılmaktadır. Peynir ve sucuk gibi

ürünlerin organoleptik özelliklerini geliştirirler (Franz vd., 2003). Bu özellikleri nedeniyle biyoteknoloji endüstrisinde büyük öneme sahip bakterilerdir.

Bu çalışmada daha önce süt ve ürünlerinden izole edilen *Enterococcus* sp. izolatlarının lipaz üretim yeteneklerinin taranması, lipaz üretimi için optimum koşulların araştırılması ve enzim aktivitesine etki eden faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada, daha önceki çalışmalarda çeşitli süt ve ürünlerinden izole edilmiş toplam 50 *Enterococcus* sp. izolatı ile çalışılmıştır. Test bakterileri M17 broth'a ekilerek 37°C'de 24 saat %10 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler M17 agara ekilerek aynı koşullarda inkübe edilmiş ve oluşan kolonilerin özellikleri incelenerek morfolojik, Gram boyama yapılarak mikroskopik olarak saflıkları kontrol edilmiştir.

Lipaz aktivitesi gösteren izolatlarının seçimi

Test bakterileri arasından lipaz aktivitesi gösteren izolatları seçmek için tributrin, zeytinyağı ve Tween 80 içeren lipaz besiyerine her bir izolatın 24 saatlik taze kültüründen 50 µL ekim yapılmış ve 48 saat 37°C'de %10 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan şeffaf bölge değerlendirilmiştir (Ko vd., 2005).

Seçilen izolatların tanımlanması

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

Seçilen izolatların patojenitesinin belirlenmesi

Jelatinaz, hemolitik aktivite ve antibiyotik hassasiyet testleri yapılmıştır. Jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi Eaton ve Gasson'a (2001), antibiyotik hassasiyet testi Wayne (2010)'e göre yapılmıştır. Hemolitik aktivite kanlı agar da belirlenmiştir.

Lipaz üretimi

Seçilen bakteriler M17 agar da 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edildikten sonra tek koloni olarak M17 broth'a ekilmişlerdir. M17 broth'da gelişen kültürler 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kültürler, spektrofotometrede 600 nm de OD 1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra 10 mL olarak tüplere dağıtılan lipaz tayin ortamına (%3 yeast ekstrakt, %3 sukroz, 0.1g/l CaSO₄, 0.5g/l KH₂PO₄, 0.1g/l MgSO₄ x 7H₂O, %1 tributrin) %1 oranında kültürlerden ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat %10 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürler 4°C 9000 rpm de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant pelletten ayrılarak steril falkona aktarılmış ve lipaz aktivitesi belirlenmiştir. Aynı şekilde pellet steril falkonda -20°C'de dondurucuda saklanmış ve daha sonra lipaz aktivitesi belirlenmiştir. Bütün çalışmalar çift paralel olarak yapılmıştır.

Lipaz aktivitesinin belirlenmesi

Ekstraselüler enzim aktivitesinin belirlenmesi: Lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. p-nitrofenilpalmitat (p-NPP) substrat olarak kullanılmıştır. Lipaz aktivitesini belirlemek için 96 kuyucuklu Eliza petrisine 50 mM Tris-HCl içinde hazırlanan %0.4 tritonX ve %0.1 gum arabik içeren (pH 7) çözeltiden 135 µL, 10 ml izopropil ile hazırlanan 30 mg p-NPP ile hazırlanan çözeltiden 15 µL konulmuştur. Plaklar oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra her kuyucuğa hazırlanan süpernatantlardan 50 µL ilave edilmiştir. Hazırlanan eliza petrisi 37°C'de %10 CO₂ koşullarında 1 saat bekletildikten sonra renkteki değişim spektrofotometrede 405 nm'de okunmuştur (Arora, 2013).

İntraselüler (peletteki) Enzim Aktivitesi: Süpernatanttan ayrılan pelet 4 ml 50 mM Tris HCl

tamponda (pH 7) süspansiyon edildikten sonra buz içine yerleştirilmiş ve 30 W'da 1dakika sonikasyon uygulanmıştır. Daha sonra 4°C 9000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Pelet ayrılarak süpernatanttaki intraselüler enzim aktivitesi belirlenmiştir (Meyers vd., 1996).

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

Çevresel Faktörlerin Enzim Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Sıcaklığın etkisi

Katı besiyerinde; Lipaz katı besiyerine 5 µL kültürlerden ekim yapılmıştır. Plaklar 4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C sıcaklıklarda 48 saat inkübe edilerek bakterilerin gelişme durumu incelenmiştir.

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

Substrat sıcaklığının etkisini belirlemek için, 96 kuyucuklu Eliza petrisine 50 mM Tris-HCl içinde hazırlanan %0.4 tritonX-100 ve %0.1 gum arabik içeren (pH 7) çözeltiden 135 µL, 10 mL izopropil ile 30 mg p-NPP ile hazırlanan çözeltiden 15 µL konulmuştur. Hazırlanan Eliza petrisi 4°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C sıcaklıklarda 10 dk bekletildikten sonra her kuyucuğa hazırlanan süpernatantlardan 50 µL ilave edilmiş ve belirlenen sıcaklıklarda 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 405 nm'de değerlendirilmiştir. Bütün okumalar 4 paralel olacak şekilde yapılmıştır.

Karbon ve azot kaynaklarının etkisi

Lipaz aktivite tayin ortamına karbon kaynağı olarak, sukroz yerine %3 glikoz ve %3 laktöz kullanılmıştır. Üretilen lipaz enziminin aktivitesi belirlenerek en etkili karbon kaynağı belirlenmiştir.

Lipaz aktivite tayin ortamına azot kaynağı olarak %2 ve %5 oranlarında pepton, amonyum sülfat ve yeast ekstrakt kullanılarak üretilen enzimin aktivitesine etkisi belirlenmiştir.

pH'nin etkisi

Lipaz aktivitesine pH'nin etkisini belirlemek için lipaz tayin ortamının pH'ı 5.5, 6.5, 7.5'e ayarlanmıştır. Test bakterileri farklı pH'lardaki lipaz tayin ortamında geliştirilerek elde edilen enzimin aktivitesi belirlenmiştir.

Çalkalamanın ve inkübasyon süresinin etkisi

Lipaz aktivitesine çalkalamanın etkisini belirlemek için test bakterileri statik ve 120 rpm çalkalamalı etüvde geliştirilerek elde edilen enzimin aktivitesi belirlenmiştir.

