

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *STREPTOMYCES* TÜRLERİNİN LİPAZ İNHİBİTÖRLERİ
BAKIMINDAN TARANMASI VE FERMENTASYON
ORTAMLARININ OPTİMİZASYONU**

Tezin Sunum Tarihi: 06/09/2013

Çağla YAĞCI

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER

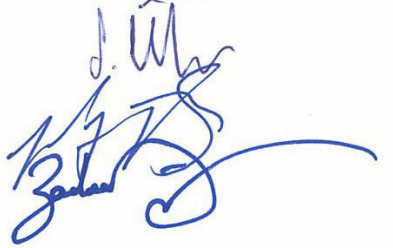
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE 2013

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *STREPTOMYCES* TÜRLERİNİN LİPAZ İNHİBİTÖRLERİ
BAKIMINDAN TARANMASI VE FERMENTASYON
ORTAMLARININ OPTİMİZASYONU**

Bu çalışma, 06/09/2013 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

| | Ünvanı, Adı, Soyadı | İmzası |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Tez Danışmanı | : Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER |  |
| Jüri Üyesi | : Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ | |
| Jüri Üyesi | : Yrd. Doç. Dr. Barbaros DİNÇER | |

ONAY

03./10./2013



Doç. Dr. Fatih YILMAZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışması Recep Tayyip ERDOĞAN Üniveritesi Biyoloji ABD'nda yapılmıştır. Bu çalışmada, yedi adet *Streptomyces* suşunun özellikle domuz pankreatik lipazına karşı inhibitör etkisi test edilmiştir. Suşlar, 13 farklı besiyerinde üretilmiş ve bu üretimle *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşu M6 besiyerinde gösterdiği aktiviteyle öne çıkmıştır.

Tez çalışmamda bilgisiyle beni destekleyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Serdar Ülker'e teşekkür ederim. Aynı ortamı paylaştığım laboratuvar arkadaşlarıma, Biyoloji ve Kimya Ana Bilim Dalı'ndan emeği geçen hocalarıma ve arkadaşlarıma ve Merkezi Araştırma Laboratuvar personelin ve arkadaşlarıma müteşekkirim. Son olarak, her daim yanımda olan ve desteğini hissettiren sevgili aileme teşekkür ederim.

Çağla YAĞCI

Eylül 2013

ÖZET

Bazı *Streptomyces* Türlerinin Lipaz İnhibitörleri Bakımından Taranması ve Fermentasyon Ortamlarının Optimizasyonu

Bu çalışmada, bazı *Streptomyces* suşlarının ürettiği sekonder metabolitlerin, domuz pankreatik lipazına karşı gösterdiği inhibitör etki incelendi. Bu amaçla *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107, *S. toxytricini* DSM40178, *S. griseus* subsp. *griseus* DSM40693, *S. rimosus* subsp. *paramomycinus* DSM41429, *S. auratus* DSM41897, *S. fradiae* DSM40063, *S. antibioticus* DSM40234 suşları Alman Kültür Koleksiyonu'ndan (DSMZ) temin edildi. Mikroorganizmalarının metaboliti üretmesi için optimum şartlar sağlandı. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde ürettiği biyomolekülün lipaz inhibisyonu sağladığı tespit edildi. Fermentasyon sıvısı etil asetat ile ekstrakte edildi. Ardından inhibisyonda etkili olan metabolit(ler) kolon kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırıldı. HPLC'de yaklaşık 12. dakikada toplanan fraksiyon orlistat ile karşılaştırmalı olarak test edildi. Test sonucunda, fraksiyonun 5 mg/mL konsantrasyonu Domuz Pankreatik Ekstraktını % 90 oranında, aynı konsantrasyonlu orlistatın ise % 99.92 oranında inhibe ettiği saptandı. Ayrıca; aynı fraksiyonun 7 mg/mL konsantrasyonunun *C. rugosa* ve *M. javanicus* lipazlarını sırasıyla % 40 ve % 59 oranında inhibe ettiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107, M6 besiyeri, pankreatik lipaz, orlistat, inhibisyon.

SUMMARY

Screening of Some *Streptomyces* Species In view of Lipase Inhibitors and Optimization of Fermentation Media

In this study, secondary metabolites produced by certain strain of *Streptomyces* genus analyzed inhibitory effects against porcine pancreatic lipase. For this purpose, *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107, *S. toxytricini* DSM40178, *S. griseus* subsp. *griseus* DSM40693, *S. rimosus* subsp. *paramomycinus* DSM41429, *S. auratus* DSM41897, *S. fradiae* DSM40063, *S. antibioticus* DSM40234 were obtained from German Culture Collection (DSMZ). It was provided optimum conditions for the microorganisms to produce the metabolite. It was detected lipase inhibition by the biomolecule(s) that was produced in M6 medium by *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107. Fermentation broth was extracted by ethyl acetate. Then the metabolite(s) that effective on inhibition were partially purified by column chromatography. Fraction that collected about 12th second at HPLC was tested in comparison with orlistat. As a result of the test, it was determined to be inhibited porcine pancreatic lipase by the concentration of 5 mg/mL extract at rate of 90%, in case of the same concentration of orlistat was 99.92%. Also the 7 mg/mL concentration of the same fraction was detected to inhibited at rate of 40% and 59% *C. rugosa* and *M. javanicus* lipases, respectively.

Keywords: *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107, M6 medium, Pancreatic lipase, orlistat, inhibition.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|---------------------------------------------------------------|-----------------|
| ÖNSÖZ..... | I |
| ÖZET..... | II |
| SUMMARY..... | III |
| İÇİNDEKİLER..... | IV |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | VII |
| TABLolar DİZİNİ..... | X |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | XI |
| 1. GENEL BİLGİLER..... | 1 |
| 1.1. Giriş..... | 1 |
| 1.2. Actinomycetales Ordosu ve <i>Streptomyces</i> Cinsi..... | 3 |
| 1.3. Lipazların Genel Özellikleri..... | 5 |
| 1.4. Sindirimle İlgili Lipazlar..... | 8 |
| 1.4.1. Hepatik Lipaz..... | 8 |
| 1.4.2. Lipoprotein Lipaz..... | 8 |
| 1.4.3. Endotel Lipaz..... | 8 |
| 1.4.4. Pankreatik Lipaz..... | 8 |
| 1.4.5. Gastrik Lipaz..... | 8 |
| 1.5. Lipaz İnhibisyonunun Önemi..... | 9 |
| 1.6. Çalışmanın Amacı..... | 10 |
| 1.7. Literatür Özeti..... | 10 |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 16 |
| 2.1. Materyal..... | 16 |
| 2.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar..... | 16 |
| 2.1.2. Kullanılan Besiyerleri..... | 16 |
| 2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Enzim..... | 17 |
| 2.2. Metod..... | 17 |
| 2.2.1. Tampon A Hazırlanışı..... | 17 |
| 2.2.2. Tampon B Hazırlanışı..... | 17 |
| 2.2.3. Florometrik Yöntem İçin Tampon Hazırlama..... | 17 |
| 2.2.4. Florometrik Yöntem İçin Substratın Hazırlanması..... | 17 |
| 2.2.5. Enzimin Hazırlanışı..... | 17 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.6. Ham Tung Yağının Saflaştırılması | 17 |
| 2.2.7. İyot/Silikajel İçerikli Boyanın Hazırlanması | 18 |
| 2.2.8. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) | 18 |
| 2.2.9. Saflaştırılan Tung Yağına Ait Spektrumun Alınması..... | 18 |
| 2.2.10. Mikroplakanın Kaplanması | 18 |
| 2.2.11. Kullanılan Enzimlerin Kalibrasyonu | 19 |
| 2.2.12. Mikroorganizmaların Rehidrasyonu ve Canlandırılması..... | 20 |
| 2.2.13. Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması | 21 |
| 2.2.14. Neubauer Lamı ile Spor Sayımı | 21 |
| 2.2.15. Prekültür Hazırlanması | 22 |
| 2.2.16. Genel Tarama | 22 |
| 2.2.17. Örnekleme İşlemi | 22 |
| 2.2.18. Lipolitik Aktivite Tayini | 22 |
| 2.2.19. İkinci Aşama Üretimi..... | 24 |
| 2.2.20. Büyük Hacimde Üretim | 24 |
| 2.2.21. Ekstraksiyon | 25 |
| 2.2.22. Biyoaktif Moleküllerin Kısmi Saflaştırılması | 25 |
| 2.2.23. Biyoaktif Molekülün Belirlenmesi | 27 |
| 2.2.24. Kısmi Saflaştırılan Metabolitin Bazı Mikrobiyal Lipazlara Karşı İnhibitör Aktivitesinin Ölçülmesi | 28 |
| 2.2.25. Florojenik Yöntem ile Lipolitik Aktivite Tayini | 28 |
| 2.2.25.1. İnkübasyon Plakasının Hazırlanışı..... | 28 |
| 2.2.25.2. Seyreltme Plakasının Hazırlanması | 28 |
| 2.2.25.3. Okuma Plakasının Hazırlanması..... | 28 |
| 2.2.25.4. Plakanın Okutulması | 28 |
| 3. BULGULAR | 29 |
| 3.1. Tung Yağının Saflaştırılması | 29 |
| 3.2. Enzim Kalibrasyonu | 29 |
| 3.3. Spor Sayım Sonuçları | 30 |
| 3.5. Genel Tarama | 31 |
| 3.5. İkinci Aşama Üretimi | 35 |
| 3.6. Büyük Hacimde Üretim | 39 |
| 3.7. Ekstraksiyon ve Kısmi Saflaştırma | 39 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.8. Kısmi Saflaştırılan Metabolitin Bazı Mikrobiyal Lipazlara Karşı İnhibitör Aktivitesinin Ölçülmesi | 45 |
| 3.8. Florojenik Yönteme İlişkin Sonuçlar | 45 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 46 |
| 4.1. Fermentasyon Ortamlarının Optimizasyonu | 46 |
| 4.2. İnhibitör Üretimi..... | 48 |
| 4.3. Ekstraksiyon..... | 52 |
| 4.4. Biyoaktif Molekülün Belirlenmesi | 53 |
| 5. ÖNERİLER..... | 55 |
| 6. KAYNAKLAR | 57 |
| ÖZGEÇMİŞ | 64 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Trigliserid molekülü | 2 |
| Şekil 2 . Aktinomiset kolonileri ve bazı <i>Streptomyces</i> cinsi koloniler..... | 3 |
| Şekil 3. Domuz pankreatik lipazının üç boyutlu yapısı..... | 6 |
| Şekil 4. Domuz pankreatik lipazının kapalı ve açık formu | 7 |
| Şekil 5. Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma | 7 |
| Şekil 6. Orlistatin moleküler yapısı. | 11 |
| Şekil 7. İzole edilen saf bileşik | 12 |
| Şekil 8. Streptolipin inhibitörünün moleküler yapısı | 13 |
| Şekil 9. Kalorpenin metaboliti. | 14 |
| Şekil 10. Mikroplaka kaplama aşamaları | 19 |
| Şekil 11. Tung yağı ile kaplı mikroplakada tung yağının hidrolizi | 19 |
| Şekil 12. Liyofilize suşların rehidrasyonu ve canlandırılması..... | 20 |
| Şekil 13. Neubauer lamı. | 21 |
| Şekil 14. Lipolitik aktivite tayini basamakları..... | 23 |
| Şekil 15. Küçük hacimden büyük hacimli üretime geçiş aşamaları..... | 24 |
| Şekil 16. Ekstraktın preperatif TLC plakasında yürütülmesi | 25 |
| Şekil 17. Preperatif TLC plakasının yürütme sonrası UV altındaki görüntüsü | 26 |
| Şekil 18. Numune yüklenmiş kolon | 26 |
| Şekil 19. Analizde kullanılan HPLC cihazı..... | 27 |
| Şekil 20. Saflaştırılan tung yağına ait spektrum | 29 |
| Şekil 21. DPE konsantrasyon, eğim grafiği..... | 29 |
| Şekil 22. <i>C. rugosa</i> lipazı konsantrasyon, eğim grafiği | 30 |
| Şekil 23. <i>M. javanicus</i> lipazı konsantrasyon, eğim grafiği..... | 30 |
| Şekil 24. <i>Streptomyces fradiae</i> DSM40063 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri | 31 |
| Şekil 25. <i>S. antibioticus</i> DSM40234 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 31 |
| Şekil 26. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun YP besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 32 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 27. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 32 |
| Şekil 28. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M7 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 32 |
| Şekil 29. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M1 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 33 |
| Şekil 30. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M65 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 33 |
| Şekil 31. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M2 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 33 |
| Şekil 32. <i>Streptomyces auratus</i> DSM41897 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 34 |
| Şekil 33. <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> DSM41107 suşunun TB besiyerinde kalan aktiviteleri | 34 |
| Şekil 34. <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> DSM41107 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri | 34 |
| Şekil 35. <i>Streptomyces auratus</i> DSM41897 suşunun YP besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 35 |
| Şekil 36. <i>Streptomyces auratus</i> DSM41897 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri. | 35 |
| Şekil 37. <i>Streptomyces antibioticus</i> DSM40234 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 35 |
| Şekil 38. <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> DSM41107 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri | 36 |
| Şekil 39. <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> DSM41107 suşunun TB besiyerinde kalan aktiviteleri | 36 |
| Şekil 40. <i>Streptomyces fradiae</i> DSM40063 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 36 |
| Şekil 41. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M1 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 37 |
| Şekil 42. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M2 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 37 |
| Şekil 43. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 37 |
| Şekil 44. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M7 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 38 |
| Şekil 45. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun M65 besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 38 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 46. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM41429 suşunun YP besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 38 |
| Şekil 47. <i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>paromomycinus</i> DSM40693 suşunun YP besiyerinde kalan aktiviteleri..... | 39 |
| Şekil 48. Preperatif TLC plakasının yürütme sonrası UV altındaki görüntüsü | 40 |
| Şekil 49. F1, F2 ve F3 bantlarının 5 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktlarının kalan aktivite grafiği..... | 40 |
| Şekil 50. Ekstraktlara ilişkin kalan aktivite grafiği..... | 40 |
| Şekil 51. <i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> DSM41107/M6 ekstraktına ait kromotogram..... | 41 |
| Şekil 52. Orlistata ait HPLC kromotogramı | 41 |
| Şekil 53. Numuneye ait MS spektrumu..... | 42 |
| Şekil 54. Orlistata ait MS spektrumu | 43 |
| Şekil 55. 10 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktların kalan aktivite değerleri *suş isimleri kısaltılarak kodlarıyla verilmiştir. | 44 |
| Şekil 56. HPLC’de yaklaşık 12.dk’da toplanan fraksiyonlara ait ekstraktın farklı konsantrasyonlarının DPE’ye karşı inhibitör aktivitesi | 44 |
| Şekil 57. HPLC’de yaklaşık 12.dk’da toplanan otlistat fraksiyonunun DPE’ye karşı inhibitör aktivitesi..... | 45 |
| Şekil 58. HPLC’de 12.dk’da toplanan fraksiyonlara ait ekstraktın (7 mg/mL) bazı mikrobiyal lipazlara karşı inhibitör aktivitesi..... | 45 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Bazı Aktinomisetlerin üretmiş olduğu biyoaktif mikrobiyal metabolit adetleri. 5 | 5 |
| Tablo 2. <i>Streptomyces</i> cinsine ait bazı suşların üretmiş olduğu lipaz inhibitörleri.....5 | 5 |
| Tablo 3. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve besiyeri bileşenleri16 | 16 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

β : Beta

Kısaltmalar

β -CD : β -siklodekstrin

μ M : Mikromolar

4-MUO : 4-Metil umbelliferil oleat

7H9 : Mycobacterium'ların üretiminde kullanılan besiyeri

BHT : Bütillenmiş Hidroksitoluen

BMI : Body Mass Index (Vücut kütle indeksi)

CFTRI : Central Food Technological Research Institute

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DPE : Domuz Pankreatik Ekstraktı

DPL : Domuz Pankreatik Lipazı

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Alman Mikroorganizma ve Kültür Koleksiyonu)

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

GAE : Gallik Asit Eşdeğeri

HL : Hepatik Lipaz

HPLC : Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi

IC₅₀ : Maksimum inhibisyonun % 50'sini oluşturan inhibitör konsantrasyonu

LB : Luria Bertani besiyeri

M1 – 7 : Çeşitli sentetik besiyerleri

M65 : *Streptomyces* üretimi için standart besiyeri

mAU : Mili Absorbance Unit

mL : Mililitre

mM : Milimolar

MS : Kütle Spektroskopisi

MTCC : Microbial Culture Collection Centre

NBD : Nitrobenzil-diazolil

ng : Nanogram

nM : Nanomolar

| | |
|------|-------------------------------------------------------------------|
| PL | : Pankreatik lipaz |
| ppm | : Milyonda bir birim |
| SB | : Superior Broth |
| TAG | : Triaçilgliserol |
| TB | : Terrific Broth besiyeri |
| THL | : Tetrahydrolipsatine (Orlistat) |
| TLC | : İnce Tabaka Kromatografisi |
| Tris | : Trishidroksimetilaminometan |
| UV | : Ultra Viyole. |
| vb. | : ve benzeri |
| vd. | : ve diğerleri |
| VLDL | : Very Low Density Lipoprotein (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein) |
| w/v | : Ağırlık/Hacim |
| WHO | : Dünya Sağlık Örgütü |
| YP | : Yeast Peptone besiyeri |
| YPD | : Yeast Peptone D-glucose besiyeri |

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, protein yapıdaki organik ve katalitik bileşiklerdir (Metin, 2008; Anonim 1992).

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar kimyasal metodlara göre daha ucuz ve de daha basittir. Enzimler başta gıda, deterjan, eczacılık, tıp, tekstil, kâğıt, deri ve kozmetik gibi birçok sanayi dalında yaygın olarak kullanılmaktadır (Jaeger vd., 1997).

Lipazlar hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen, hidrolazlar enzim grubunda yer alan proteinlerdir (Paiva vd., 2000; Balcao ve Malcata, 1998). Triaçilgliserollerin hidroliziyle, yağ asitleri ve gliserol meydana getiren lipazlar (Chen vd., 2003), lipit-su ara yüzeyinde aktif olup (Sugihara vd., 1992; Lee ve Rhee, 1993; Telefoncu, 1993; Sharma vd., 2001; Chen vd., 2003), suda çözünemeyen uzun zincirli trigliseritlere karşı aktivite gösterirler (Arpigny ve Jaeger, 1999). Lipazlar bunun dışında esterifikasyon, trans-esterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedirler (Paiva vd., 2000; Balcao ve Malcata, 1998).

Aktinomisetler grubunun önemli cinsleri (*Streptomyces* ve *Actinomyces*)'nden biri olan *Streptomyces*'in Bergey'in Mikrobiyoloji Kılavuzu kitabında beş yüzden fazla farklı türü tanımlanmıştır (URL-1).

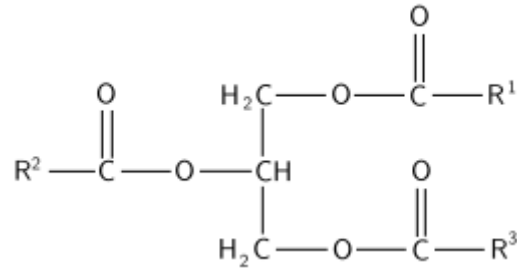
Streptomyces'ler çok sayıda sekonder metabolit üretmektedir (Antonova-Nikolova vd., 2005). Mikrobiyal sekonder metabolitler arasında, enzim inhibitörleri, antibiyotikler, pigmentler, bağışıklık sistemine etki eden bileşikler, pestisitler bulunmaktadır (Oskay, 2009).