Lipaz aktivitesine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için test bakterileri 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda elde edilen enzimin aktivitesi belirlenmiştir.

Enzim üretimi

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

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

Lipazın molekül ağırlığının belirlenmesi

Lipaz enziminin protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976).

Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılarak 590 nm'de spektrofotometrede okuma yapılarak değerlendirilmiştir.

Enzimin molekül ağırlığı Laemmli (1970) yöntemine göre SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile belirlenmiştir.

Kısmi saflaştırılmış ekstraselüler enzim aktivitesine etki eden faktörlerin belirlenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan lipaz enzimlerinin aktivitesi üzerine sıcaklığın, pH'nın, çeşitli katyon, yüzey aktif madde ve çözeltilerin etkisi belirlenmiştir.

Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi

Sıcaklığın lipaz enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için enzim 50 mM sodyum fosfat tampon (pH 7) içinde 5 °C, 20 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 55 °C ve 65°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi belirlenmiştir.

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

pH'nin enzim aktivitesi üzerine etkisi

pH 3-11 arasında hazırlanan tamponlarda enzim bekletilerek pH'nın lipaz aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir. pH 3-5 için asetik asit-sodyum asetat tampon, pH 6 için sodyum fosfat tampon, pH 7-8 için Tris-HCl tampon, pH 9 için glisin-NaOH tampon kullanılmıştır.

Enzimin pH direncini belirlemek için ependorflara farklı pH'lardaki tamponlardan 200 µL konulmuştur. Üzerine ise 200 µL enzim ilave edilerek 45°C'de 2 ve 3.5 saat inkübe edilmiştir. Kalan enzim aktivitesi belirlenmiştir.

Bazı çözeltilerin ve katyonların enzim aktivitesine etkisi

Bazı katyon, sürfektan ve çözeltilerin enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için MnCl₂, CuCl₂, MgCl₂, KCl, NiCl₂, CaCl₂, HgCl₂, ZnCl₂'ün son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde ilave

edilmiş ve enzim aktivitesi 405 nm'de spektrofotometrede belirlenmiştir. Üre, EDTA, SDS, tween 20, tween 80, tritonX-100'ün enzim aktivitesine etkisi ortama 1 µL ilave edilerek belirlenmiştir.

Tuzun enzim aktivitesine etkisi

Sodyum klorürün (NaCl) etkisini belirlemek için %0, %1, %5, %10, %15, %20, %25 (w/v) konsantrasyonlarında NaCl tampona ilave edilmiştir. Enzim aktivitesi 405 nm'de

spektrofotometrede belirlenmiştir (Esteban-Torres vd., 2015).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Seçilen İzolatların Tanımlanması

Lipaz üretimi, açısından taranan 50 izolattan E114 ve E114.11 numaralı izolatlarda elde edilen şeffaf bölge çapları daha yüksek olduğu için lipaz üretiminde bu izolatlar kullanılmak üzere seçilmiştir. 16S rRNA gen bölgesine göre dizi analizi sonuçları ile test bakterileri *E. durans* olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Test bakterilerinin 16S rRNA gen bölgesine göre tanımlanması

Table 1. Identification of test bacteria according to 16S rRNA gene region

Kod no <i>Code no</i>	Tanımlama <i>Identification</i>	Benzerlik (%) <i>Similarity (%)</i>	Erişim no <i>Accession no</i>
E114	<i>Enterococcus durans</i>	99.58	MF582823.1
E114.11	<i>Enterococcus durans</i>	99.29	MF582969.1

Ampisiline, gentamisine ciprofloksasin ve vankomisine her iki *E. durans* izolatu da dirençli olarak bulunmuştur. Jelatinaz aktivitesi ve hemoliz aktivitesi her iki *E. durans* izolatu için de negatif olarak saptanmıştır. Laktik asit bakterileri vankomisine doğal olarak dirençli olduğu, vankomisin direncinin hücre duvarının sentezi sırasında D-alanin ve D laktada vankomisin bağlanamadığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Handwerker vd., 1994). Süt ve süt ürünlerinde izole edilen enterokokların gentamisine dirençli oldukları rapor edilmiştir (Çitak vd., 2004).

Lipaz Enzimi Üretimi

Test bakterilerinin lipaz üretimleri Tween 20, Tween 80, tributrin, zeytinyağı ortamında test edilmiştir. İzolatların 11 tanesinin tributrin içeren ortamda lipaz ürettikleri saptanmıştır. Tween 80 ve zeytinyağında lipaz üretimi saptanamamıştır. Tanasupawat vd., (2015) *Lactobacillus pentosus* ve *Pediococcus lolii*in Tween 80 içeren ortamda yüksek miktarda lipaz ürettiğini bildirmişlerdir. Ramyasree ve Dutta, (2013) *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum*'un substrat olarak limon yağı, zeytinyağını ve gül yağını kullanabildiğini bildirmiştir. Tributrin gerçek yağ olup doğal yağlarda meydana gelen en basit trigliserittir. Tributrin suda kolay dispers

olduğu için bu tip çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir (Samad vd., 1989). Bu çalışmada da test ettiğimiz izolatların hiçbiri zeytinyağını hidrolize edememiştir. Sadece tributrinde aktivite göstermişlerdir. Ancak, Lopes vd., (2002) tributrinin spesifik olmadığını lipazlar ve esterazların ikisini de ayırdığını bildirmişlerdir. Bu nedenle tributrinin ilk aşamada kullanılmasının daha uygun olacağını rapor etmişlerdir.

Javed vd., (2018) bakteri lipazlarının genellikle hücre dışı olarak üretilmelerine karşın hücre içi veya membrana bağlı da olabildiklerini bildirmişlerdir. Önceki çalışmalarda da (Piatkiewicz, 1987; Meyer vd., 1996) laktik asit bakterilerinin intrasellüler lipazları da gösterilmiştir. Çalışmamızda ekstraselüler lipaz aktivitesi daha yüksek olarak saptandığı için çalışmalara ekstraselüler lipaz ile devam edilmiştir.

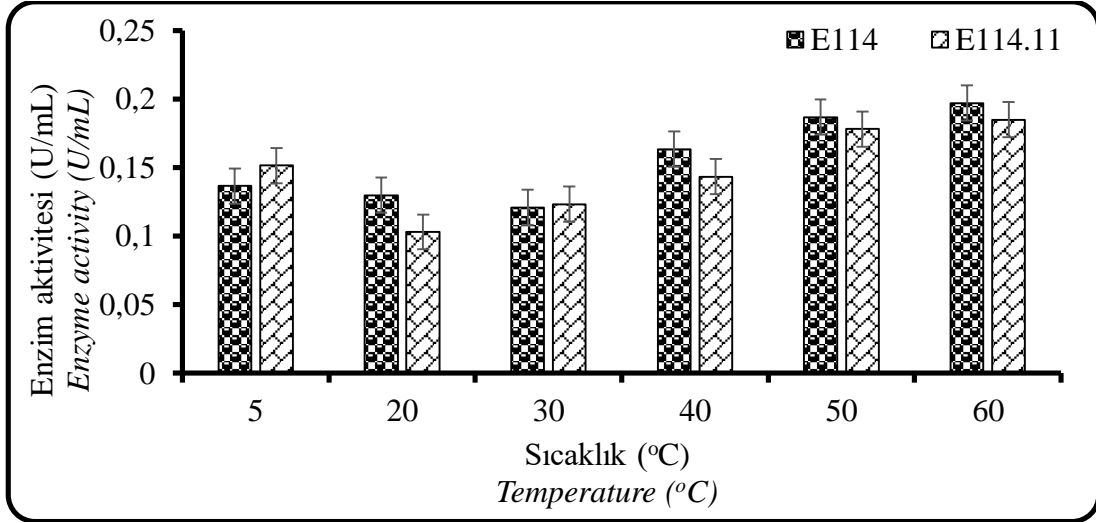
Lipaz Enzimi Üretimine Etki Eden Çevresel Faktörler

Sıcaklığın etkisi

E. durans 114 ve *E. durans* 114.11, 20- 50°C de benzer şekilde gelişmiştir. 40-60°C de gelişen kültürlerden elde edilen enzimlerin aktivitesi daha yüksek olmuştur (Şekil 1). Bakterilerin metabolik aktiviteleri düşük sıcaklıkta yavaşlamaktadır

(Amato ve Christner, 2009; Uppada ve Dutta, 2012).

Substrat sıcaklığı lipaz aktivitesini etkilemiştir. Substrat sıcaklığı 45°C olduğunda en yüksek enzim aktivitesi gerçekleşmiştir.



Şekil 1. Farklı sıcaklıklarda geliştirilen *E. durans* E114 ve E114.11'e ait ekstraselüler lipaz enziminin aktivitesi

Figure 1. Activity of extracellular lipase enzyme of *E. durans* E114 and E114.11 that were developed at different temperatures

Çalkalama ve fermantasyon süresinin etkisi

E. durans E114 ve E114.11 için optimum fermantasyon süresi 48 saat olarak saptanmıştır. En yüksek enzim aktivitesi 48 saat inkübe edilen örneklerde elde edilmiştir. Ramyasree ve Dutta, (2013) *L. lactis*, *L. brevis* ve *L. plantarum* için optimum inkübasyon süresini bulgularımızdaki gibi 48 saat olarak bildirmiştir. Lipaz aktivitesi fermantasyon süresine bağlı olarak artmıştır. Ancak aktivite belirli bir fermantasyon süresinden sonra düşmüştür. Aktivitedeki azalmanın nedeni ortamdaki besin maddelerinin azalması olabileceği gibi ortamda bakteriyel toksinlerin birikmesi de olabilir.

Çalkalamalı (120 rpm) olarak üretilen bakterilerden elde edilen enzimin aktivitesi statik olarak üretilenlerdeki enzimin aktivitesinden yüksek olmuştur.

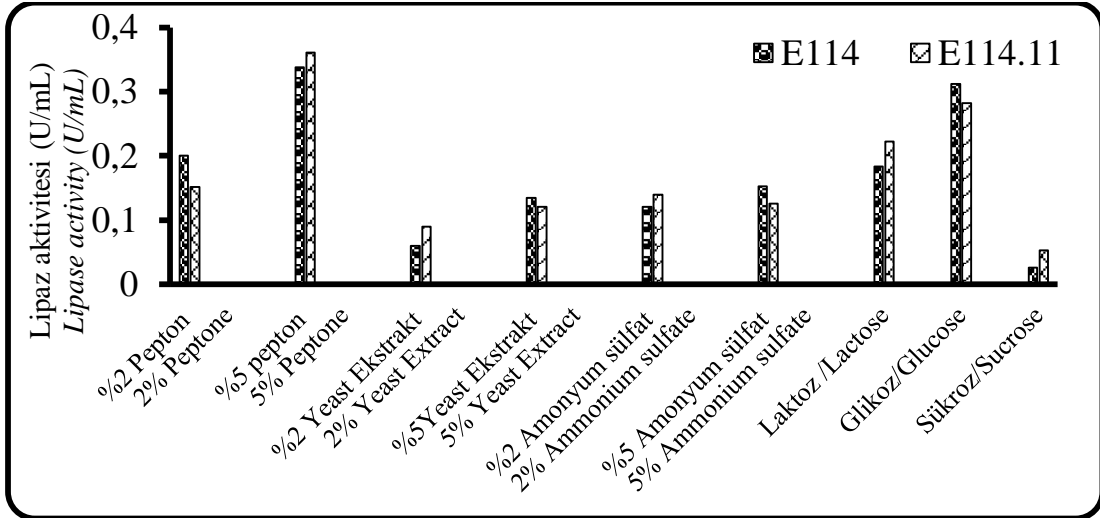
Azot ve karbon kaynaklarının etkisi

Farklı azot kaynaklarında geliştirilen test bakterilerinden elde edilen lipaz enziminin

aktivitesi değişmiştir. En etkili azot kaynağı %5 pepton olarak saptanmıştır (Şekil 2). Yeast ekstraktın ve amonyum sülfatın fazla bir etkisi olmamıştır.

Karbon kaynağı olarak besiyerine %3 oranında laktoz, glikoz ve sukroz ilave edilmiştir. Bu karbon kaynaklarında üretilen bakterilere ait enzimlerin aktivitelerine bakıldığında en yüksek aktivite glikoz kullanıldığına elde edilmiştir (Şekil 2).