Enzim inhibitörü, bir enzime bağlanan ve onun etkinliğini azaltan moleküldür (URL-2).

Enzime bir inhibitörün bağlanması, bir substratın enzimin aktif bölgesine girmesini durdurabilir ve/veya enzimin kataliz yapmasını engelleyebilir. İnhibitör bağlanması tersinir veya tersinmez olabilir. Tersinir olmayan inhibitörler genelde enzim ile reaksiyona girip onu kimyasal olarak değiştirir. Bu inhibitörler enzimin aktivitesi için esas olan aminoasit kalıntılarını değişime uğratırlar. Buna karşın, tersinir inhibitörler non-kovalent olarak bağlanır ve inhibitörün enzime mi, enzim-substrat

kompleksine mi, yoksa ikisine birden mi bağılı olmasına bağılı olarak, farklı tip inhibisyonlar meydana gelir (URL-2).

Batı toplumlarında tüketilen ortalama bir diyetin içindeki yağ oranı yaklaşık % 40'tır. Yağlı bir diyetteki 50-120 g lipidin % 95'inden fazlası uzun zincirli yağ asitlerinden (trigliserid) oluşmaktadır. Bunların sindiriminde lipazlar rol alır. Bağırsak lümeninde, trigliserid molekülleri (Şekil 1), gastrik ve pankreatik lipazlar tarafından hidrolize edilerek, iki molekül yağ asidi ve bir molekül monogliserid açığa çıkarak emilebilir hale gelmektedir (Tanakol, 2003).



Şekil 1 . Trigliserid molekülü (URL-3)

Lipidlerin sindirimi ve emiliminden sonra, ince bağırsak mukoza hücresinde 2-monogliseridlerden ekzojen trigliseridler oluşur. Bu ekzojen trigliseridler, az miktarda serbest kolesterol, kolesterol esteri ve fosfolipid ile bir araya gelirler, bir protein tabakasıyla da kaplanarak suda çözünebilir ve taşınabilir şilomikronları oluştururlar. Şilomikronlar, lenf sistemi yoluyla dolaşıma katılırlar (URL-4). Lipid sindiriminden sorumlu lipaz enziminin inhibisyonu ile diyetle vücuda giren yağlar metabolize edilemediğinden (monoaçilgliserollerin ve serbest yağ asitlerinin oluşumu önlenmiş olduğundan), diyetteki yağın emilimi dolaylı olarak engellenmiş olur (Guerciolini, 1997).

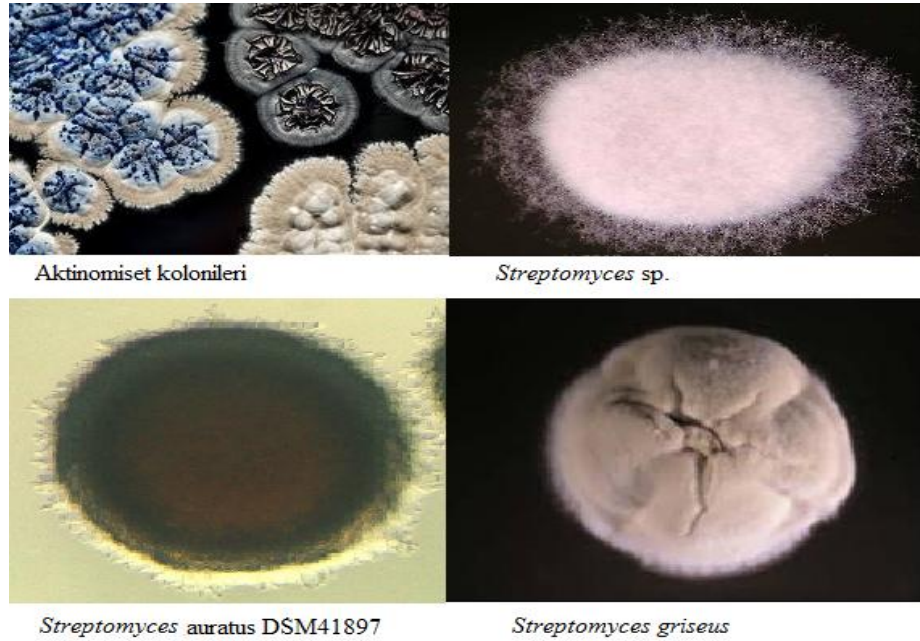
Fazla kiloluluk ve obezite, sağlık için bir risk olan anormal veya aşırı yağ birikmesi olarak tanımlanır. Fazla kilo ve obezite, şeker hastalığı, kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi bir dizi kronik hastalık için önemli risk faktörüdür (WHO, 2013). Obezitenin bütün ölümcül risklerine karşılık, kilo kaybına yönelik geleneksel girişimler özellikle uzun vadede etkisiz kalmaktadır (Faich, 1996). Diyet önerileri ve psikolojik tedavilerle genellikle hedeflenen sonuçlara ulaşılamamaktadır. Obezite gelişiminde yağların oynadığı santral rol dikkate alınarak, vücutta yağların metabolize edilmesinin önüne geçmek gerekmektedir (Tanakol, 2003).

Bu sebeple diyetteki yağın bağırsakta emilimini önleyen ilaçların, obezitenin uzun dönem tedavisinde yardımcı olmaları beklenmektedir. Dolayısıyla obezitenin önlenmesi için pankreatik lipaz inhibisyonu, önemli bir strateji olabilmektedir (Tanakol, 2003; Sergent, 2012).

1.2. Actinomycetales Ordosu ve *Streptomyces* Cinsi

Aktinomisetler ya bölünme ya spor ya da konidi oluşturarak üreyen hücre içi dallanma gösteren organizma grubudur. Ekolojik açıdan bakterilerle mantarlar arasında bir ara formda bulunurlar (Kilaru, 2005).

Aktinomisetler, yakinen gerçek bakterilerle ilişkilendirilirler ve sıklıkla, yüksek filamentli bakteri olarak ele alınırlar. Bakteriler gibi tek hücrelidirler ve hücre duvarları bakteri hücre duvarında olduğu gibi peptidoglikan tabaya sahiptir. Funguslarda ise hücre duvarı, selüloz ve pektin içermektedir. Aktinomisetlerdeki belirgin mantar özelliği ise morfolojik olarak gerçek dallanan flamente (Şekil 2) sahip olmalarından ileri gelmektedir. Buna ek olarak sporangia ve hareketli spor oluşturmaları da funguslarla güçlü paralellik gösterir. Ancak misel çapı ve spor boyutu funguslarla kıyaslandığında daha küçüktür (Kilaru, 2005; Waksman, 1957).



Şekil 2. Aktinomiset kolonileri ve bazı *Streptomyces* cinsi koloniler (URL-5).

Aktinomisetlerin çoğu aerobiktir gelişmeleri için en uygun pH aralığı 6-8'dir. Aktinomisetler, antibiyotik üretme yetenekleri ile ilgiyi üzerlerine çekmiştir (Ergene, 1987). Gruba ait önemli cinsler, *Streptomyces* ve *Actinomyces*' lerdir (URL-1).

Bergey'in Mikrobiyoloji Kılavuzu'nda 500'ün üzerinde *Streptomyces* türü organizma tanımlanmıştır (URL-1).

Streptomyces'ler, çok sayıda sekonder metabolitin üreticisi olarak bilinmektedirler (Antonova-Nikolova vd., 2005). Sekonder metabolitler, düşük molekül ağırlıklı (~3000 daltonun altında), taksonomik olarak farklılık arzeden, organizmaya özgü doğal ürünler olarak tanımlanır (Vining, 1990). Sekonder metabolitler, enzim inhibitörleri, antibiyotikler, bağışıklık sistemini etkileyen bileşikler, pigmentler, pestisitler vb. bileşiklerdir (Oskay, 2009).

Streptomyces'ler, sekonder metabolitleri kendi doğal ortamlarında, özellikle toprakta, morfolojik değişimlerle beraber üretmektedirler (Vining, 1990). Sekonder metabolitlerin üretim mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, metabolit üretiminin sporulasyona bağlı olduğu ve paralelinde metabolitlerin üretildiği düşünülmektedir (Williams vd., 1989; Wendisch ve Kutzner 1991). Üretim, ortamdaki besin miktarına ve çeşidine göre değişmektedir (Aharonowitz ve Demain, 1978). Hücre içindeki üretimleri ise, genelde DNA üzerindeki bir grup gen tarafından, nadiren plasmid DNA üzerindeki genler tarafından kontrol edilir. Bu genler, plazmitlere aktarılıp, gen transferiyle sekonder metabolitler üretilebilmektedir (Egan vd., 1998; Omura vd., 2001). Primer metabolizmanın aksine sekonder metabolizmayı yönlendiren biyokimyasal yol izleri tam olarak anlaşılamamıştır (Demain, 1998).

Streptomyces'ler, antibiyotik ve diğer önemli sekonder metabolitlerin ana kaynağıdır (Berdy, 1986; Cross, 1982). Doğadaki antibiyotiklerin yaklaşık % 80'ini Aktinomisetler ve bunun yaklaşık % 70'ini de *Streptomyces*'ler üretmektedir (Korcan, 1995). *Streptomyces*'ler, olumsuz çevre koşullarından korunmak için morfolojik ve fizyolojik olarak farklılaşırlar ve çeşitli yararlı madde, sekonder metabolit, antibakteriyal, antiviral, antifungal ve antitümör vb. antibiyotik etkili bileşikler sentezlerler (Thompson vd., 1999; Kilaru, 2005).

Tablo 2'de bazı Aktinomiset grubu bakteriler tarafından üretilen biyoaktif mikrobiyal metabolit adetleri ve Tablo 3'te üretilen enzim inhibitörleri verilmiştir.

Tablo 1. Bazı Aktinomisetlerin üretmiş olduğu biyoaktif mikrobiyal metabolit adetleri (Berdy, 1986).

| Cins adı | Metabolit adedi | Cins adı | Metabolit adedi |
|----------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>Streptomyces</i> | ~ 8000 | <i>Saccharothrix</i> | 68 |
| <i>Micromonospora</i> | 740 | <i>Microbiospora</i> | 54 |
| <i>Nocardia</i> | 357 | <i>Actinosynnema</i> | 51 |
| <i>Actinomadura</i> | 345 | <i>Mycobacterium</i> | 57 |
| <i>Streptoverticillium</i> | 258 | <i>Saccharopolyspora</i> | 131 |
| <i>Actinoplanes</i> | 248 | <i>Dactylosporangium</i> | 58 |
| <i>Chainia</i> | 30 | <i>Nocardiopsis</i> | 41 |
| <i>Actinosynnema</i> | 51 | <i>Microtetraspora</i> | 26 |
| <i>Microellobosporia</i> | 11 | <i>Thermomonospora</i> | 19 |

Tablo 2. *Streptomyces* cinsine ait bazı suşların üretmiş olduğu lipaz inhibitörleri (Birari ve Bhutani, 2007).

| Organizma adı | İnhibitör |
|----------------------------------------------|------------------|
| <i>Streptomyces toxytricini</i> NRRL 15443 | Lipsatin |
| <i>Streptomyces</i> sp. NR 0619 | Panklisin |
| <i>Streptomyces albolongus</i> MG147-CF2 | Valilakton |
| <i>Streptomyces lavendulae</i> strain MD4-C1 | Esterastin |
| <i>Streptomyces</i> sp. MG7-G1 | Ebelakton(lar) |
| <i>Streptomyces vayuensis</i> N2 | Streptolipin |

Streptomyces'ler bunun dışında B grubu kompleks vitaminlerinden bazılarını (niasin, pentatonik asit, biotin, pridoksin, tiamin, riboflavin), çeşitli enzimleri (kitinaz gibi) üretme yeteneğine sahiptir. Kitinaz üreten türler antifungal etkiye sahiptir (Hall vd., 1953; Boucher vd., 1992).

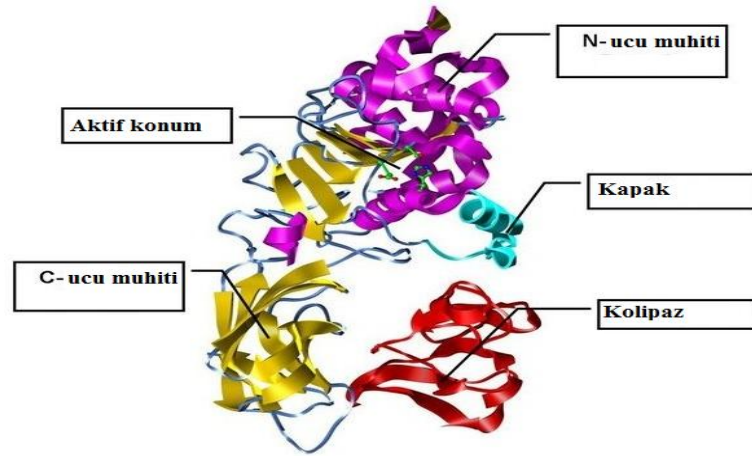
1.3. Lipazların Genel Özellikleri

Lipazlar, doğal substratları uzun zincirli yağ asidi triaçilgliserollerini olan ve esterlerin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar, enzim sınıflandırmasında 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. Lipitlerin

hidrolizinde yüksek regio ve enantioselektif aktiviteye sahip olmaları nedeniyle önemlidirler (Saraç vd., 2008).

Lipazlar genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır (Şekil 3). Bunlardan N- kısmı, katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan hidrofobik bir tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır (Akoh ve Min, 1998).

Bu gruptaki enzimlerin farklı seviyelerdeki benzerliklerinin dışında bir pentapeptit (Glisin-X-Serin-X-Glisin) sıralaması sıkça gözlenmiştir, Bu serin amino asidinin yapıda korunması ve bunun değişime uğraması veya yer değiştirmesi ile katalitik aktivitenin yitilmesi bu amino asidin kataliz için çok önemli ve gerekli olduğunu göstermiştir. Bunun topografik yerleşimi de korunmuş ve belirgindir, protein zincirinin gergin bir bölümünün en üstünde bulunmaktadır (Petersen vd., 2001).

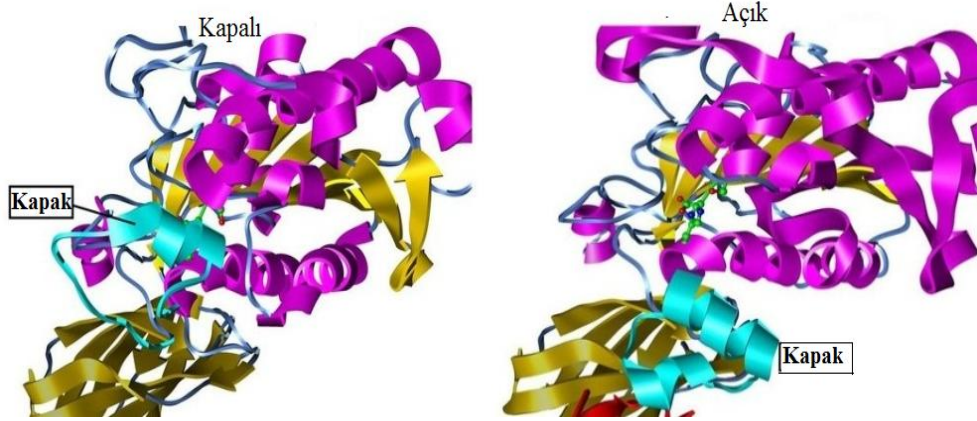


Şekil 3. Domuz pankreatik lipazının üç boyutlu yapısı (URL-6).

1990 yılında lipaz enziminin üç boyutlu yapısının (Şekil 4) ilk kez ortaya konmasından sonra, ara yüzey aktivasyonu olayının, çözelti içindeki enzimin aktif merkezini çevreleyen amfifilik peptidik yapıdaki kapak benzeri bir yapıdan kaynaklandığı düşünülmektedir (Verger, 1997). Kapağın üç boyutlu yapısı Şekil 4’de gösterilmiştir.

Lipazların büyük bir çoğunluğu aktif bölgelerini örten bir helikal segmente (kapak) sahiptir (Şekil 4). Lipid kümelerinin varlığında bu kapak açılır ve yüzeyler arası aktivasyon gerçekleşir. Sulu ortamda lipazlar için baskın konformasyon kapalı formdur (Şekil 4). Aktif bölge, kapak yapısını oluşturan bir ya da daha fazla “loop” tarafından çözücüden korunmuştur. Kapağın dış kısmı hidrofildir. Bu konformasyon elektrostatik etkileşimler aracılığıyla kararlı kılınmıştır. Bir su-yağ emülsiyonunda kapağın açılması,

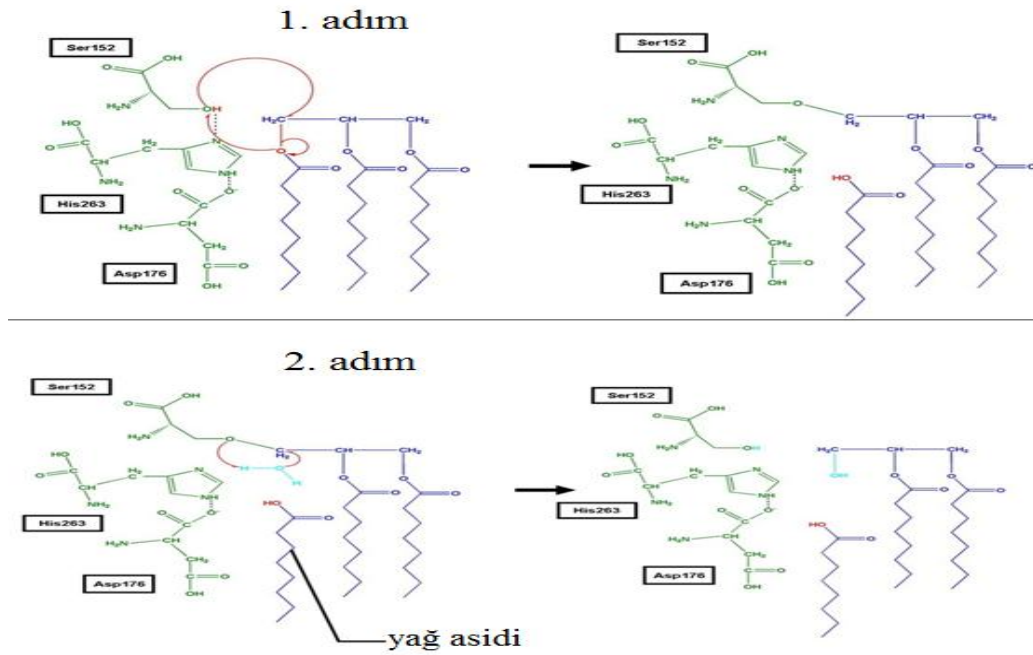
substratların aktif bölgeye girişine izin verir (açık konformasyon). Kapağın açılmasıyla, nükleofilik serin artığı büyük hidrofobik yüzeyler ile etkileşir ve lipaz enziminin aktif forma geçmesi sağlanır (Jaeger ve Reetz, 1998).



Şekil 4. Domuz pankreatik lipazının kapalı ve açık formu (URL-6).

Enzimin katalitik merkezinde serin amino asidi, ilave olarak histidin ve başka bir amino asit (Asp veya Glu) bulunur (Petersen vd., 2001).

Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma, aktif merkezde bulunan serin aminoasidi üzerinde yoğunlaşmıştır. Aktif merkezdeki serin açil esterinin bir su molekülü ile tepkimeye girdiği, daha sonra açil enzimin bölündüğü ve yağ asidinin ayrıldığı tahmin edilmektedir (Şekil 5). Katalitik prosesin bu aşamasında ürünün aktif merkezden ayrılması özellikle önem taşımaktadır (Petersen vd., 2001).



Şekil 5. Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma (URL-6).

1.4. Memeli Lipazları

1.4.1. Hepatik Lipaz

Plazma lipit düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynar. Hepatik lipaz (HL) trigliserit ve fosfolipitleri hidroliz eder. Kolesterolün karaciğerden dokulara taşınmasında rol oynar. Heparinle salınımı artar (Mukherjee, 2003).

1.4.2. Lipoprotein Lipaz

Kilomikron ve VLDL lipoproteinlerindeki trigliseritleri bir monoasilgliserol molekülü ve serbest yağ asitlerine hidrolizleyen, lipaz türü bir enzimdir. Reaksiyon için kofaktöre (Apo CII) ihtiyaç duyar. Reaksiyon ürünleri dokunun kullanımına yarar. Enzim reaksiyonu sonucu oluşan yağ asitleri hücreye girdikten sonra ya yakılırlar ya da depo cisminde tekrar trigliserite dönüştürülürler (Mukherjee, 2003).

1.4.3. Endotel Lipaz

Endotel lipazının başlıca fosfolipaz aktivitesi vardır, trigliserit hidroliz aktivitesi göreceli olarak daha azdır (Mukherjee, 2003).

1.4.4. Pankreatik Lipaz

Pankreasın duktal hücreleri tarafından salgılanır ve diyetsel yağın intestinal lümende sindiriminde anahtar rol üstlenir. Toplam diyetsel yağın % 50-70'inin sindiriminden sorumlu enzimdir. Bu enzim anti-obezite etkili ajanların potansiyel etkinliğinin belirlenmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Mukherjee, 2003; De La Garza vd., 2011; Sugiyama vd., 2007).

Kofaktör olarak kolipaz ve safra asitlerini kullanır. Kolipaz, misellerin iç yüzüne bağlanır ve lipazın yüksek affinite ile bağlanabileceği bir yer oluşturur, lipazı yağ-su ara yüzeyinde tutar, enzimin açık pozisyonda durmasının sağlar ve lipazın dayanıklılığını artırır (Mukherjee, 2003).

Trigliseritlerin hidrolizi sonucunda açığa 2-monoasilgliserol ve yağ asitleri çıkmaktadır. Trigliserit hidroliz ürünleri, ince bağırsak tarafından emilir, epitel hücrelerinde başka enzimler tarafından tekrar trigliserite dönüştürülür sonra da vücuda dağıtılmak üzere, şilomikronlar içinde lenf sistemine salgılanırlar (Mukherjee, 2003).

1.4.5. Gastrik Lipaz

Gastrik lipaz, midede salgılanan, kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin sindirimi ile ilişkili bir enzimdir ve enzim, mide asitliğinde aktivite göstermektedir.

1.5. Lipaz İnhibisyonunun Önemi

Lipazlar, lipid metabolizmasında önemli fizyolojik görevler üstlenmektedir. Yağlı bir diyetle 50-120 g lipid bulunur ve bunun % 95'inden fazlası uzun zincirli yağ asitlerinden (trigliseritler) oluşmaktadır. Uzun zincirli yağ asitlerinin sindiriminde lipazlar rol alır. Bağırsak lümeninde trigliserid molekülleri gastrik ve pankreatik lipazlar tarafından hidrolize edilerek, iki molekül yağ asidi ve bir molekül monogliserid açığa çıkmaktadır (Tanakol, 2003).

Obezite, alınan enerji ile harcanan enerji arasındaki dengesizliğin sonucu olarak vücutta aşırı yağ oluşumudur. Obezite, kalp-damar hastalıkları, Tip-II diyabet, hipertansiyon, felç, ruh sağlığı bozuklukları ve bazı kanser formları gibi kronik hastalıklar için bir risk faktörü olarak dünya çapında büyüyen bir sağlık sorunudur. Genetik yatkınlık yanında yüksek kalorili ve bol yağlı yiyecek tüketimi ile yetersiz fiziksel aktivite gibi çevresel faktörler obezitenin ana nedeni olarak kabul edilmektedir. (Colagiuri, 2010; Robinson ve Niswender, 2009).

Dünya Sağlık Örgütü 2006 verilerine göre, dünyada 400 milyon üzerinde 'obez' ve 1.6 milyar 'aşırı kilolu' bireyin bulunduğu, 2015 yılında bu oranın 700 milyon 'obez' ve 2.3 milyar 'aşırı kilolu' bireylere ulaşacağı düşünülmektedir (WHO, 2006).

Günümüzde dünyanın hemen hemen tüm bölgelerinde obezite prevalansı artmakta, bu durum sadece yetişkin kadın ve erkekleri değil, çocukları ve gençleri de etkilemektedir. Obezite, doğrudan ve dolaylı olarak neden olduğu hastalıkların yanında ülke ekonomilerine olumsuz yönde etki eden bir unsur olarak da karşımıza çıkmaktadır (WHO, 2006).

Obezite ile ilgili sağlık harcamaları gelişmiş ülkelerde tüm sağlık harcamalarının % 2-7'sini oluşturmaktadır (WHO, 2000). Amerika Birleşik Devletlerinde obezitenin doğrudan maliyetinin hastalığın tanı ve tedavisi ile ilgili olan harcamaların, sağlık harcamalarının % 7'sini (yaklaşık 70 milyar dolar), Fransa ve Avustralya'da sağlık harcamalarının % 2'sini ve Hollanda'da ise % 4'ünü oluşturduğu bildirilmektedir (Field vd., 2003).

PL, diyetle alınan trigliseridlerinin % 50-70'inin bağırsaklarda emilebilen monogliseridler ve serbest yağ asitlerine sindiriminden sorumlu olan en önemli enzimdir. PL inhibisyonu, düşük yağ emilimine yol açmaktadır ve bu nedenle enerji alımı azalmaktadır ki bu da obezite için anahtar hedeflerden birisidir (Chakrabarti, 2009). Bu sebeple diyetdeki yağın bağırsakta emilimini önleyen ilaçların, obezitenin

uzun dönem tedavisinde yardımcı olmaları beklenmektedir (Tanako1, 2003). Dolayısıyla obezitenin önlenmesi için PL inhibisyonu, önemli bir strateji olabilmektedir (Sergent, 2012).

Ayrıca mikrobiyal lipazlara yönelik inhibisyon da büyük öneme sahiptir. Çünkü *Mycobacterium tuberculosis* gibi patojen bakterilerin enfeksiyonu sırasında, bakterinin gelişimini sağlayan lipidlerin karbon kaynağı olarak kullanılmalarında lipazların görev aldığı sanılmaktadır (Daniel vd., 2004; Deb vd., 2006; Côtés vd., 2007). Konak hücre lipidlerinin gelişim için kullanılması tüberküloz etkeni *M. tuberculosis*'in hayat devrinde önemli bir rol oynamaktadır (Delorme vd., 2012).

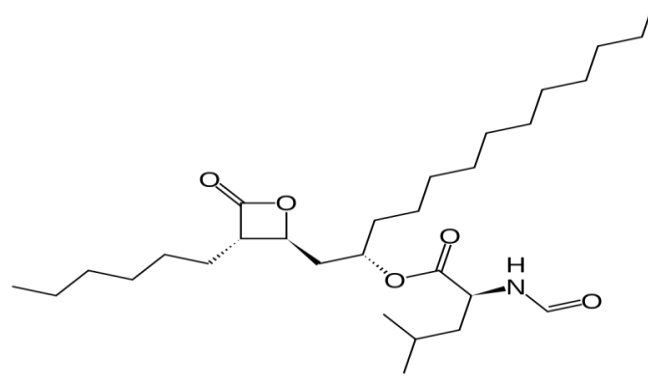
1.6. Çalışmanın Amacı

Çalışmamız obezite ve obeziteye bağlı hastalıkların dolaylı olarak tedavisinde, kullanılan zayıflama ilaçlarının etkili maddesi orlistata alternatif inhibitör(ler) belirlemeyi amaçlamıştır Bu amaçla Alman Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen yedi adet *Streptomyces* cinsi suşun fermentasyon ortamları optimize edilerek inhibitör etkili metabolit üretimi için gerekli çalışmalar yapılmıştır.

1.7. Literatür Özeti

İzole edilen mikrobiyal kaynaklı ilk lipaz inhibitörü lipsatindir. *Streptomyces toxytricini* NRRL 15443, spesifik bir pankreatik lipaz inhibitörü olan lipstatinin üreticisi olarak saptanmıştır. Lipsatin, hücrenin özellikle misellerinden izole edilmiştir. Saflaştırma işlemleri ile soluk sarı renkli, yağa benzer saf lipstatin elde edilmiştir. Lipsatin, $C_{29}H_{49}NO_5$ formülüne ve 495.713 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Lipsatin molekülü, hidrokarbon omurgasına katılmış bir β -lakton yapısına ve N-formil-L-lösin yan zincirine sahiptir (Şekil 2). Lipsatin, geri dönüşümsüz pankreatik lipaz inhibisyonu göstermekte (IC_{50} 0.14 μ M) ve farelerde diyetle alınan triolein absorpsiyonunu doz bağımlı olarak inhibe etmektedir (Birari ve Bhutani, 2007).

Orlistat (Şekil 6), *Streptomyces toxytricini* NRRL 15443 tarafından üretilen doğal bir lipaz inhibitörü olan lipsatin'in hidrojene edilmiş türevidir (Mulcahy ve Ballinger, 1999). Orlistat, potansiyel bir gastrik ve pankreatik lipaz inhibitörüdür ve Avrupa'da onaylanmış tek anti-obezite ilacının etken maddesidir (Keating ve Jarvis, 2001; McClendon vd., 2009).



Şekil 6. Orlistatın moleküler yapısı (URL-7).

Orlistat, gastrointestinal lumende gastrik ve pankreatik lipazların serin alt birimlerine kovalent bağlarla bağlanarak etkisini gösterir. Sonuç olarak monoaçilgliserollerin ve serbest yağ asitlerinin oluşumunu önleyerek, diyetteki yağın emilimini indirekt olarak engellemektedir (Guerciolini, 1997).

Düşük enerjili diyet ve hareketle desteklenen uygulamalarda orlistat içerikli zayıflama ilacı (Xenical[®], 120 mg, Roche) günde 3 kez alındığında vücut kütle indeksini 0.83 kg/m^2 oranında azaltmaktadır. Anti-obezite etkisinin yanında kan basıncını mütevazî ölçüde düşürebilmekte, glukoz toleransını geliştirmekte ve Tip-II diyabet başlangıcını önleyebilmektedir (De La Garza vd., 2011).

Streptomyces sp. NR 0619 suşundan izole edilen bir diğer PL inhibitörü panklisin metabolitidir. Metabolit izolasyonu, hücre misellerinden etanolle yapılan ekstraksiyonla olmuştur, organik faz, yüksek performans sıvı kromatografisiyle (HPLC) saflaştırılmıştır. Yapısal olarak, panklisin A, B, C, D ve E, tetrahidrolipstatinin, bir beta-lakton ve N-formil- lösin esteri içeren analoglarıdır (Mutoh vd., 1994).

Panklisin A, panklisin B, panklisin C, panklisin D ve panklisin E türleri vardır ve her biri DPL üzerine doz bağımlı inhibitör etkide bulunmaktadır. IC_{50} değerleri sırasıyla 2.9, 2.6, 0.62, 0.66 ve $0.89 \mu\text{M}$ 'dır. İnhibitör aktivitesi, aminoasit içeriği ile ilgili olup glisin tip bileşikler (panklisin C, D, E) THL'den 2-3 kat daha fazla potansiyele sahipken alanin tip bileşikler (panklisin A ve B) glisin içerenlere göre daha az etkilidir. Tüm bileşikler, pankreatik lipazı orlistat gibi geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir (Mutoh vd., 1994).

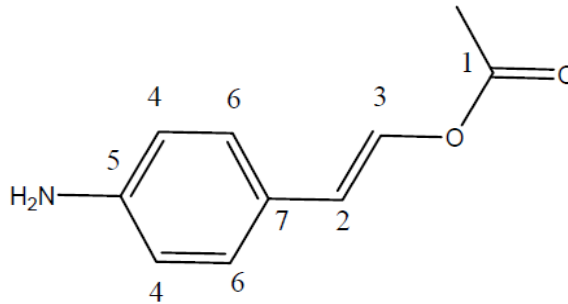
Ebelakton metabolitleri, topraktan izole edilen *Streptomyces* MG7-G1 suşundan elde edilmiştir. Kültür ortamından organik solventlerle ekstrakte edilip silika jel üzerinde kromatografik olarak organik ekstre kısımlara ayrılmıştır. Daha sonra

ebelakton ihtiva eden aktif fraksiyonlar konsantre edilmiştir (Umezawa vd., 1982). İki tip ebelakton metaboliti (ebelakton A ve ebelakton B) vardır. Bu iki akraba inhibitörün DPL inhibisyonuna ait IC₅₀ değeri ebelakton A için 3 ng/mL, ebelakton B için ise 0,8 ng /mL'dir (Birari ve Bhutani, 2007).

Persikünün, *Basidiomycetes* sınıfından *Stereum complicatum* fungusu misellerinden üretilmektedir. En az bir karbon, nitrojen, inorganik tuz kaynağı ihtiva eden besiyeri ortamında, 25 °C (±1 °C)'de 216-264 saatlik inkübasyon sonunda oluşan hücre kültürünün filtre edilip ardından suya karışmayan organik solventlerle ekstraksiyonu ile persikünün metaboliti elde edilmiştir. Metabolit HPLC ile saptanmıştır. Testte mono-NBD-acylglycerol, substrat olarak kullanılmıştır. Lipaz inhibisyon testinde inhibitöre ait IC₅₀ değeri 2 µM olarak saptanmıştır (Hopmann vd., 2003).

Basidiomycetes sınıfına ait *Boreostereum virans* mikrofungusu, β-lakton halkası içeren bir mikrobiyal kaynaklı metabolit olan vibrolakton metabolitini üretmektedir. İnhibitör, lipazın serin rezidüsüne kovalent bağlanarak enzimi inhibe etmektedir. Spektrofotometrik yöntemle yapılan antilipaz testinde inhibitöre ait IC₅₀ değeri 0.4 µg/mL olarak bulunmuştur (Liu vd., 2006).

Ahır toprağından izole *Streptomyces vayuensis* olarak adlandırılan, Mikrobiyal Kültür Koleksiyon Merkezi'nce (Hindistan) MTCC no. 5219 ismiyle yeni bir suş olarak kaydedilen *Streptomyces* sp. MTCC 5219, inhibitör üretimi için kullanılmıştır. Suş miselleri çeşitli organik çözücülerle muamele edilerek suşa ait inhibitör etkili metabolit (Şekil 7) ekstrakte edilmiş ve HPLC ile birkaç fraksiyona ayrılmıştır (Tokdar vd., 2011).

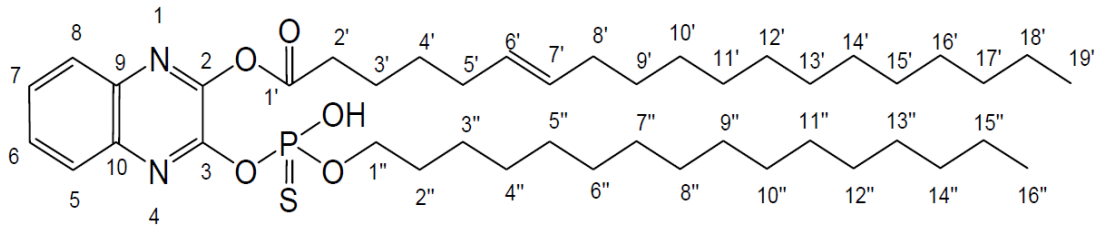


Şekil 7. İzole edilen saf bileşik (Tokdar vd., 2011).

Metabolitin, bakteri lipazı ve domuz pankreatik lipazını inhibe ettiği, testlerle onaylanmıştır. Fermentasyon ortamındaki aktif bileşik misel kekinden, önce etil asetat (1:1, w:v) ile izole edilmiş ve ekstrakt farklı çözücülerle fraksiyonlara ayrılarak

saflaştırılmıştır. Kloroformda çözünen fraksiyon en etkili fraksiyon olup bakteri lipazını % 100, HPLC ile yapılan ayırımla elde edilen fraksiyon D (% 96 CHCl₃, % 4 CH₃OH), bakteri lipazını % 95 oranında inhibe etmiştir. Bu bileşik, DPL enziminin trioleatı hidrolizini IC₅₀ 7.46 µM değeri ile doz bağımlı olarak inhibe etmiştir (Tokdar vd., 2011).

Kilaru, 230 adet Aktinomiset üyesi mikroorganizmayı, 23 farklı besiyerinde üretmiştir. Çalışmasında; *Streptomyces vayuensis* N2 suşunun, optimize edilen besiyerinde gelişimiyle üretilen ve saflaştırılan streptolipin (Şekil 8) metabolitinin pankreatik lipazı % 91 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. İnhibitörün IC₅₀ değeri 349 nM olarak saptanmıştır (Kilaru, 2005).



Şekil 8. Streptolipin inhibitörünün moleküler yapısı (Kilaru, 2005)

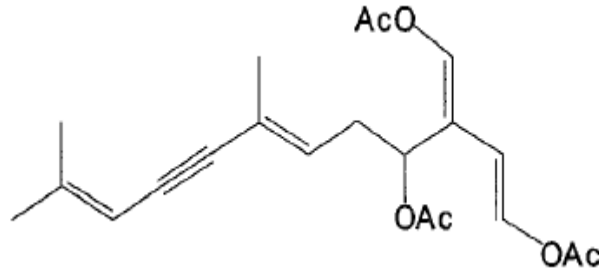
Bitkisel inhibitörlerin araştırıldığı bir çalışmada, 106 adet tıbbi bitki, sebze ve meyve ekstraktı, potansiyel lipaz inhibitör aktivitesi yönünden taranmıştır. Ham domuz pankreatik lipazının kullanıldığı, in vitro koşullarda yapılan testte ayı üzümü (*Arctostaphylos uva ursi*), bahçe bezelyesi (*Pisum sativum*), Norveç ladini (*Picea abies*) ve büyük yapraklı ıhlamur (*Tilia platyphyllos*) ekstraktları en aktif bitki ekstraktları olmuştur (Slanc vd., 2009).

Ekanem ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Afromomum meleguetta* (Güney Afrika'da timsah biberi olarak bilinen bir baharat) tohumları ve *Splilanthos acmella* (tıbbi amaçlar için ve baharat olarak kullanılmaktadır) çiçek tomurcuklarının % 70'lik etanolla sonikatörde 80 °C'de 3 saat tutularak hazırlanan özütlerine, antilipaz aktivite testi uygulamış ve özütlerin doz bağımlı antipankreatik lipaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Çalışmada, özütlerin 2 mg/mL'lik konsantrasyonları test edilmiştir. *A. meleguetta* ve *S. acmella* için lipaz inhibitör aktiviteleri sırasıyla % 90 ve % 40 olarak gözlemlenmiştir. Bu bitkilerin, kilo azaltıcı ve obezite kontrolünde kullanılabilme potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir (Ekanem vd., 2007).