Laktik asit bakterileri ile lipaz enzimi üretiminde karbon kaynağı olarak glikoz azot kaynağı olarak pepton kullanıldığında en yüksek aktivite elde edildiği birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (Bhargavi vd., 2010). Araştırmacıların bu durumun tek karbon kaynağı ve lipid indüserin bulunması durumunda elde edildiğini bildirmişlerdir. Petrovic vd., (1990) de ekstraselüler lipaz üretimi için en uygun karbon kaynağını bizim bulgularımıza benzer olarak glikoz, Sangeetha vd., (2008) azot kaynağını pepton olarak saptamışlardır.



Şekil 2. Farklı azot ve karbon kaynaklarında geliştirilen *E. durans* 114 ve 114.11'e ait ekstraselüler lipaz enzimlerinin aktivitesi.

Figure 2. Activity of extracellular lipase enzymes belonging to *E. durans* 114 and 114.11 that were developed in different nitrogen and carbon sources.

pH'nin etkisi

Farklı pH (5.5, 6.5 ve 7.5) larda geliştirilen *E. durans* izolatlarına ait lipaz enziminin aktivitesi en yüksek pH 6.5 da gelişen *E. durans* izolatlarında olmuştur. Optimum pH dan çok yüksek ve çok düşük pH üretimi önemli ölçüde etkilemektedir (Kumar ve Kanwar, 2012).

Lipaz Enziminin Moleküler Ağırlığı

E. durans izolatları için 120 rpm çalkalama hızında 48 saat inkübasyon süresi optimum olarak

belirlenmiştir. Optimum sıcaklık 45°C, pH 6.5, azot kaynağı olarak %5 pepton, karbon kaynağı glikoz olarak saptanmıştır. Yapılan benzer çalışmalarda bakterilere göre değişen koşullar saptanmıştır. Bu koşullarda üretilen *E. durans* izolatlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış ekstraselüler lipaz enzimlerinin kuru ağırlık ve protein miktarları Çizelge 2' de verilmiştir.

Çizelge 2. *E. durans* ait ekstraselüler lipaz enzimlerinin kuru ağırlık ve protein miktarları

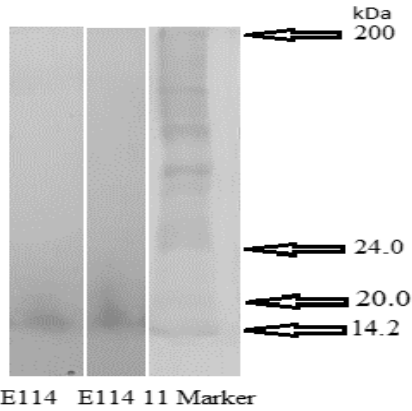
Table 2. Dry weight and protein amounts of extracellular lipase enzymes of *E. durans*

Bakterilerin kodları <i>Bacterial codes</i>	Protein miktarı (BSA mg/mL) <i>Protein content</i> (BSA mg/mL)	Kuru ağırlık (mg/mL) <i>Dry weight (mg/mL)</i>	Yaş ağırlık (mg/mL) <i>Wet weight (mg/mL)</i>
E114	0.247	0.300	0.477
E114.1 1	0.275	0.444	1.040

Kısmi saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 23 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 3). Ramakrishnan vd., (2012) Enterokok lipaz enziminin moleküler ağırlığını 22.86 kDa olarak bildirmişlerdir. Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium*'a ait saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığını 19.2 kDa olarak bulmuşlardır.

Kısmi saflaştırılmış ekstraselüler enzim aktivitesine etki eden faktörlerin belirlenmesi

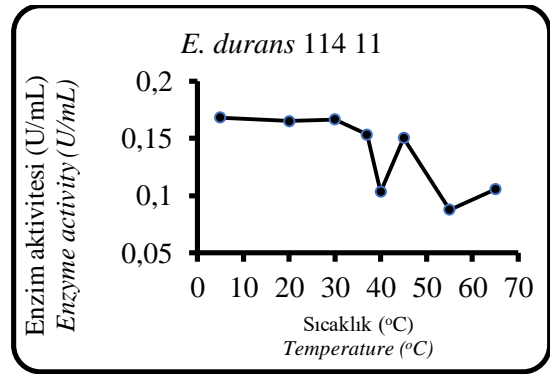
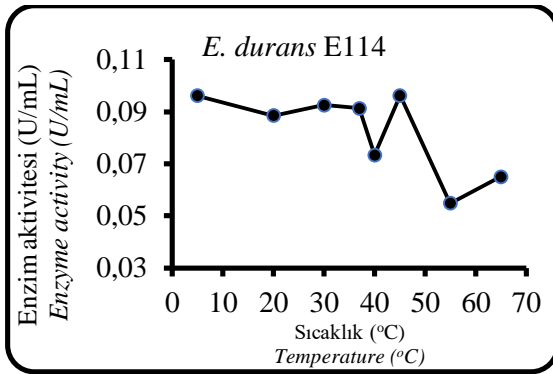
Kısmi saflaştırılmış ekstraselüler enzim aktivitesine etki eden sıcaklık, pH, çeşitli katyon ve sülfektanların etkisi belirlenmiştir.



Şekil 3. SDS-PAGE ile kısmen saflaştırılmış *E. durans*'a ait lipazın moleküler ağırlığı
Figure 3. Molecular weight of partially purified lipase of *E. durans* by SDS-PAGE

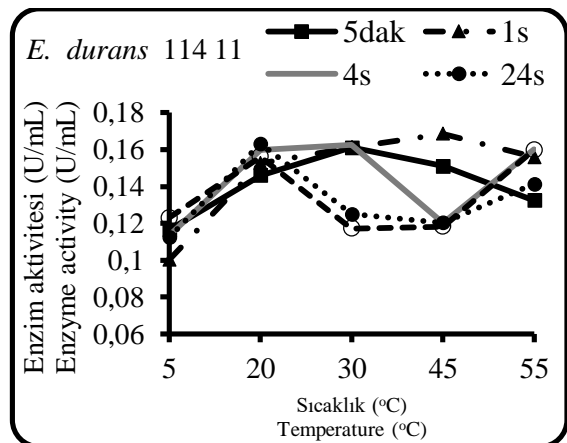
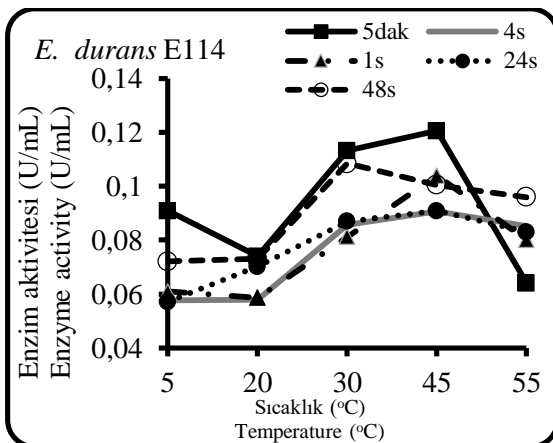
Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Kısmi saflaştırılmış ekstraselüler enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi bakterilere göre değişmiştir. *E. durans* E114 dan elde edilen kısmi saflaştırılmış ekstraselüler enzim 30-45°C de maksimum aktivite gösterirken *E. durans* E114.11'e ait ekstraselüler enzimlerin aktivitesi 30°C den daha yüksek sıcaklıklarda azalmıştır (Şekil 4). *Enterococcus faecium*'da maksimum aktivitenin 40°C'de gerçekleştiği bildirilmiştir (Ramakrishnan vd., 2016).