Sharma va arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, doğal kaynaklardan yeni bir pankreatik lipaz inhibitörü elde etmek amacıyla farklı familyaya ait 75 şifalı bitki,

radioaktif yöntem kullanılarak anti-lipaz aktivitesi için taranmıştır. Bitkilerin metanol ile ekstraktları hazırlanmıştır. Radyoaktif substrat olarak triolein kullanılmıştır ve sıvı parıldama ölçer (Liquid Scintillation Analyzer) cihazı yardımıyla deney sonuçları verilmiştir. Test sonuçları değerlendirildiğinde, 75 familyanın 35'inde düşük antilipaz aktivitesi gözlenmiştir. Yalnızca 9 bitki % 70'in üzerinde inhibisyona sahip olduğu gözlenmiştir. Bu 9 bitkinin 3 tanesi % 80'in üzerinde etkiye sahip olup bunlar, *Eriochloa villosa* (% 83), *Orixa japonica* (% 81) ve *Setaria italica* (% 80.3) bitkileridir. İlginç olan üç bitkininde buğdaygiller (Poaceae) familyasında olmasıdır (Sharma vd., 2005).

Bir diğer bitkisel kaynaklı inhibitör taraması Bitou ve arkadaşları tarafından 1993-94 yıllarında toplanan bir dizi deniz alginin (54 tür) bu amaçla taranmasıyla yapılmıştır. Alg örnekleri, metanol veya etil asetatla ekstrakte edilerek, triolein ve 4-MU-oleatın substrat olarak kullanıldığı anti-pankratik lipaz testi sonucunda *Caulerpa taxifolia* ve *Asparagopsis taxiformis* türünün metanollü ekstraktlarının en yüksek inhibisyon düzeyine ulaştığı gözlenmiştir. Türlerin inhibisyon etkisi, içermiş oldukları yüksek miktardaki polifenol veya oksitlenmiş bileşiklerden (tannin gibi) ileri gelmektedir. Kalorpenin metabolitinin (Şekil 9), triolein ve 4-MU-oleat için IC₅₀ değeri sırasıyla 2 mM ve 13 µM'dır. Ayrıca kalorpenin ile beslenen ratlarda plazma TAG seviyesi ve kan basıncının azaldığı saptanmıştır (Bitou vd., 1999).



Şekil 9. Kalorpenin metaboliti (Bitou vd., 1999).

Gondoin ve arkadaşları siyah, yeşil ve beyaz çayın, lipaz inhibisyon aktivitesini test etmiştir. Yapılan testlerde, çay ekstraktlarında antilipaz aktivitesine rastlanmıştır. Bu aktivitenin, bitkinin fenolik madde içeriğinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Siyah, beyaz ve yeşil çay yaprakları kaynayan suda 15 dk boyunca 100 rpm'de çalkalanmış ardından karışım süzülerek çay ekstraktları elde edilmiştir. *p*-nitrofenil lauratın substrat olarak kullanıldığı antilipaz aktivite testinde, beyaz ve yeşil çayın 25 µg GAE / mL'lik konsantrasyonları lipazı önemli düzeyde inhibe ederken 100 µg GAE

/ mL konsantrasyonlu siyah çay ekstraktı inhibitör etki gösterememiştir. Beyaz ayın bu konuda daha etkili olduğu gözlemlenmiş olup IC₅₀ değerleri beyaz ve yeşil çay için sırasıyla 22 µg/mL ve 35 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Gondoin vd., 2010).

Bitki ekstraktları içermiş oldukları polifenolik bileşikler, terpenler ve saponinler sayesinde pankreatik lipaz enzimini inhibe edici etkiye sahiptir. Bu sebeple lipaz inhibisyonuna farmokolojik açıdan bir yaklaşım getirmek amacıyla dünya çapında bir bitki ekstraktı antilipaz aktivite testine tabi tutulmuştur (De La Garza vd., 2011).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Alman mikroorganizma ve hücre kültür koleksiyonundan (DSMZ) temin edilen *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107, *S. toxytricini* DSM40178, *S. griseus* subsp. *griseus* DSM40693, *S. rimosus* subsp. *paramomycinus* DSM41429, *S. auratus* DSM41897, *S. fradiae* DSM40063, *S. antibioticus* DSM40234 mikroorganizmaları inhibitör potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla test edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Tablo 3. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve besiyeri bileşenleri

| Sıvı Besiyerleri | |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M65 | Glukoz 4 g/L, Maya ekstraktı 4 g/L, Malt ekstrakt 10 g/L (DSMZ). |
| M1 | Glukoz 15 g/L, Soya Pepton A1 7.5 g/L, Soya Pepton A2 7.5 g/L, CaCO ₃ 2 g/L, NaCl 5 g/L, Maya ekstraktı g/L. |
| M2 | Glukoz 5 g/L, Soya Peptonu 20 g/L, Gliserol 20 g/L, NaCl 3 g/L, Maya ekstraktı 5 g/L, 7H9 2.5 g/L. |
| M3 | Glukoz 10 g/L, Soya Peptonu 4 g/L, MgSO ₄ 0,25 g/L, NaCl 5 g/L, Maya ekstraktı 2 g/L. |
| M4 | Luria Bertani 25 g/L, Gliserol 15 g/L, NaCl 2.5 g/L, Tween 80 1 g/L, Zeytinyağı 10 g/L. |
| M5 | Nişasta 5 g/L, Glukoz 5 g/L, D-riboz 5 g/L, Gliserol 5 g/L, Soya unu 20 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g/L, Maya ekstraktı 2 g/L, Baktopepton 2 g/L. |
| M6 | Nişasta 5 g/L, Maya ekstraktı 5 g/L, Malt ekstrakt 15 g/L, CaCO ₃ 3 g/L. |
| M7 | Glukoz 10 g/L, Maya ekstraktı 2 g/L, Baktopepton 4 g/L, Et ekstraktı 2 g/L, Glisin 5 g/L, MgSO ₄ 2 g/L, NaCl 5 g/L. |
| LB | Tripton 10 g/L, Maya ekstraktı 5 g/L, NaCl 10 g/L. |
| SB | Pepton 30 g/L, Maya ekstraktı 20 g/L, NaCl 5 g/L. |
| TB | Tripton 12 g/L, Maya ekstraktı 24 g/L, K ₂ HPO ₄ 9.4 g/L, KH ₂ PO ₄ 2.2 g/L. |
| YP | Maya ekstraktı 10 g/L, Pepton 20 g/L. |
| YPD | Maya ekstraktı 10 g/L, Pepton 20 g/L, Glukoz 20 g/L. |
| Katkı Besiyerleri | |
| M65 Agar | Glukoz 4 g/L, Maya ekstraktı 4 g/L, Malt ekstrakt 10 g/L, Agar 12 g/L. pH: 7.2 (DSMZ). |
| Sporlandırma Agarı | Dekstrin 4 g/L, Maya ekstraktı 4 g/L, Malt ekstrakt 10 g/L, CaCO ₃ 2 g/L, Agar 20 g/L. pH: 7.0. |

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Enzim

Kullanılan kimyasal maddeler Merck Kimya'dan, domuz pankreatik ekstraktı (DPE) AppliChem firmasından, tung yağı ve nişasta Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. Tampon A Hazırlanışı

Spektrofotometrik yöntemle yapılan lipolitik aktivite testinde kullanılmak üzere hazırlandı. 100 mL tampon için: 10 mL Tris (100 mM), 10 mL NaCl (1.5 M), 1 mL CaCl₂ (0.6 M), 1 mL EDTA (0.1 M), 0.1 mL % 1 BHT kullanıldı. Tamponun pH'sı 8'e ayarlandı, ardından tampon süzülerek +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.2. Tampon B Hazırlanışı

100 mL'si için, Tampon A'nın bileşenlerine ilave olarak 20 mL β-CD (15 mg/mL) içermektedir. Tamponun pH'sı 8'e ayarlandı, ardından tampon süzülerek +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.3. Florometrik Yöntem İçin Tampon Hazırlama

13 mM Tris-HCl (pH 8.0) hazırlandı. Tampon, 150 mM NaCl, 1.36 mM CaCl₂ içermektedir (Nakai vd., 2005). Hazırlanan tampon, Tampon C olarak isimlendirildi.

2.2.4. Florometrik Yöntem İçin Substratın Hazırlanması

4-MUO'nun (Sigma Aldrich) DMSO ile 0.1 M konsantrasyonlu stok hazırlandı. Stok 4-MUO, kullanılacak tampon ile 1:1000 oranında seyreltilerek deneylerde kullanılmak üzere 0.1 mM konsantrasyonlu substrat hazırlandı (Nakai vd., 2005).

2.2.5. Enzimin Hazırlanışı

İnhibisyon testlerinde kullanılan DPE Tampon A ile hazırlanmıştır. 1 mL Tampon A için 3.2 mg DPE tartıldı. Ardından hazırlanan çözelti vortekslendi. Daha sonra 5000 rpm'de 2 dk santrifüj (Sigma Sortorius Type Model.1-14) edildi. Süpernatant kısmı buz üzerine alınarak Tampon A ilavesi ile son hacmine tamamlandı.

2.2.6. Ham Tung Yağının Saflaştırılması

Aleurites fordii, Çin orijinli bir ağaçtır ve ağacın tohumunda bulunan yağ, tung yağı olarak bilinmektedir (Pencreac'h vd., 2002). Tung yağında % 70-80 oranında α-eleostearik asit, % 10 oranında oleik asit ve % 15 oranında linoleik asit bulunur (Radunz

vd., 1998). Ham tung yağının saflaştırılmasında Mendoza'nın saflaştırma tekniği (Mendoza vd., 2012) modifiye edilerek TLC yerine alümina sabit fazlı kolon kullanıldı.

Hareketli faz; hegzan, dietileter ve asetik asit çözücülerinin sırasıyla 55:45:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. Sonrasında, % 0.01'lik BHT/petrol eteri çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti, saflaştırılacak ham tung yağı ile 200 mg/mL oranında karıştırılarak son karışım kolona yüklendi.

Yükleme sonrasında kolondan hareketli fazgeçirilerek yağa ait fraksiyonlar toplandı Saf tung yağına ait fraksiyonlar, TLC yöntemiyle tespit edildi (Verger vd., 2006).

2.2.7. İyot/Silikajel İçerikli Boyanın Hazırlanması

Bir havan içerisinde birkaç iyot kristali öğütüldü. Biraz silika jel ilave edilerek karıştırıldı. Karışım, ağzı sıkıca kapanabilen bir kavanoza aktarıldı. Oda şartlarında muhafaza edildi (URL-9).

2.2.8. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi, elde edilen fraksiyonlardan hangilerinin saf tung yağına ait olduğunu tespit etmek amacıyla kullanıldı. Bu amaçla toplanan fraksiyonlardan TLC plakaya (Merck, Silikagel 60 F₂₅₄) spotlama yapıldı. Plaka, hegzan:dietileter:asetik asit (55:45:1) çözeltisine bir antioksidant olarak % 0.001 BHT ilave edilmesiyle hazırlanan çözeltide yürütüldü (Mendoza vd., 2012). Yürütme sonrası plaka, silika jel ve iyotla hazırlanmış boyayla boyandı. Plaka üzerinde tek bant veren fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen fraksiyonların çözücüsü, evaporatörde uçurularak saf tung yağı elde edildi. Saf tung yağı, amber şişede ve +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.9. Saflaştırılan Tung Yağına Ait Spektrumun Alınması

Saf tung yağı, etanolle 4 µg/mL'ye seyreltildi. Elde edilen dilüsyondan, UV mikroplakaya (Costar CLS3635) 200 µL konulup mikroplaka okuyucuda (Molecular Devices Spectramax M5 Microplate Reader) spektrumu alındı (Mendoza vd., 2012).

2.2.10. Mikroplakanın Kaplanması

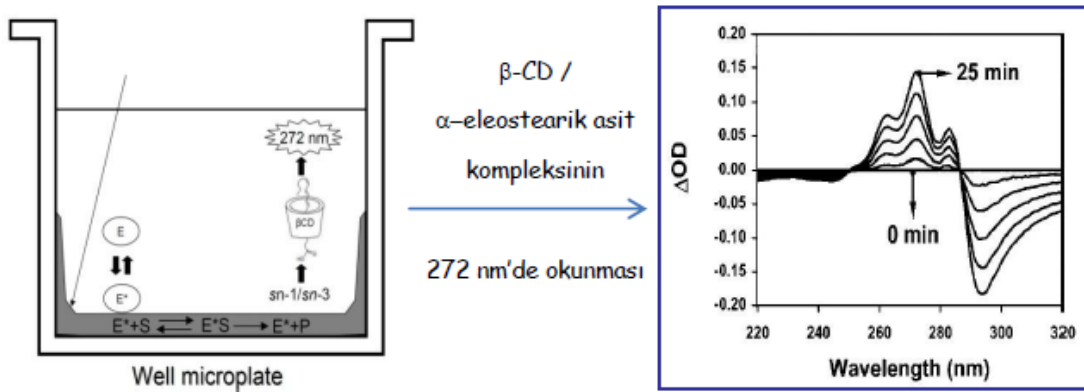
Streptomyces suşlarına ait fermentasyon sıvılarının lipolitik aktivite ölçümünde UV mikroplaka (Costar CLS3635) kullanıldı. Kaplanacak mikroplakalar, 200 µL absolu etanol ile yıkandı. Ardından bir mikroplaka için 7 mg saf tung yağı tartıldı. Tartılan yağa, çözeltideki yağ konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde, % 0.01 BHT içeren absolü etanol çözeltisinden ilave edildi. Ardından bu karışım, ultrasonik su banyosunda

30 dk tutularak yağın karışım içinde dağılması sağlandı. 30 dk sonunda emülsiyondan mikroplakanın her bir kuyucuğuna 62.5 μL taksim edildi. Mikroplaka, etanolün uzaklaştırılması amacıyla 3 saat için vakum uygulanan desikatörde bekletildi. Kaplanan plakalar +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Şekil 10).



Şekil 10. Mikroplaka kaplama aşamaları

Tung yağı ile kaplı mikroplakada, lipaz enzimi, tung yağından gelen triaçilgliserölü hidroliz eder. Hidroliz sonucu oluşan α -eleostearik asid, β -CD ile kompleks oluşturur ve bu kompleks UV özelliği (Costar CLS3635) plakada 272 nm'de maksimum absorbans verir (Şekil 11) (Mendoza vd., 2012).



Şekil 11. Tung yağı ile kaplı mikroplakada tung yağının hidrolizi. E, lipaz çözeltisi, E* ara yüzeye tutunmuş lipaz, S, substrat, P, lipoliz ürünü (Mendoza vd., 2012).

2.2.11. Kullanılan Enzimlerin Kalibrasyonu

İnhibisyon testlerinde kullanılacak enzimlerin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla her bir enzimin Tampon A ile 5 ng, 10 ng, 12 ng, 18 ng, 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng ve 100 ng son konsantrasyonda seyreltmeleri hazırlandı. Bu konsantrasyonlara ilişkin standart aktivite tayini yapıldı.

2.2.12. Mikroorganizmaların Rehidrasyonu ve Canlandırılması

Kültür koleksiyonundan satın alınan mikroorganizmalar liyofilize halde gelmektedir. Liyofize suşların rehidrasyonu ve canlandırılması kültür koleksiyonunun canlandırma metoduna (Şekil 12) uygun yapılmıştır.



1. Vakum altında kapatılmış çift tüplü liyofilize kültür



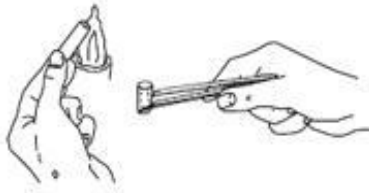
2. Ampulün uç kısmı ateşe tutuldu.



3. Ampulün sıcak olan uç kısmına bir iki damla su damlatıldı ve cam çatlatıldı.



4. Bir pensle dikkatli bir şekilde camın uç kısmına vurularak kırıldı.



5. Bir pens yardımıyla cam yünü alındı ve iç tüp dışarı çıkarıldı.



6. Steril şartlarda pens yardımıyla pamuk tıkaç kaldırıldı ve iç tüpün üst kısmı ateşe tutuldu.

7. Kuru pellet üzerine 0,5 mL DSMZ'nin tavsiye ettiği sıvı besiyerinden (M65 broth) ilave edilip pelletin rehidre olması için 30 dk. beklendi.

8. İçerik, pastör pipeti v.b ile nazikçe karıştırıldı ve M65 agar besiyerine süspansiyondan 100 µL inoküle edilip yayma ekim yapıldı.

9. Süspansiyonun geriye kalan kısmının tamamı 5 mL M65 sıvı besiyerine inoküle edildi.

Şekil 12. Liyofilize suşların rehidrasyonu ve canlandırılması (DSMZ, 2012).

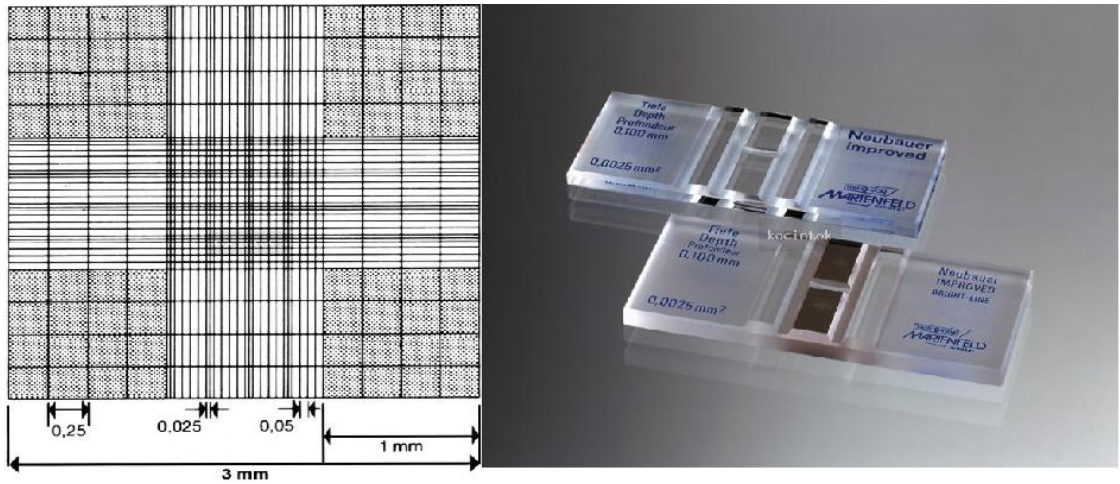
Kültür koleksiyonu tarafından *Streptomyces* türleri için önerilen M65 sıvı ve katı besiyerine ekilen mikroorganizmalar, 48 saat boyunca 28 °C’de (sıvı besiyerleri 220 rpm’de) inkübasyona bırakıldı.

2.2.13. Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması

M65 sıvı besiyerinde 2 gün inkübe edilen suşlar spor agar besiyerlerine yayma ekim yöntemiyle ekildi. Petriler, suşların spor oluşturabilmesi için 15 gün boyunca 28 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan sporlar petrilerden hasat edildi. Hasat işleminde, her bir petriye 5 mL steril saf su ilave edildi. Steril bir öze yardımıyla petrinin yüzeyi nazikçe kazındı. Kazıntı, içerisinde steril pamuk bulunan ve bir falkon tüpe yerleştirilmiş ve pompası çıkarılmış steril enjektöre aktarıldı. Tüplerin ağzı kapatıldı ve tüpler, 2000 rpm’de 20 sn santrifüj edildi. Pamuktan süzülüp falkon tüpe geçen spor süspansiyonu alındı. Bu kısmın % 20’lik gliserol stoğu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar, -20 °C’de muhafaza edildi.

2.2.14. Neubauer Lamı ile Spor Sayımı

Spor hasadını takiben hazırlanan süspansiyonlarda, Neubauer lamı (Şekil 13) ile spor sayımı yapıldı. Sayımda, lam üzerindeki 5 adet karedeki sporlar ayrı ayrı sayılıp ortalamaları alındı. Spor sayısı = (Ortalama)×25×50×10³ formülü kullanılarak hesaplandı.



Şekil 13. Neubauer lamı (URL-8).

2.2.15. Prekültür Hazırlanması

Her bir suş için bir adet steril tüpe 5 mL M65 besiyeri taksim edildi. Besiyerleri oda sıcaklığına geldikten sonra stok spor süspansiyonlarından 100 µL ilave edildi. Kùltürler, 2 gün 28 °C’de inkübe edildi.

2.2.16. Genel Tarama

Farklı fermentasyon ortamlarının, inhibitör etkili metabolit üretimine etkisinin araştırılması amacıyla yukarıda bahsi geçen besiyerlerinden, besiyeri sayısınca (13) tüplere 9.5 mL ilave edildi. Hazırlanmış prekùltürlerden bu tüplere 500 µL inoküle edildi. Ardından tüpler, 28 °C’de 7 gün için, inkübasyona bırakıldı. Yedi gün boyunca her bir tüpe her gün örnekleme işlemi uygulandı.

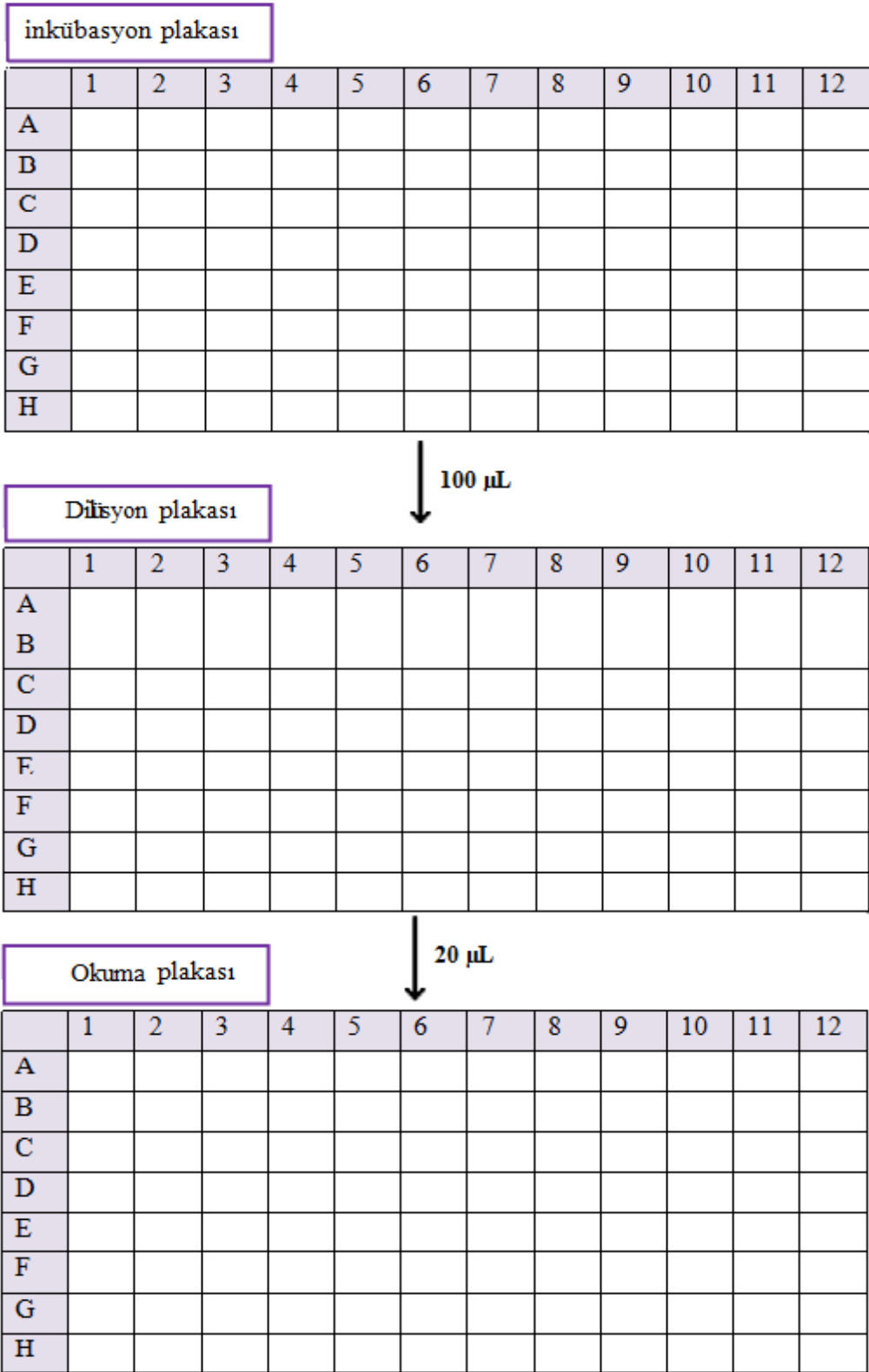
2.2.17. Örnekleme İşlemi

Her bir tüpten, ayrı ayrı 1 mL fermentasyon sıvısı alınarak mikrosantrifüj tüplere konuldu. Tüpler, 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısımları alınıp başka tüplere aktarıldı ve üzerlerine aynı hacimde DMSO ilave edildi. Bu şekilde hazırlanan tüpler, -20 °C’de muhafaza edildi.

2.2.18. Lipolitik Aktivite Tayini

İnkübasyon plakası kuyucuklarına bir hacim örnek numune ile iki hacim Tampon A ile hazırlanmış 3.2 mg/mL konsantrasyonlu enzim çözeltisinden konuldu; ardından plaka, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. 30 dk sonra inkübasyon plakasının her bir kuyucuğundan, 100 µL alınarak 1900 µL Tampon A bulunan seyreltme plakasına aktarıldı.

100 µL alınarak 1900 µL Tampon A bulunan seyreltme plakasına aktarıldı. Devamında ise seyreltme plakasından 20 µL örnek alınarak tung yağı ile kaplanmış ve 180 µL Tampon B bulunan okuma plakasına ilave edildi. Son olarak; okuma plakası, önceden 37 °C’ye ısıtılmış mikropilaka okuyucuya yerleştirildi ve 272 nm’de, 40 dk kinetik okuma yapıldı. Plaka hazırlama aşamaları Şekil 14’de şematize edilmiştir.



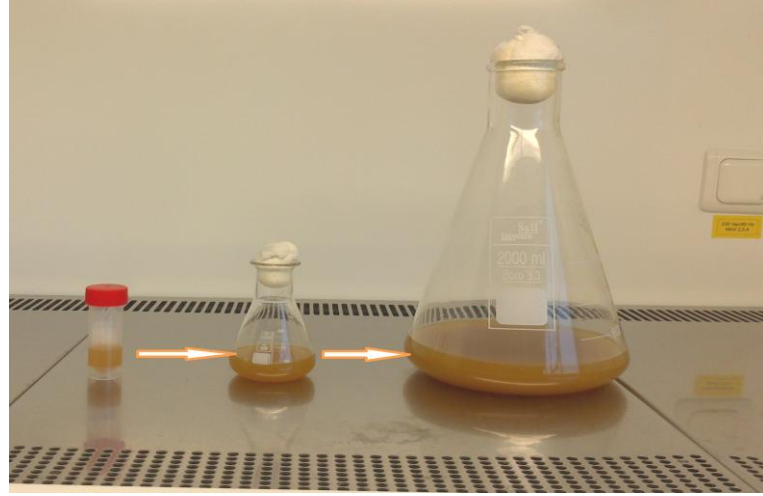
Şekil 14. Lipolitik aktivite tayini basamakları

2.2.19. İkinci Aşama Üretimi

İlk taramada % 50 civarında inhibisyon gösteren suşun 50 mL’de üretimi yapıldı. Bu amaçla her bir suşun, ilgili 50 mL besiyerine, prekültüründen 5 mL inoküle edildi ve besiyerleri 28 °C’ de 7 gün inkübasyona bırakıldı.

2.2.20. Büyük Hacimde Üretim

İkinci aşama üretimi sonucunda başarılı sonuç veren (% 50 civarı inhibisyon gösteren) suş/besiyeri ikililerinin büyük çapta üretimleri yapıldı. Bu amaçla *Streptomyces griseus* DSM41107 suşu, 500 mL M6 ve 300 mL TB besiyerlerinde üretildi. Öncelikli olarak; *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun spor süspansiyonundan, 5 mL M6 besiyerine 250 µL inoküle edilerek 28 °C’ de 36 saat inkübe edildi. bu süre sonunda oluşan prekültür, 50 mL M6 besiyerlerine aktarılarak 28 °C’ de 1 gün daha inkübe edildi. Bu şekilde kademeli olarak hazırlanan son prekültür, 500 mL M6 besiyerine ilave edilerek 28 °C’de gün inkübasyona bırakıldı. İşlem aşamaları Şekil 15’te şematize edilmiştir.



Şekil 15. Küçük hacimden büyük hacimli üretime geçiş aşamaları

TB besiyerinde yapılan büyük hacimde üretim de M6 besiyerindeki gibi yapıldı.

Ayrıca *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun YP ve M6 besiyerlerinde, *Streptomyces auratus* DSM41897 suşunun da M6 ve YP besiyerinde, *S. antibioticus* DSM40234 suşunun M6 besiyerinde 100’er mL’lik üretimleri yapıldı. Üretim esnasında izlenen *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107/M6 üretiminde olduğu gibidir.

2.2.21. Ekstraksiyon

İnkübasyon süreleri sonrasında, tüm fermentasyon sıvıları, 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımları alınıp üzerlerine 2 hacim etil asetat ya da 1:1 oranı kullanılıp sulu fazın ikinci kez ekstraksiyonu yapılarak metabolitlerin ekstraksiyonları yapıldı. Oluşan bu karışımlar, 2 saat için sıcak ekstraksiyon sistemine bağlandı. İki saatin sonunda her bir karışım ayırma hunisine aktarıldı. Faz ayrımı gerçekleşince üst fazlar alındı. Üst fazların her birine su tutucu olarak susuz sodyum sülfat ilave edildi. Ardından çözücü (etil asetat), evaporatörde (IKA® RV 10) uçuruldu. Evaporasyon sonrası elde edilen ekstraktlar, DMSO ile çözülerek alındı ve +4 °C'de saklandı.

Bu amaçla *Streptomyces griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde ve TB besiyerinde, *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun YP ve M6 besiyerlerinde, *Streptomyces auratus* DSM41897 suşunun da M6 ve YP besiyerinde, *S. antibioticus* DSM40234 suşunun M6 besiyerinde üretimlerinin yapılmasıyla elde edilen fermentasyon sıvıları ekstrakte edildi.

2.2.22. Biyoaktif Moleküllerin Kısmi Saflaştırılması

Kısmi saflaştırmada TLC tekniğinden yararlanıldı. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerindeki üretiminden elde edilen 22.1 mg/mL konsantrasyonlu ekstrakt, preparatif TLC plakasına (Silikagel 60 F₂₅₄, 0.5 mm, 20×20 cm) spotlanarak asetonitril:diklorometan (1:1) çözeltisinde yürütüldü (Şekil 16).



Şekil 16. Ekstraktın preparatif TLC plakasında yürütülmesi

Yürütme sonrası üç ayrı bant oluşmuştur. Oluşan bantlar, yukarıdan aşağıya F1, F2 ve F3 olarak isimlendirildi (Şekil 17).



Şekil 17. Preparatif TLC plakasının yürütme sonrası UV altındaki görüntüsü ve F1, F2, F3 bantları.

F1, F2 ve F3 olarak isimlendirilen kısımlar kazınarak alındı. Alınan her bir bant birer erlene konuldu ve üzerlerine 25 mL etil asetat ilave edildi. Erlenlerin içerisine birer manyetik bar bırakıldı ve 20 dk süreyle karıştırıldı. 20 dk sonunda karışım filtre kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüdeki çözücü evapore edildi. Evaporasyonla elde edilen ekstrakt, DMSO'da çözülerek lipolitik aktivite tayini için kullanıldı. Bu işlemler neticesinde, inhibitör etkili metabolitin, asetonitril:diklorometan çözeltisinde yürümediği kanaatine varıldı. Sonuç olarak *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 ekstraktı, hegzanla 1:15 oranında seyreltildi. Elde edilen dilüsyon, silika jel (Sigma-Aldrich, 60-100 Mesh) sabit fazıyla doldurulan ve hegzanla yıkanan kolona (cam, 5×3.5 cm) yüklendi (Şekil 18).



Şekil 18. Numune yüklenmiş kolon

Kolon, önce hegzan ile daha sonra asetonitril:diklorometan çözeltisiyle son olarak da etanol ile yıkandı. Etanol ile hazırlanan fraksiyonların çözücüsü evapore edildi. Elde edilen ekstraktın, HPLC’de spektrumu alındı.

2.2.23. Biyoaktif Molekülün Belirlenmesi

F3 bantı, preparatif plakanın spotlama yapılan kısmına tekabül etmektedir ve bu kısım, lipolitik aktivite tayininde plakada oluşan diğer bantlara kıyasla çok daha fazla inhibisyon göstermiştir. Buradan yola çıkarak inhibitör etkili metabolitin asetonitril:diklorometan çözeltisinde yürümediği anlaşıldı. Bu sebeple; *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde üretilmesiyle elde edilen ve etanol ile oluşturulan ekstraktı, hegzanla 1:15 oranında seyreltildi. Elde edilen dilüsyon, silikajel doldurulmuş ve önceden hegzanla birkaç kez yıkanmış kolona yüklendi. Devamında kolon, önce hegzanla daha sonra asetonitril:diklorometan çözeltisiyle sonrasında da etanolla yıkandı. Etanolla hazırlanan fraksiyonlar toplandı ve çözücüsü evapore edildi. Evaporasyonla elde edilen ekstrakt, HPLC cihazında (Thermo Finnigan Surveyor) analiz edildi.

HPLC cihazında; ekstrakt, C18 ters faz kolonunda, metanol-su gradienti ile 1 mL/dk hızla kolondan geçirildi. Ölçüm 250 nm’lik dalga boyunda yapıldı (Şekil 19).

Orlistat, HPLC cihazında, C18 ters faz kolonunda, metanol-su gradienti ile 1 mL/dk hızla kolondan geçirildi. Ölçüm 250 nm’lik dalga boyunda yapıldı *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/M6 ekstraktı kromotogramına çok benzer bir kromotogram (Şekil 52) elde edilmiştir.



Şekil 19. Analizde kullanılan HPLC cihazı (Thermo Finnigan Surveyor)

Kısmi saflaştırılan numunenin metanolle 1000 ppm'lik çözeltisi hazırlandı. Çözelti, LC-MS (Thermo Scientific TSQ Access Max)'e verilerek spektrumu alındı.

2.2.24. Kısmi Saflaştırılan Metabolitin Bazı Mikrobiyal Lipazlara Karşı İnhibitör Aktivitesinin Ölçülmesi

HPLC'den alınan fraksiyonlardan (yaklaşık 12.dk'ya ait fraksiyon) elde edilen ekstraktın, DMSO ile 7 mg/mL'lik dilüsyonu hazırlandı. Dilüsyonun, spektrofotometrik yöntemle *Mucor javanicus* ve *Candida rugosa* lipazlarına karşı inhibitör etkisi test edildi.

2.2.25. Florojenik Yöntem ile Lipolitik Aktivite Tayini

2.2.25.1. İnkübasyon Plakasının Hazırlanışı

Plaka kuyucuğuna 3 mg/mL konsantrasyonlu örnekten 25 µL ve örneğe karşılık Tampon C ile hazırlanmış enzim çözeltisinden 75 µL konuldu. Numune körü olarak bir kuyucuğa 100 µL tampon, enzim kontrolü için ise 25 µL tampona karşılık 75 µL enzim ilave edildi. Hazırlanan plaka, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi (Nakai vd., 2005).

2.2.25.2. Seyreltme Plakasının Hazırlanması

Seyreltme plakasına 190 µL Tris-HCl tamponu konuldu. Üzerine inkübasyonu tamamlamış inkübasyon plakasından 10 µL ilave edilerek seyreltme plakası hazırlandı (Nakai vd., 2005).

2.2.25.3. Okuma Plakasının Hazırlanması

Okuma plakası (Grenier Microlan) kuyucuğuna sırasıyla, 25 µL saf su, 50 µL substrata (4 MUO) ve de dilüsyon plakasından 25 µL örnek ilave edilerek hazırlandı. Plaka, 37 °C'de 20 dk inkübe edildi (Nakai vd., 2005).

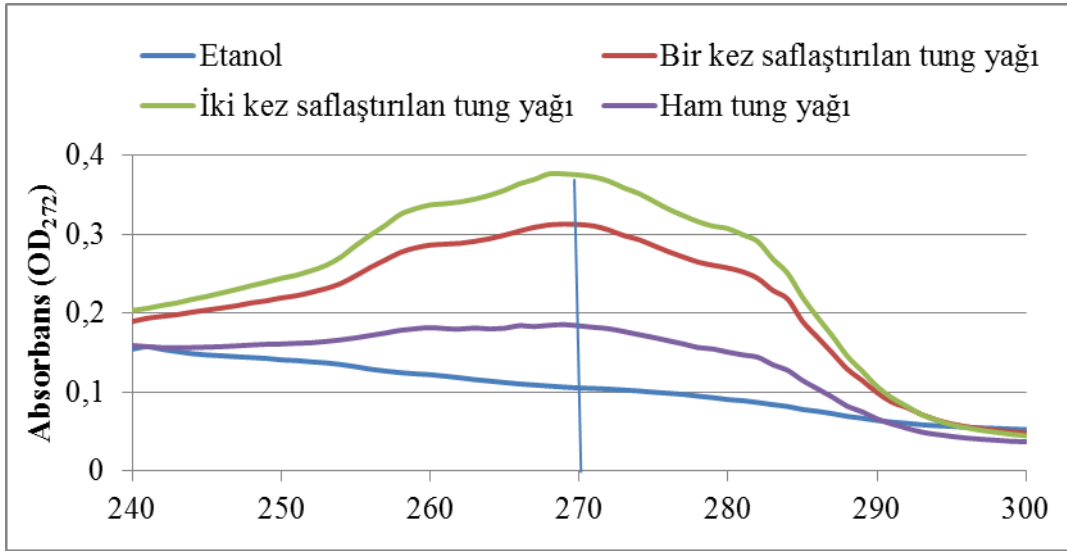
2.2.25.4. Plakanın Okutulması

Plaka, önceden 37 °C'ye ısıtılan mikropilaka okuyucuya (Molecular Devices Spectramax M5 Microplate Reader) yerleştirildi. Excision 355 nm, Emission 460 nm dalga boylarında, 20 dk kinetik okuma yapıldı (Nakai vd., 2005).