Şekil 4. *E. durans* izolatlarına ait kısmi saflaştırılmış ekstraselüler lipaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

Figure 4. Effect of temperature on the activity of the partially purified extracellular lipase enzyme of *E. durans* isolates.



Şekil 5. *E. durans* izolatlarına ait kısmi saflaştırılmış ekstraselüler lipaz enziminin farklı sıcaklıklarda farklı bekleme sürelerine göre sıcaklık direnci.

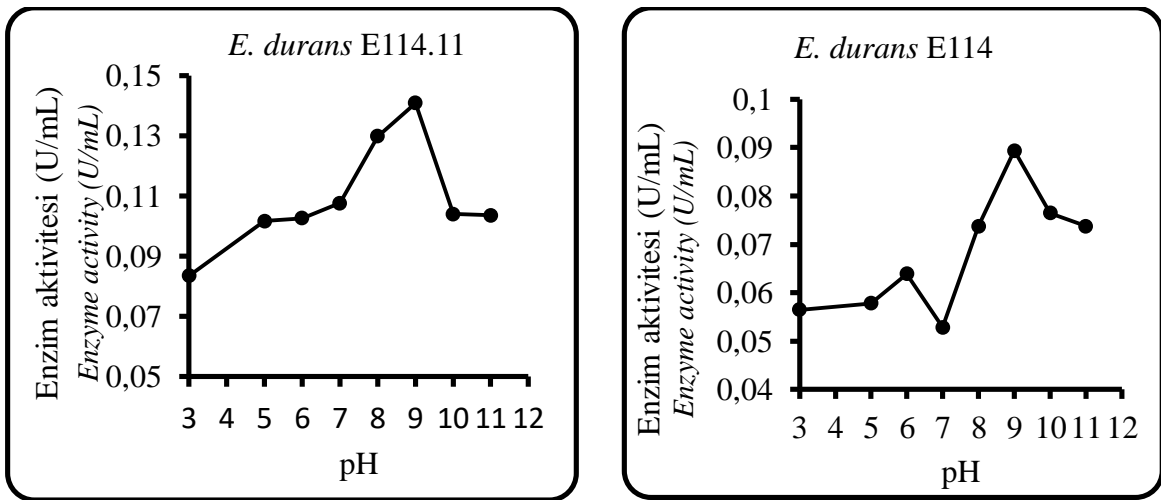
Figure 5. Temperature resistance of the partially purified extracellular lipase enzyme of *E. durans* isolates at different temperatures according to different time periods

Farklı sıcaklıklarda 5 dak, 1s, 4s, 24 ve 48s bekletilen ekstraselüler lipaz enzimlerinin sıcaklık direnci farklı olmuştur (Şekil 5). *E. durans* 114.11'a ait kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin aktivitesi 55°C de stabil kalırken *E. durans* 114'e ait ekstraselüler enzim aktivitesi düşmüştür. *E. durans* 114'e ait ekstraselüler enzim aktivitesi sıcaklıklara bağlı olarak bekleme süresince değişen oranlarda aktivite kaybı olurken *E. durans* 114.11'a ait kısmi saflaştırılmış lipaz enziminin aktivitesi 20°C de stabil kalmıştır (Şekil 5). Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium*'a ait lipaz enzimi aktivitesinin en yüksek 40°C de olduğunu aktivitenin 30-70°C de stabil olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar enzim aktivitesinin 80-100°C de stabil olduğunu 100°C den sonra enzim aktivitesinin kalmadığını bildirmişlerdir. Esteban-Torres vd., (2015) *L. plantarum*'a ait esteraz enziminin maksimum aktivitesinin 40°C de olduğunu, 5°C de enzim aktivitesinin ancak %40'ını gösterdiğini, 55°C ve 65°C de 10 saat inkübasyondan sonra ise aktivitenin %40'ının kaldığını bildirmişlerdir. Sıcaklık, enzimin şeklini değiştirerek ve moleküler hareket hızını değiştirerek enzim aktivitesini etkileyebilmektedir (Enger, 2012). Çalışmada, *E. durans* 114.11'e ait enzimin 5°C de 48 saat süresince aktivitesi stabil