3. BULGULAR

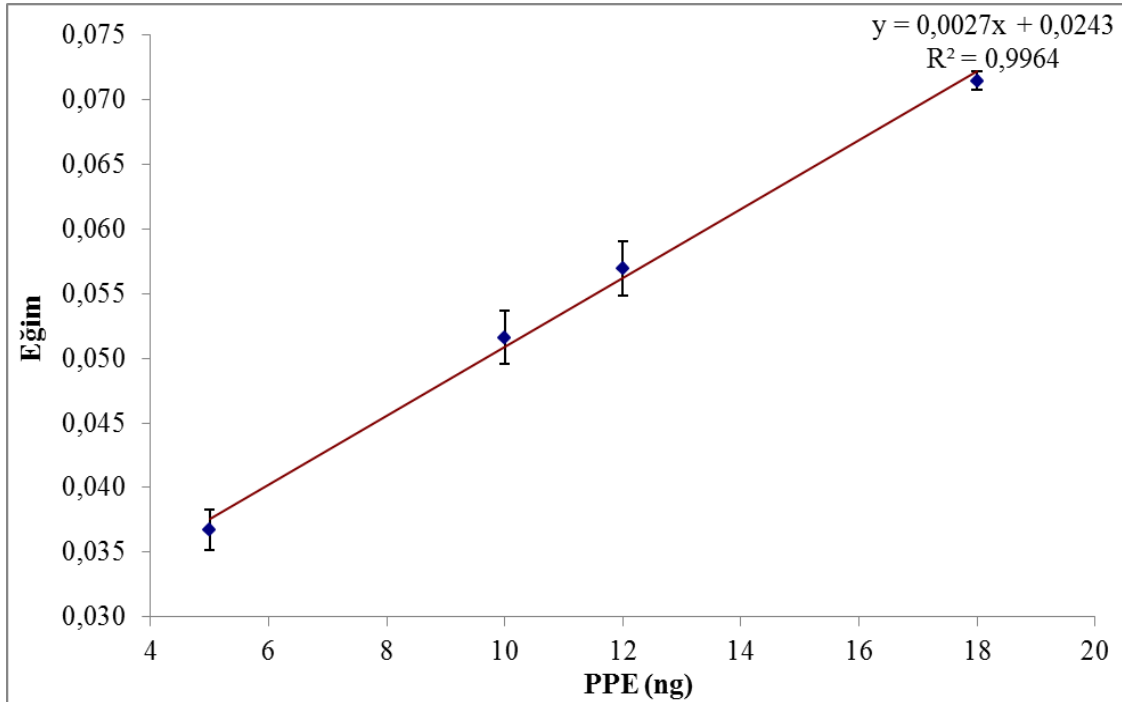
3.1. Tung Yağının Saflaştırılması

Lipolitik aktivite testinde kullanılacak plakaların kaplanmasında tung yağına ihtiyaç vardır. Ham tung yağının iki kez saflaştırılmasıyla elde edilen saf tung yağının, 272 nm’de maksimum absorbans verdiği belirlendi (Şekil 13).

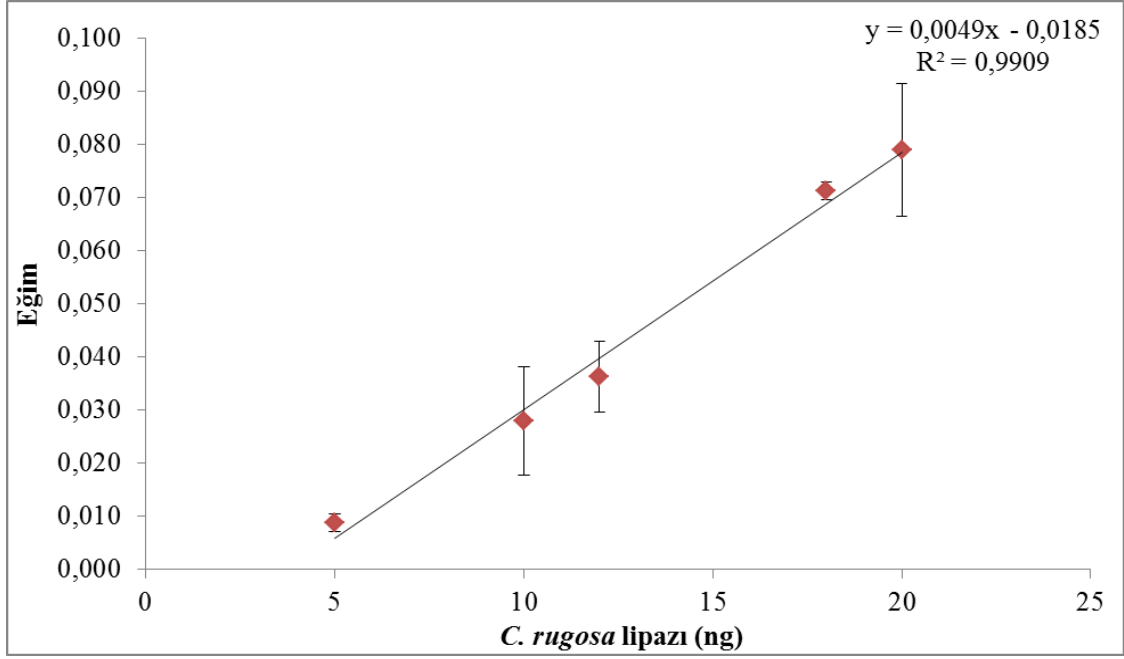


Şekil 20. Saflaştırılan tung yağına ait spektrum

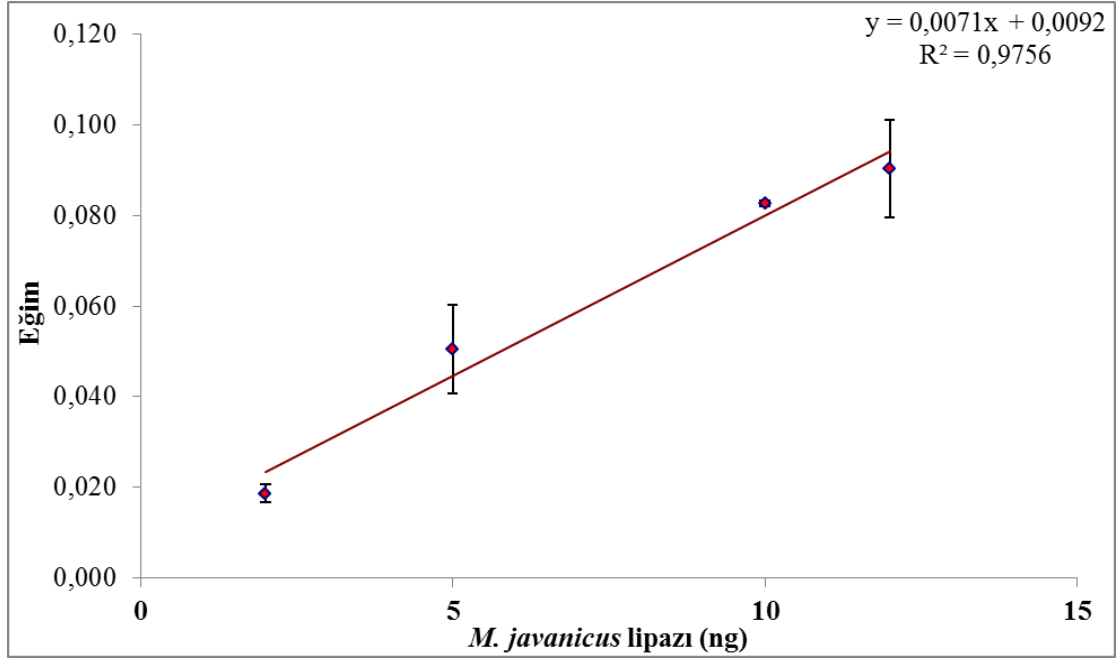
3.2. Enzim Kalibrasyonu



Şekil 21. DPE konsantrasyon, eğim grafiği



Şekil 22. *C. rugosa* lipazı konsantrasyon, eğim grafiği



Şekil 23. *M. javanicus* lipazı konsantrasyon, eğim grafiği

3.3. Spor Sayım Sonuçları

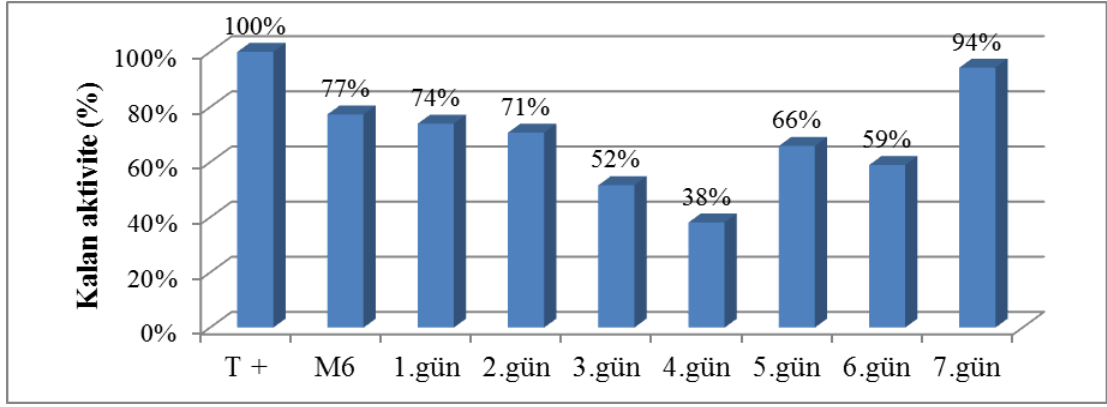
Spor hasadı sonrasında her bir suş için spor sayımı yapıldı. Sonuçlar şu şekildedir:

1. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 için, $2,9 \times 10^7$ adet,
2. *S. toxytricini* DSM40178 için, $2,1 \times 10^7$ adet,
3. *S. griseus* subsp. *griseus* DSM40693 için, $3,3 \times 10^7$ adet,

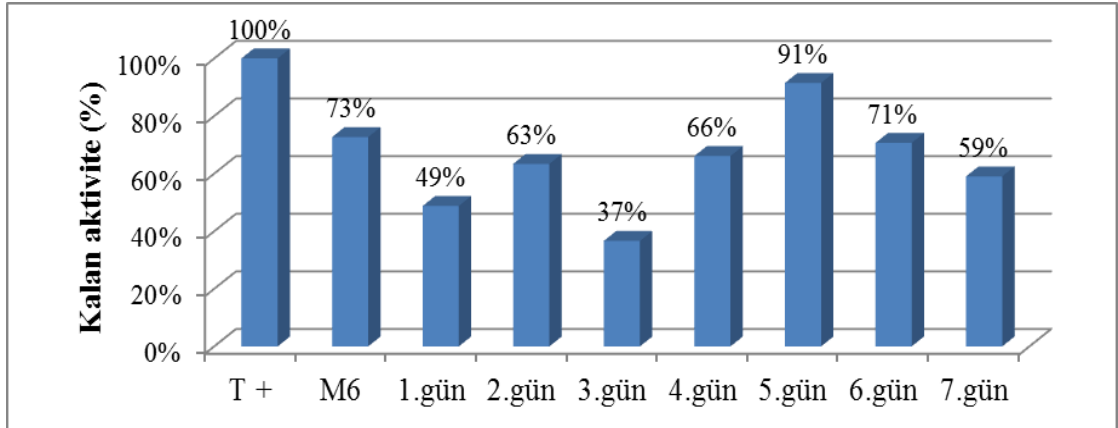
4. *S. rimosus* subsp. *paramomycinus* DSM41429 için, 4.9×10^7 adet,
5. *S. fradiae* DSM40063 için, 2.8×10^7 adet,
6. *S. antibioticus* DSM40234 için, 1.8×10^7 adet,
7. *S. auratus* DSM41897 için, 2.3×10^7 adet' tir.

3.4. Genel Tarama

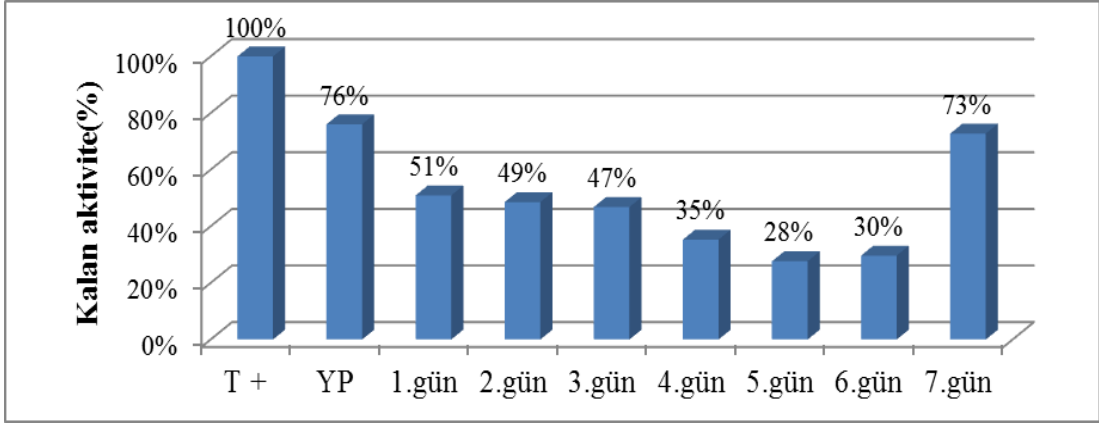
% 50'nin üzerinde inhibisyon göstererek pozitif olarak değerlendirilen suş/besiyerlerine ilişkin sonuçlar Şekil 24-34 aralığındaki grafiklerde verilmiştir. Grafiklerde yer alan T+, inhibitör içermeyen pozitif enzim kontrolünü, kalan aktivite (%), günlere ait örnekleme sonuçlarının DPE ile muamele edildikten sonra kalan enzim aktivitesini ifade etmektedir.



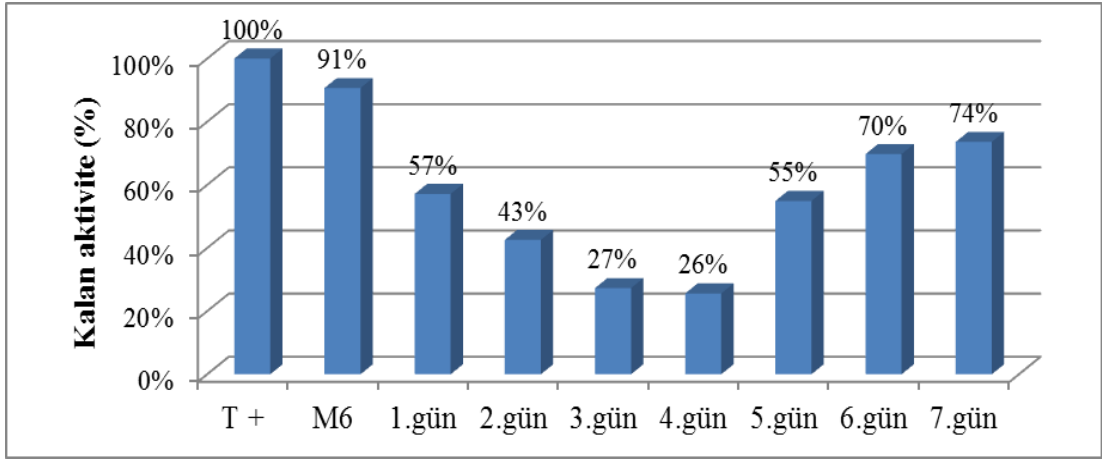
Şekil 24. *Streptomyces fradiae* DSM40063 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri



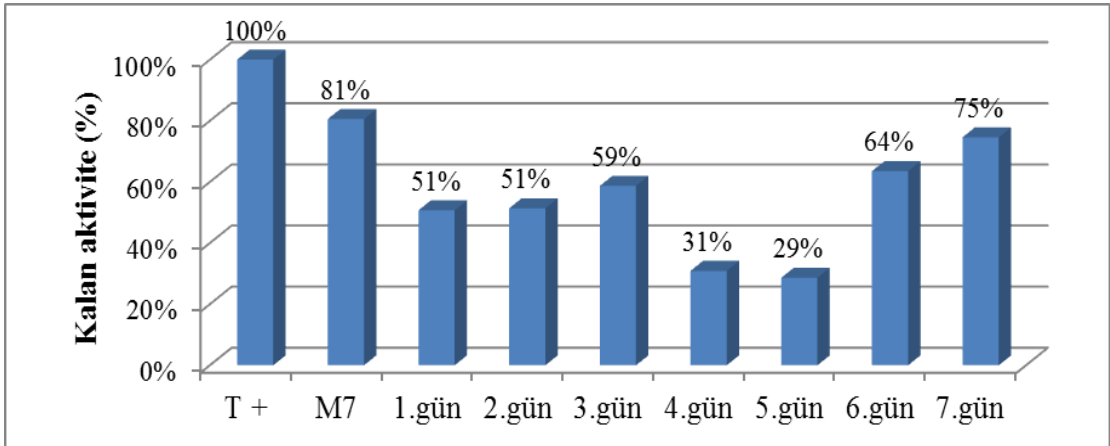
Şekil 25. *S. antibioticus* DSM40234 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri



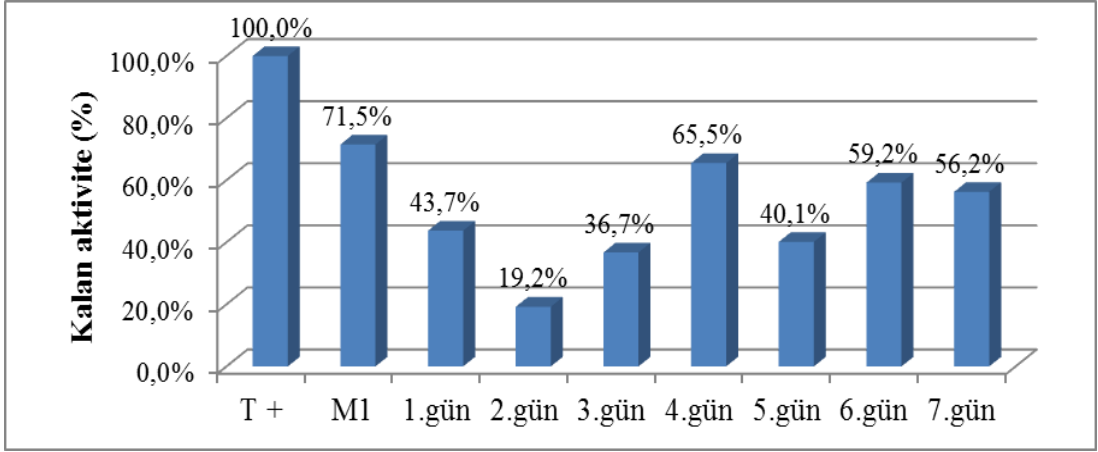
Şekil 26. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun YP besiyerinde kalan aktiviteleri