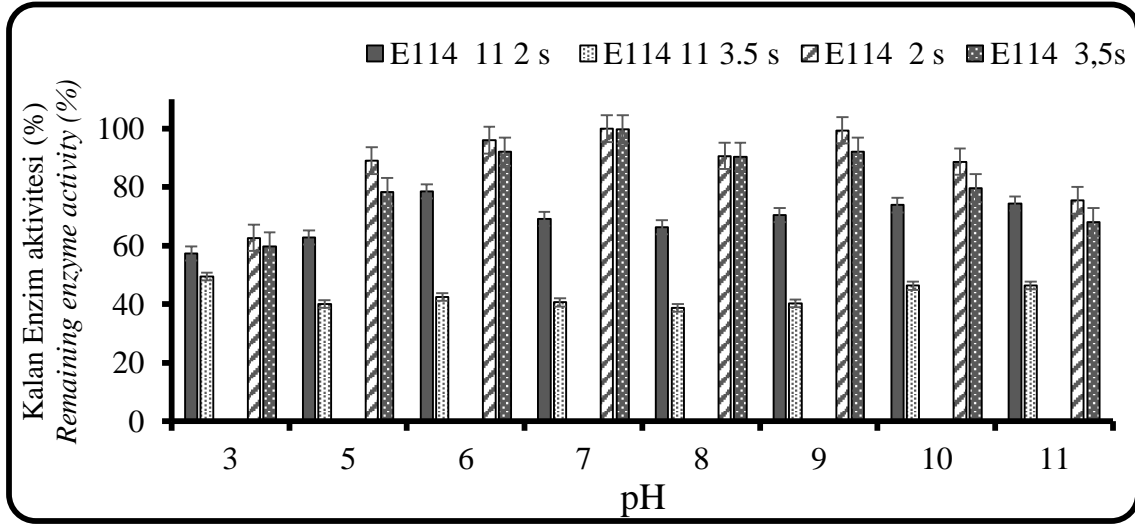
kalmıştır. Bu durum gıda endüstrisinde önem taşımaktadır. Gıdaların et ve süt ürünlerinin olgunlaşma sırasında uzun süre düşük sıcaklıkta tutulduğu göz önüne alındığında arzu edilen aromanın oluşmasında bu enzim rol oynayabilir. Peynir gibi gıdaların depolama sıcaklıklarında lipaz aktivitesi önem taşımaktadır. Çalışmamızda depolama süremiz 48 saat ile sınırlı kalmıştır. Lipaz enziminin sıcaklık stabilitesi gıda endüstrisinde önem taşımaktadır (Choo vd., 1998). Enzimler 55°C de 24 ve 48 saat inkübasyonda stabilitesini korumuştur. Yüksek sıcaklıkta (70°C) aktif bölgeler, substrata uyamayacak şekilde değişir ve bu sıcaklıkta enzim denatüre olur ve sonuçta enzim aktivitesi büyük ölçüde azalmaktadır (Toole ve Toole, 2004).

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Farklı tamponlar kullanılarak hazırlanan *E. durans* ait ekstraselüler lipaz enzim aktiviteyi asidik ve nötr pH da düşükken pH alkaliye doğru çıktıkça enzimlerin aktiviteyi artışı saptanmıştır. *E. durans*, izolatlarına ait enzim pH 9 da en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Şekil 6). Dellali vd., (2020) *E. durans* ve *E. faecium* ait lipaz için optimum pH'yı 6-9 arasında saptadıklarını bildirmişlerdir.



Şekil 6. Kısmi saflaştırılmış ekstraselüler lipaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi
Figure 6. Effect of pH on the activity of the partially purified extracellular lipase enzyme



Şekil 7. Kısmi saflaştırılmış ekstraselüler lipaz enzimi aktivitesinin pH direnci

Figure 7. pH resistance of partially purified extracellular lipase enzyme activity

Farklı pH'larda 2 ve 3.5 saat bekleme süresinde E114'e ait enzimde önemli aktivite kaybı gözlenirken *E. durans* E114.11 ait enzimin aktivite kaybı daha düşük olmuştur. Aktivite kaybı genellikle 3.5 saat bekleme süresinde daha fazla olmuştur (Şekil 7). Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium* lipazı için optimum pH'ı 10.8 olarak bildirmişlerdir. pH 7-12 arasında iken enzim aktivitesinin stabil kaldığını asidik pH da ise aktivite kaybı olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada optimum pH değerlerinden sonra aktivitede azalma görülmüştür. Araştırmacılar asidik koşullarda lipaz aktivitesindeki düşüklüğün Ca^{+2} iyonlarının kaybı ile enzimin aktif bölgesindeki koordinasyon ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Esteban-Torres vd., (2015) de *L. plantarum*'dan elde edilen esteraz enzimi için optimum pH 7 olarak bildirmişlerdir. Genel olarak, bakteriler tarafından üretilen lipazlar nötr veya alkalın pH optimumuna sahiptir. pH'daki herhangi bir değişiklik, enzimler üzerindeki elektrik yüklerinin değişmesine neden olabileceğinden enzimin üçüncül ve kuaterner yapılarını stabilize eden iyonik bağları etkileyebilmektedir. Bu durum ise enzimin üç boyutlu yapısında ve aktivitesinde değişmeye neden olarak enzim aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır (Sukohidayat vd., 2018).

Enzim aktivitesi üzerine katyon, deterjan ve yüzey aktif maddelerin etkisi

Yüzde 1 olarak ilave edilen $HgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $NiCl_2$, KCl , $ZnCl_2$, $MgCl_2$ gibi katyonların E114 ve E114.11 'den elde edilen enzimlerin aktivitesi üzerine etkisi farklı olmuştur (Çizelge 3). EDTA ve üre gibi maddeler de *E. durans* 114.11'e ait enzimde aktiviteyi artırırken *E. durans* 114'ten elde edilen enzimin aktivitesi üzerine etkili olmamıştır. Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium* MTCC5695'in optimum koşullarda üretilen enzimin aktivitesini EDTA'nın inhibe ettiğini bildirmişlerdir. $HgCl_2$ ve SDS her iki ekstraselüler enziminde aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. SDS enzimin aktif bölgesinde konformasyonel değişikliğe sebep olarak enzim yüzeyinin hidrofobikliği üzerinde değişikliklere yol açabilir. Sonuçta enzimin üçüncül yapısı bozularak enzimin inaktive olmasına neden olabilir (de Almeida vd., 2013).

Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonları, *E. durans* E114.11'den elde edilen ekstraselüler lipaz enziminin aktivitesini artırırken *E. durans* E114 den elde edilen ekstraselüler enzim aktivitesi üzerine etkili olmamıştır. Lopes vd., (2002) laktik asit bakterilerine ait lipaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'in etkili olmadığını rapor etmişlerdir. Ca^{+2} ve NaCl yağ asidi akseptörü olarak ya da ara yüzey yükünü baskılama etkisi nedeniyle ortama

ilave edilmektedir. Ayrıca Ca^{+2} iyonlarının varlığında lipaz enziminin aktivite artışına neden olan Ca^{+2} iyonları proteinin ısı ile denatürasyonunu önleyen yapıyı stabilize ederek proteaz etkisini önleyebilir (Brockerhoff ve Jensen,1974). Lopes vd., (2002) Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının laktik asit bakterilerine ait lipaz enzimlerinin aktivitesini iki üç kat artırdığını

saptamışlardır. Araştırmacılar Hg^{+2} , Cu^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının enzim aktivitesini önemli oranda inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda Cu^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının önemli bir etkisi saptanamamıştır. Ramakrishnan vd., (2016) *E. faecium*'a ait lipaz enzimi aktivitesinin Na^+ , Ca^{+2} , Li^+ ve Mg^{+2} ile arttığı buna karşılık Ba^{+2} 'in varlığında ise aktivitenin düştüğü bildirilmiştir.

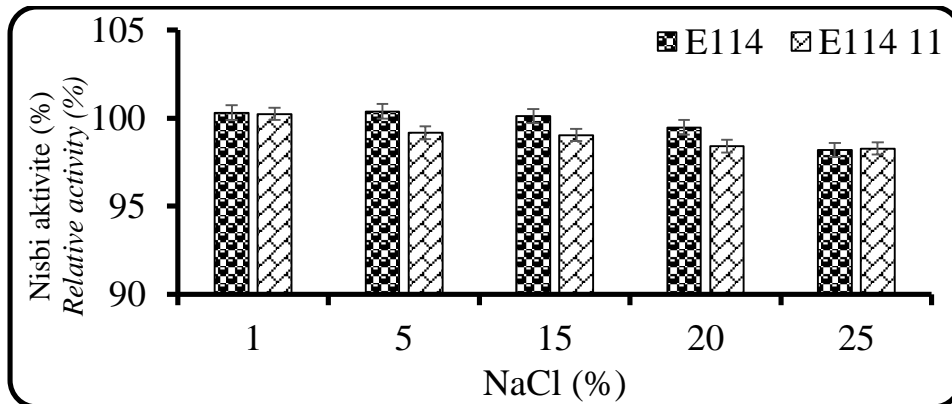
Çizelge 3. Çeşitli katyon ve yüzey aktif maddelerin lipaz aktivitesi üzerine etkisi.

Table 3. The effect of various cations and surfactants on lipase activity.

Uygulama <i>Application</i>	Kalan aktivite (%) <i>Remaining activity (%)</i>		Uygulama <i>Application</i>	Kalan aktivite (%) <i>Remaining activity (%)</i>	
	E114 11	E114		E114 11	E114
Kontrol/Control	100.0	100	EDTA	105.4	99.9
HgCl ₂	45.7	42.6	Üre /Urea	107.1	101.1
CaCl ₂	109.9	98.1	SDS	90.9	81.7
MnCl ₂	120.5	97.6	TritonX-100	102.4	98.8
CuCl ₂	119.0	97.9	Tween 20	94.0	100.5
NiCl ₂	103.1	99.5	Tween 80	104.6	99.6
KCl	106.2	98.5			
ZnCl ₂	108.0	97.4			
MgCl ₂	119.7	97.7			

Yüzey aktif maddelerden TritonX-100, Tween 20 ve Tween 80 enzimlerin aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Araştırmacılar Triton X-100 gibi iyonik olmayan surfaktanların lipaz aktivitesini indüklediğini ve enzim denatürasyonunu önlediğini bildirmişlerdir (Amid vd., 2015). Tween 80 esasen mikrobiyal lipaz üretimi için önemli bir substrattır. Çalışmada Tween 80 *E. durans* izolatlarına ait ekstrasellüler

enzimlerin aktivitesi üzerine önemli bir etkisi olmamıştır. Bulguların aksine Lopes vd., (2002) laktik asit bakterilerine ait enzimlerin aktivitesini Tween 80'in inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Sukohidayat vd., (2018) Tween 20 ve Tween 80'in enzim aktivitesini artırdığını anyonik sürfaktan SDS'in ise enzim aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.



Şekil 8. Kısmi saflaştırılmış ekstrasellüler lipaz enziminin aktivitesi üzerine tuzun etkisi

Figure 8. Effect of salt on the activity of the partially purified extracellular lipase enzyme

Enzim aktivitesine tuzun etkisi

Tuzun etkisi lipaz enzimleri üzerine farklı olmuştur. Enterokoklar ile üretilen lipaz enziminin tuza dirençli olduğu görülmüştür. Her iki *E. durans*'a ait ekstraselüler enzim halofilik özelliktedir. %20 tuz içeren ortamda en yüksek aktiviteyi göstermiştir

E. durans'a ait lipaz enzimleri %25 gibi yüksek tuz konsantrasyonunda bile aktivitesini kaybetmemiştir (Şekil 8). Bu özellikleri gıda üretiminde önemli bir özelliktir. Esteban –Torres vd., (2015) *L. plantarum*'a ait lipaz enzimini halotolerant olduğunu bildirmiştir. Süt ve et ürünlerinin fermantasyonunda tuz toleransı önem taşımaktadır. Bu fermantasyonlarda yüksek tuz konsantrasyonu vardır (Bautista-Gallego vd., 2013; Johnson vd., 2009). Peynir yapımında ve olgunlaşmasında tuz ilavesi bulunmaktadır. Ayrıca peynir salamurasına yaklaşık %20 civarında tuz ilave edilmektedir (Johnson vd., 2009).

SONUÇ

Laktik asit bakterilerinin lipaz enzimi üretimi diğer lipaz üretici bakterileri ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. Bununla birlikte, yüksek laktik asit bakteri sayısı ve aktivitesi fermente et ve süt ürünlerinde önem taşımaktadır. Et ürünlerinde olgunlaşmanın yavaş bir işlem olduğu, düşük aktivitelerin bile hayvan yağı üzerine etki etmesine izin vermesi nedeniyle önem taşımaktadır. Bu şekilde laktik asit bakterilerine ait lipazların lezzet oluşumu üzerindeki rolü nedeniyle önem taşıyabilir. Süt ürünlerinin oluşumunda tereyağı ve peynirde arzu edilen aromanın oluşmasında laktik asit bakterilerinin lipazı önemli bir rol oynayabilir. Bu özellikleri nedeniyle, bu mikroorganizmalardan izole edilen lipazların araştırılması her yıl artmaktadır (Lopes vd., 2002). *E. durans* ile üretilen lipaz enzimi 45°C de, pH 9-10 da aktivitelerinin yüksek olmasının yanında gıdaların pH 5.0-5.5 gibi asidik koşullarda da aktiviteye sahip olması, 55°C ye 48 saat gibi bir süre direnç göstermesi ayrıca düşük sıcaklıkta da aktivitesini kaybetmemesi ve halofil özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde ümit vaat etmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların makale ile ilgili başka kişiler veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

EA, araştırmanın yürütülmesi, değerlendirilmesi ve yazımında, VK lipaz enziminin belirlenmesi ve enzim aktivite çalışmalarında, MK araştırmanın planlanması, değerlendirilmesi ve yazımında görev almıştır.