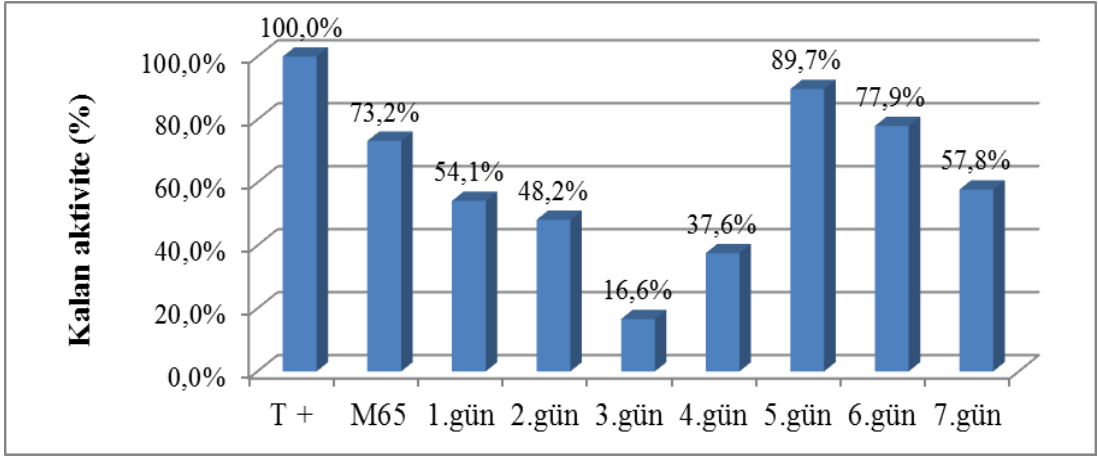
Şekil 27. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri



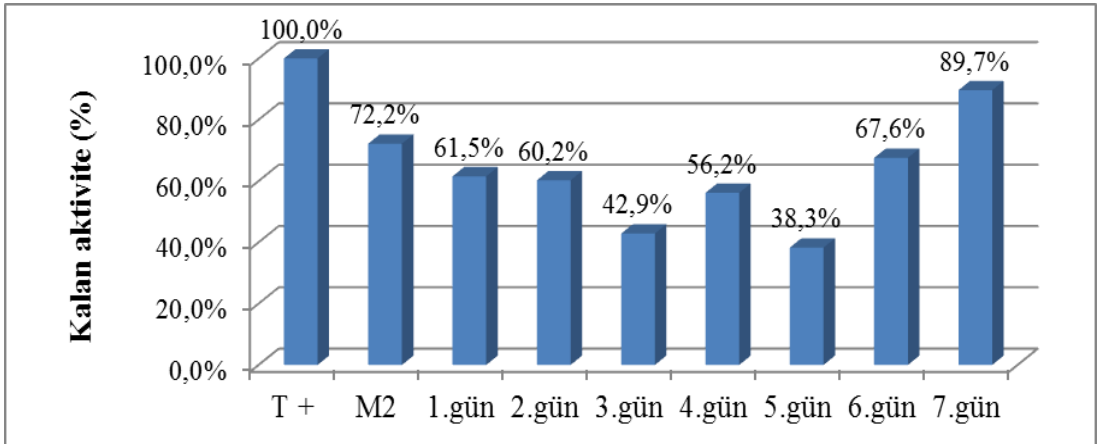
Şekil 28. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M7 besiyerinde kalan aktiviteleri



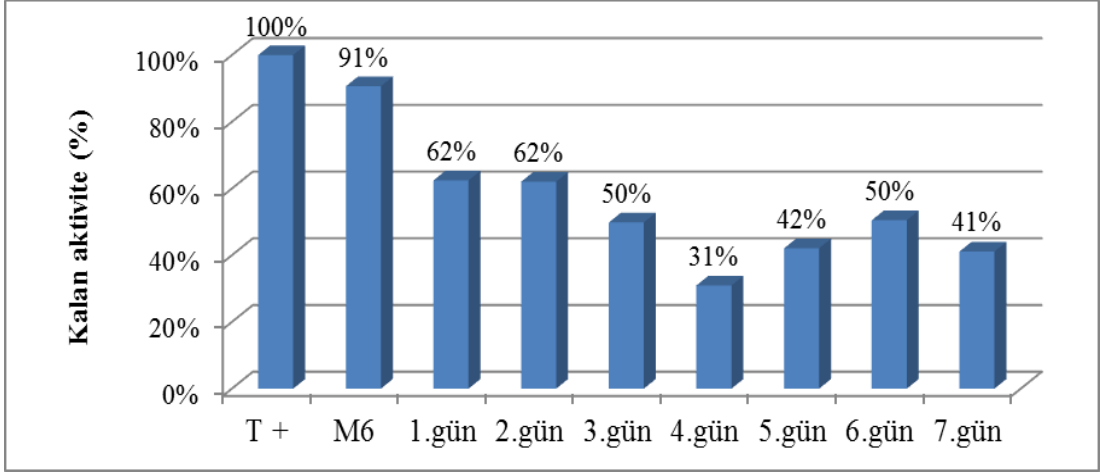
Şekil 29. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M1 besiyerinde kalan aktiviteleri



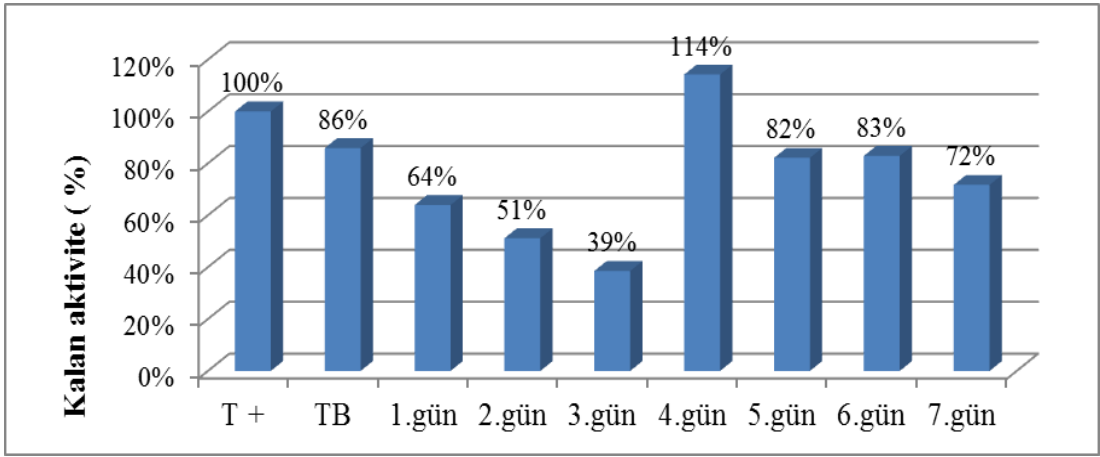
Şekil 30. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M65 besiyerinde kalan aktiviteleri



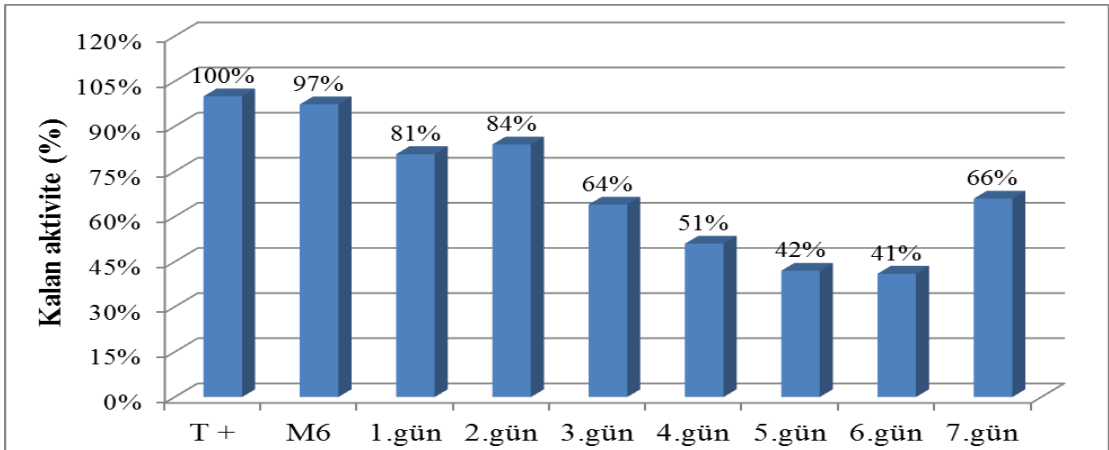
Şekil 31. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M2 besiyerinde kalan aktiviteleri



Şekil 32. *Streptomyces auratus* DSM41897 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri



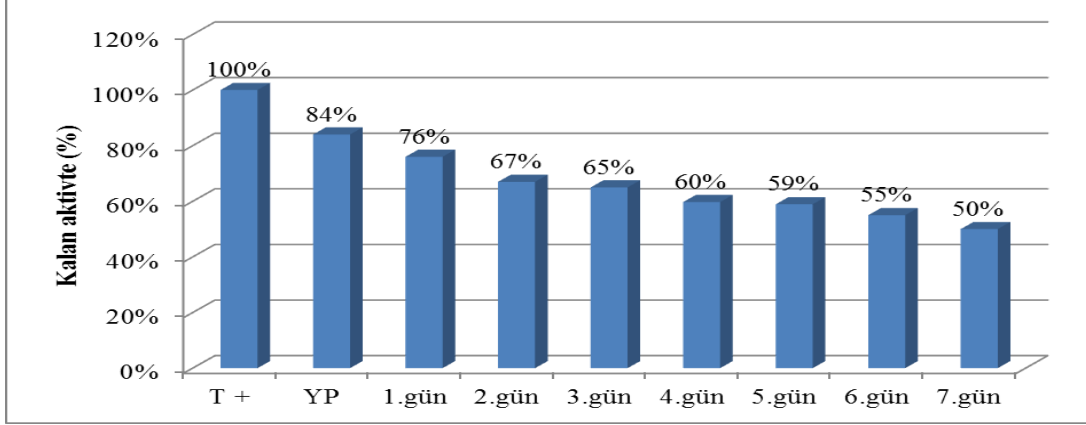
Şekil 33. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun TB besiyerinde kalan aktiviteleri



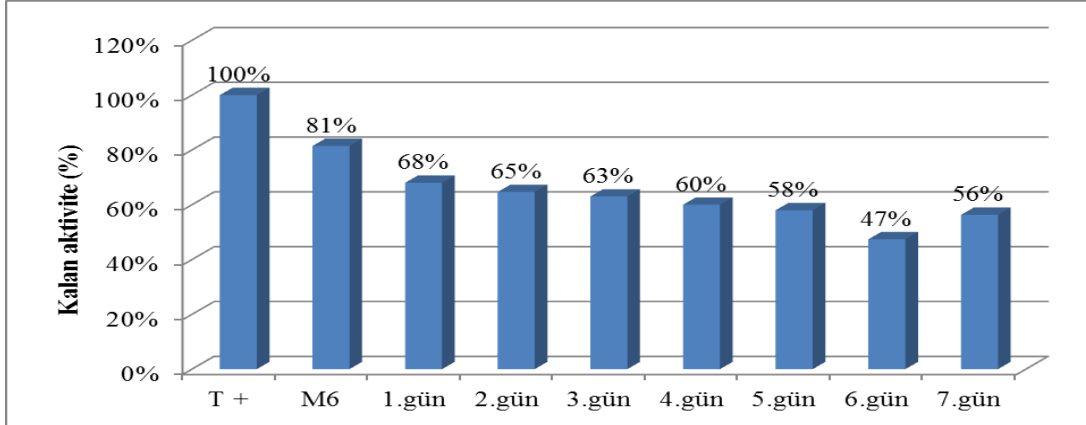
Şekil 34. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri

3.5. İkinci Aşama Üretimi

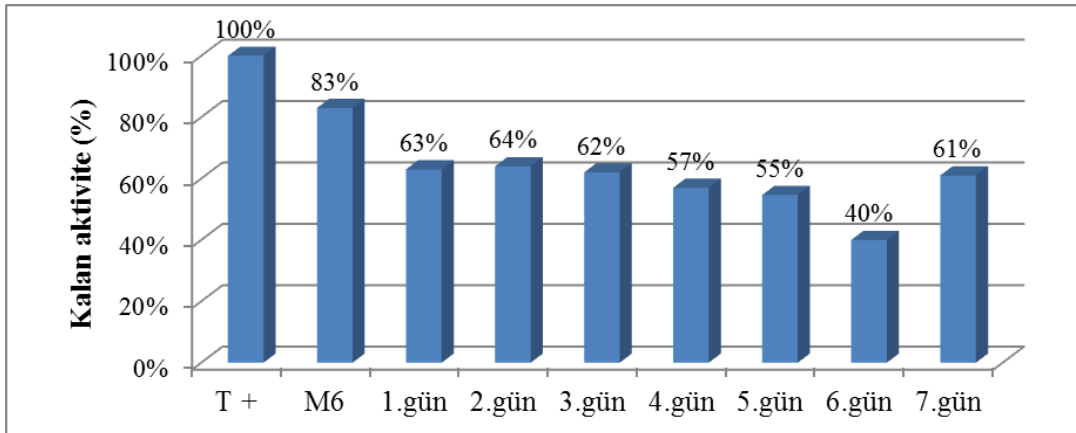
Streptomyces griseus subsp. *griseus* DSM41107, *S. griseus* subsp. *griseus* DSM40693, *S. rimosus* subsp. *paramomycinus* DSM41429, *S. auratus* DSM41897, *S. fradiae* DSM40063, *S. antibioticus* DSM40234 suşlarının ilgili 50 mL besiyerlerine ait sonuçlar Şekil 35-45 arasında yer almaktadır.



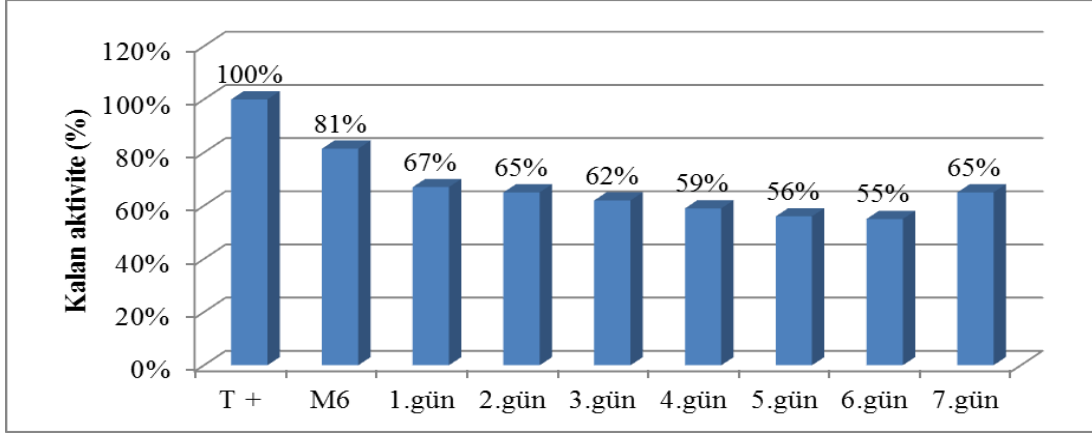
Şekil 35. *Streptomyces auratus* DSM41897 suşunun YP besiyerinde kalan aktiviteleri



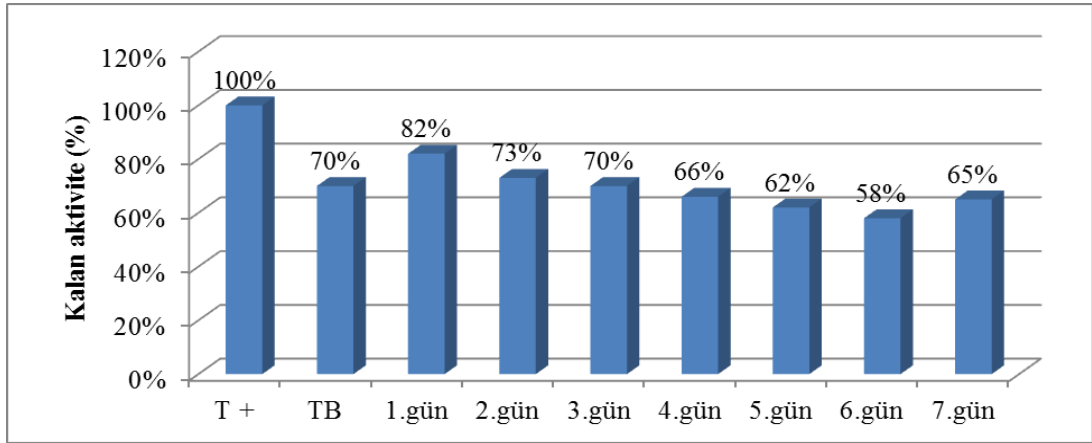
Şekil 36. *Streptomyces auratus* DSM41897 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri.