KAYNAKLAR

- Adrio, J.L., Demain, A.L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1): 117-139.
- Amato, P., Christner, B.C. (2009). Energy metabolism response to low-temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 711-718.
- Amid, M., Manap, M., Hussin, M., Mustafa, S. (2015). A novel aqueous two phase system composed of surfactant and xylitol for the purification of lipase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds and recycling of phase components. *Molecules*, 20(6): 11184-11201.
- Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *Int J Biotechnol*, 6, 141-158.
- Arora, P.K. (2013). *Staphylococcus lipolyticus* sp. nov., a new cold-adapted lipase producing marine species. *Ann Microbiol*, 63(3): 913-922.
- Bautista-Gallego, J., Rantsiou, K., Garrido-Fernandez, A., Cocolin, L., Arroyo-Lopez, F.N. (2013). Salt reduction in vegetable fermentation: reality or desire?. *Food Sci*, 78(8): R1095-R1100.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., Komathi, S. (2018). Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *King Saud Univ-Sc*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.018>.
- Bhargavi, P.L., Manjushri, R., Reddy, P.N. (2010). Lipase production by lactic acid bacteria in submerged and solid state fermentation. *BT AIIJ*, 4(3): 126-129.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1-2): 248-254.

- Brockerhoff, H. and Jensen, R.G. (1974). *Lipolytic Enzymes*. Academic Press, New York, 340 p.
- Choo, D.W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., Esaki, N. (1998). A cold-adapted lipase of an alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: Gene cloning and enzyme purification and characterisation. *Appl Environ Microb*, 64 (2): 486–491.
- Çitak, S., Yucel, N., Orhan, S. (2004). Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *Int Dairy Technol*, 57(1): 27-31.
- de Almeida, A.F., Tauk-Tornisielo, S.M. and Carmona, E.C. (2013). Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. *BioMed Res Int*, ID 435818, 10.
- Dellali, A. Karam H.Z., and Karam, N-E. (2020). Lipase and esterase activities of lactic acid bacteria isolated from different biotopes *African Biotech*, 19(4): 156-164.
- Eaton, T.J. and Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67(4): 1628-1635.
- Enger, E.D., Ross, F.C. and Bailey, D.B. (2012). *Concepts in Biology*, 14th ed.; McGraw- Hill: New York, NY, USA. 707p.
- Esteban-Torres, M., Mancheno, J. M., de las Rivas, B., Munoz, R. (2015). Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT-Food Sci and Technol*, 60(1): 246-252.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H. (2003). Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *Int Food Microbiol*, 88(2-3): 105-122.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int Food Microbiol*, 88 (2-3): 215-222.
- Handwerger, S., Pucci, M.J., Volk, K.J., Liu, J., Lee, M.S. (1994). Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J Bacteriol*, 176(1): 260-264.
- Hugas, M., Garriga, M. and Aymerich, M.T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *Int Food Microbiol*, 88(2-3): 223-233.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M.H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Prog Biophys Mol Biol*, 132, 23-34.
- Johnson, M.E., Kapoor, R., McMahon, D.J., McCoy, D.R., Narasimmon, R.G. (2009). Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: Scientific and technological aspects. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 8(3): 252-268.
- Karigar, C.S. ve Rao, S.S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Res*, ID 805187, 1-11 p.
- Ko, W.H., Wang, I.T., Ann, P.J. (2005). A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biol & Biochem*, 37, 597-599.
- Kumar, A., Kanwar, S.S. (2012). Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. *Dyn. Biochem. Process Biotech Mol Biol*, 6(1): 13-27.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-885.
- Lopes, M.D.F.S., Leitao, A.L., Regalla, M., Marques, J.F., Carrondo, M.J.T., Crespo, M.T.B. (2002). Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *Int Food Microbiol*, 76 (1-2): 107- 115.
- Meyers, S.A., Cuppett, S.L. ve Hutkins, R.W. (1996). Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiol*, 13, 383–389.
- Petrovic, S.E., Skrinjar, M., Becarevic, A., Vujicic, I.F., Banka, L. (1990). Effect of various carbon

- sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotech Lett*, 12(4): 299-304.
- Piatkiewicz, A. (1987). Lipase and esterase formation by mutants of lactic acid streptococci and lactobacilli. *Milchwissenschaft*, 42(9): 561–564.
- Rajendran, A., Palanisamy, A. and Thangavelu, V. (2009). Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian Arc of Biol and Tech*, 52(1): 207-219.
- Ramyasree, S. and Dutta, J.R. (2013). The effect of process parameters in enhancement of lipase production by co-culture of lactic acid bacteria and their mutagenesis study. *Biocatal Agric Biotech*, 2, 393–398.
- Ramakrishnan, V., Balakrishnan, B., Rai, A. K., Narayan, B., Halami, P. M. (2012). Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste. *Int Aquat Res*, 4, 1- 14.
- Ramakrishnan, V., Goveas, L.C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P.M., Narayan, B. (2016). Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatal Agric Biotech*, 6, 19-27.
- Samad, M.Y.A., Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Yunus, W.M.Z., Ampton, K and Basri, M (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *J Microbiol Methods*, 9, 51-56.
- Sangeetha, R., Geetha, A. and Arulpandi, I. (2008). Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *Internet J Microbiol*, 5(2):1-8.
- Sharma, D., Sharma, B., Shukla, A.K. (2011). Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnol*, 10 (1): 23-40.
- Sukohidayat N.H.E., Zarei M., Baharin, B.S., and Manap, M.Y. (2018). Purification and Characterization of Lipase Produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 using an aqueous two-phase system (atps) composed of triton X-100 and maltitol. *Molecules*, 23, 1800.
- Tanasupawat, S., Phoottosavako, M., Keeratipibul, S. (2015). Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat. *Appl Pharm Sci*, 5 (03): 006-012.
- Toole, G. and Toole, S. (2004). *Essential AS Biology for OCR*. Nelson Thornes Ltd. United Kingdom. 280p.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M. D., Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Tech*, 3(2): 182- 196.
- Uppada, S.R., Gupta, A.K. ve Dutta, J.R. (2012). Statistical optimization of culture parameters for lipase production from *Lactococcus lactis* and its application in detergent industry. *Int Chem Tech Res*, 4(4): 1509-1517.