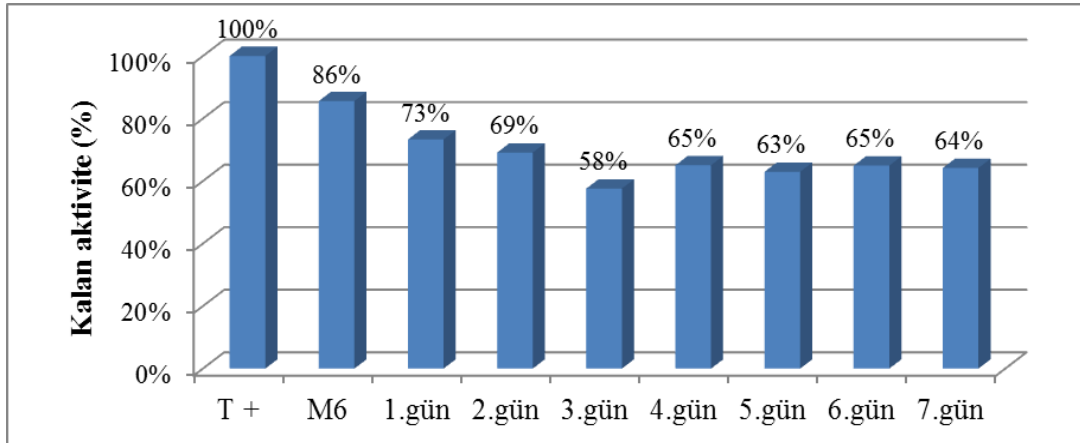
Şekil 37. *Streptomyces antibioticus* DSM40234 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri



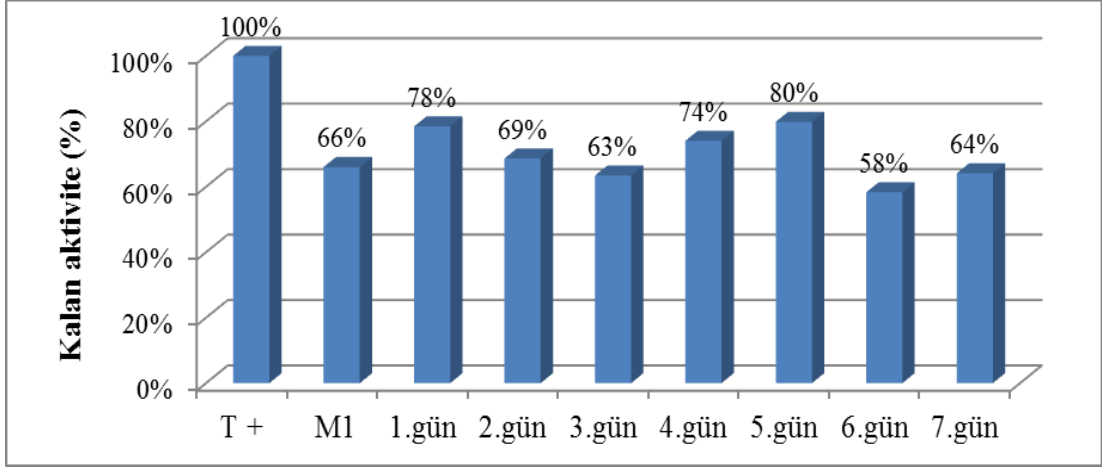
Şekil 38. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde kalan aktivite (%)



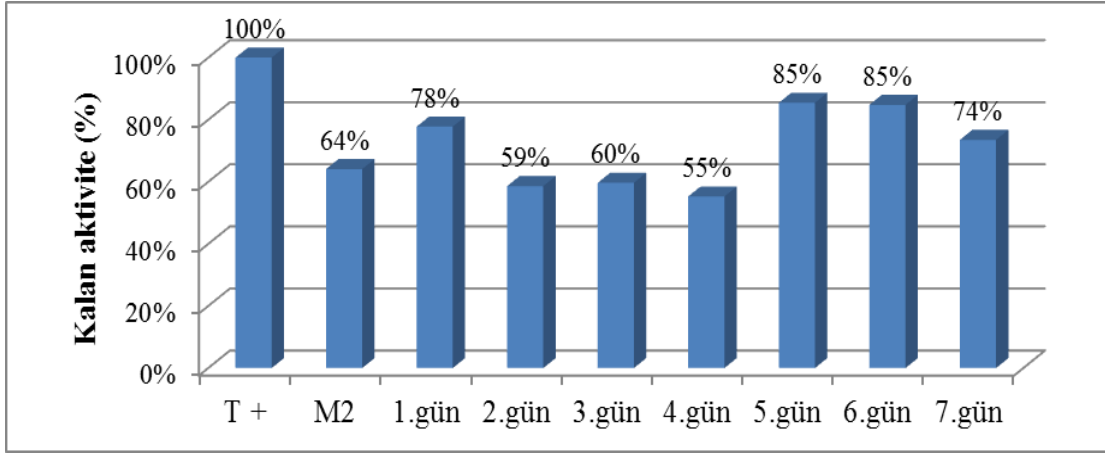
Şekil 39. *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun TB besiyerinde kalan aktivite (%)



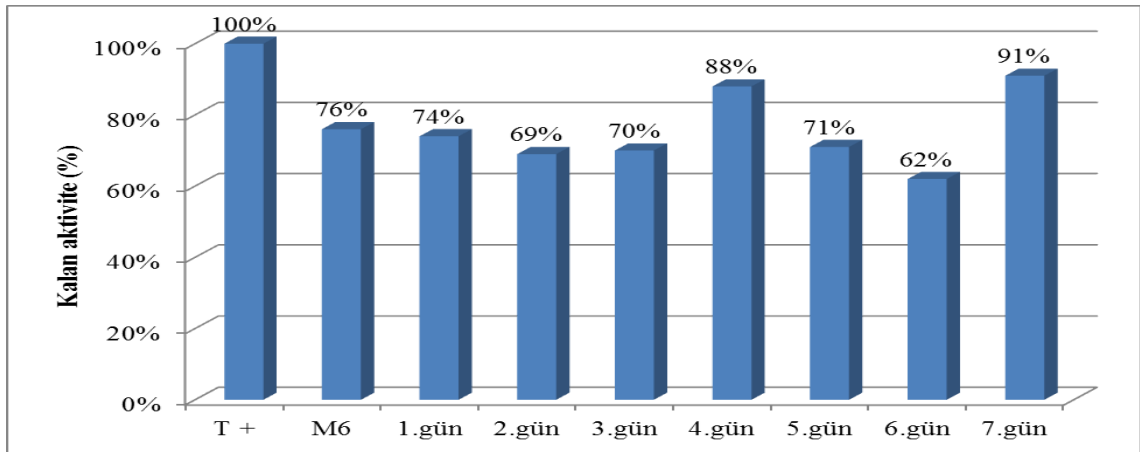
Şekil 40. *Streptomyces fradiae* DSM40063 suşunun M6 besiyerinde kalan aktivite (%)



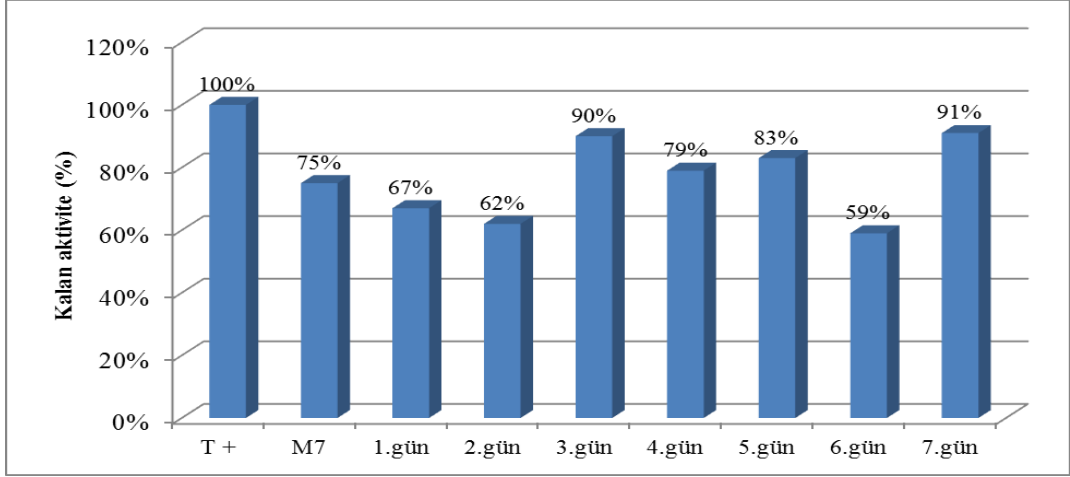
Şekil 41. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M1 besiyerinde kalan aktiviteleri



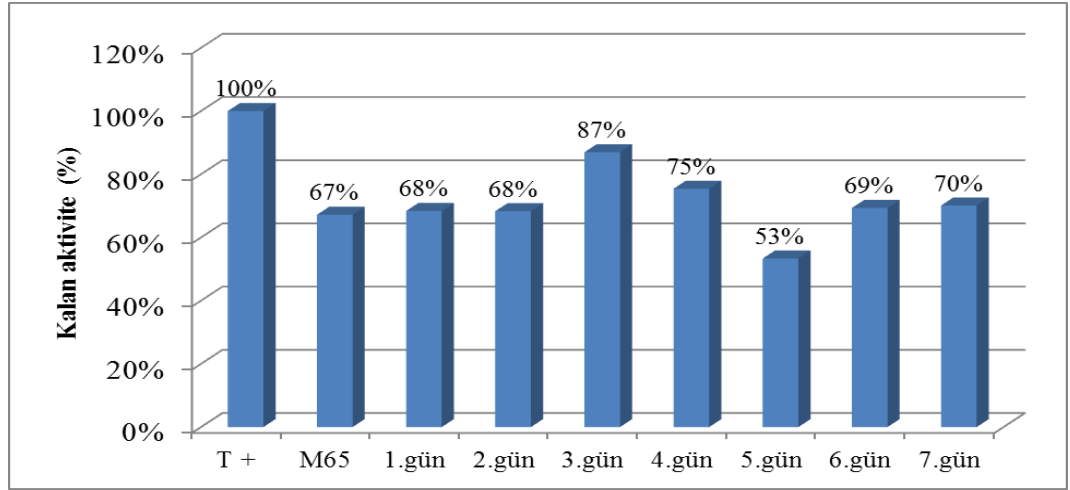
Şekil 42. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M2 besiyerinde kalan aktiviteleri



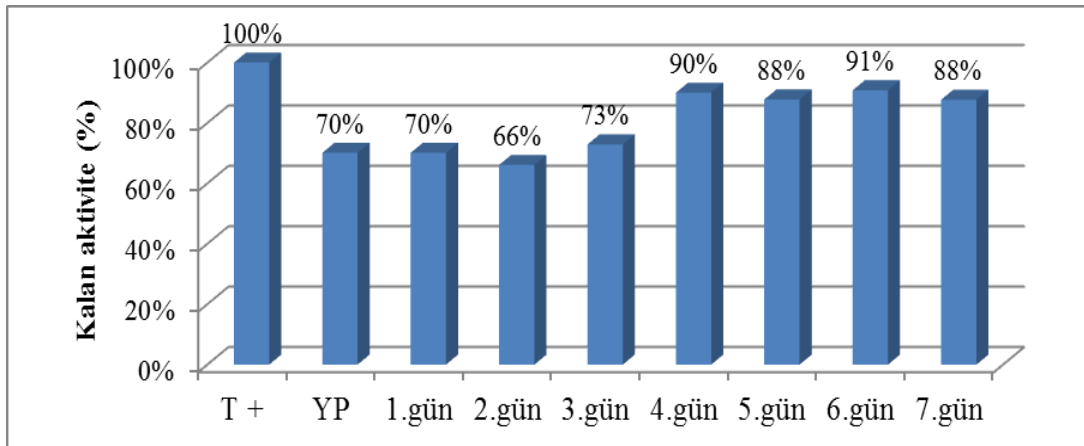
Şekil 43. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M6 besiyerinde kalan aktiviteleri



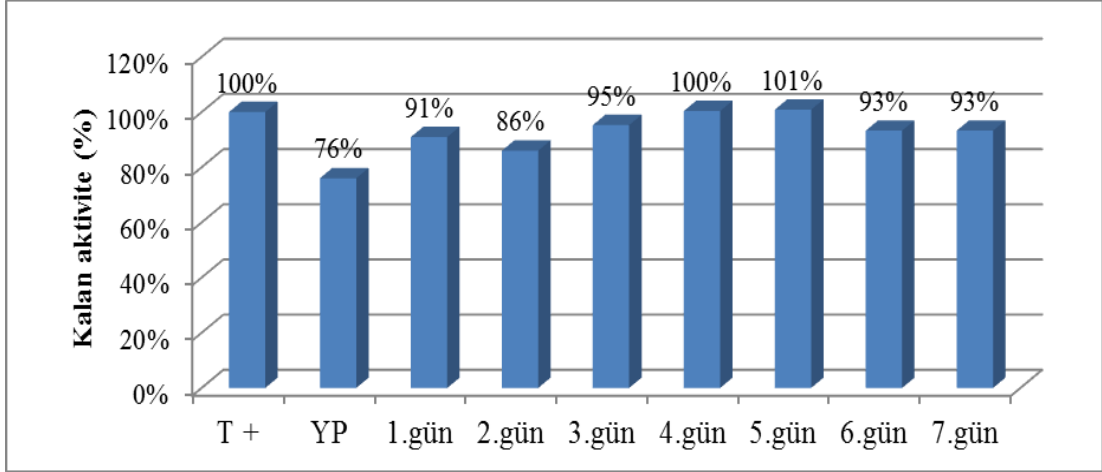
Şekil 44. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M7 besiyerinde kalan aktiviteleri



Şekil 45. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M65 besiyerinde kalan aktiviteleri



Şekil 46. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun YP besiyerinde kalan aktiviteleri



Şekil 47. *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM40693 suşunun YP besiyerinde kalan aktiviteleri

3.6. Büyük Hacimde Üretim

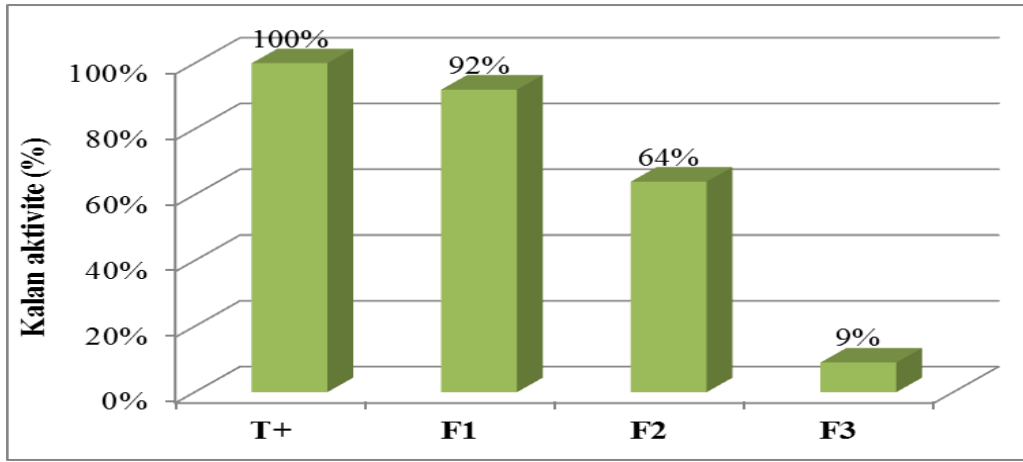
Streptomyces griseus DSM41107 suşunun M6 besiyerinde 500 mL'lik ve TB besiyerinde 300 mL'lik, *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun YP ve M6 besiyerlerinde, *Streptomyces auratus* DSM41897 suşunun da M6 ve YP besiyerinde, *S. antibioticus* DSM40234 suşunun M6 besiyerinde 100'er mL'lik üretimleri yapıldı. Ardından besiyerleri, ilgili suşun maksimum düzeyde inhibitör etki gösterdiği gün süresince inkübe edildi.

3.7. Ekstraksiyon ve Kısmi Saflaştırma

Büyük hacimde üretimle elde edilen fermentasyon sıvıları ekstrakte edilmesiyle. *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde üretiminden 53.3 mg ham ekstrakt elde edildi. Bu ekstraktın 31.2 mg/mL (DMSO ile) ve 22.1 mg/mL (Etil asetat ile) konsantrasyonlu ve 23.68 mg/mL (DMSO ile) konsantrasyonlu M6 ekstraktları elde edildi. Preparatif TLC plakasına yüklenen 22.1 mg/mL *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/M6 ekstraktının yürütme sonrasında plakada oluşan bantlar Şekil 48'de verilmiştir.

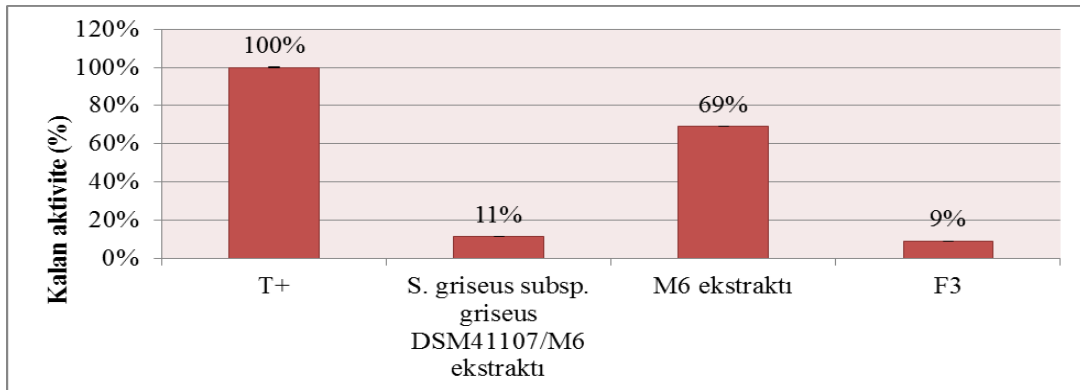


Şekil 48. Preparatif TLC plakasının yürütme sonrası UV altındaki görüntüsü



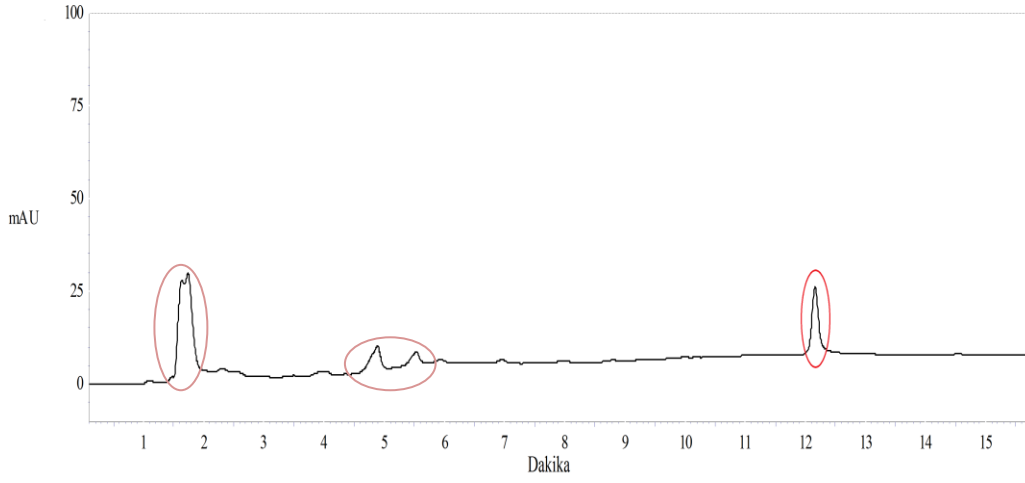
Şekil 49. F1, F2 ve F3 bantlarının 5 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktlarının kalan aktivite grafiği

S. griseus subsp. *griseus* DSM41107/M6 ekstraktı, M6 besiyeri ekstraktı ve F3'ün DMSO ile hazırlanan ekstraktlarının lipolitik aktivite testine ilişkin sonuçlar Şekil 50'de gösterilmiştir.



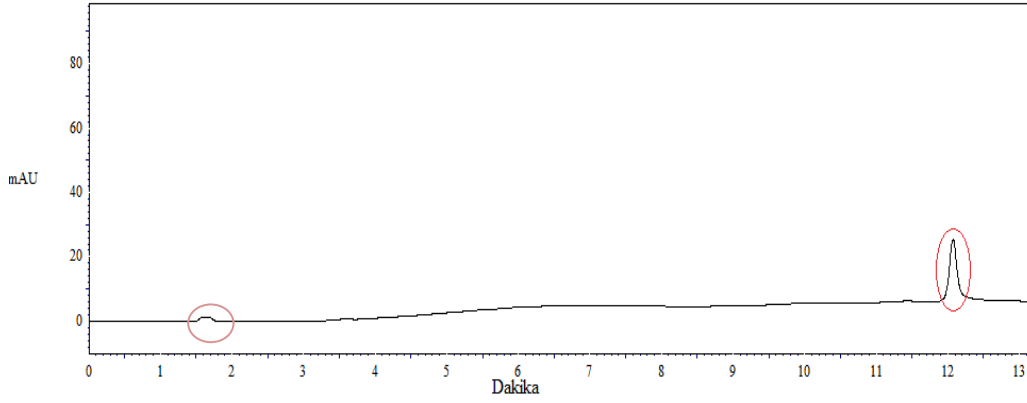
Şekil 50. Ekstraktlara ilişkin kalan aktivite grafiği

Kısmi saflaştırılan ekstraktın HPLC'de alınan spektrumu Şekil 51'de verilmiştir.



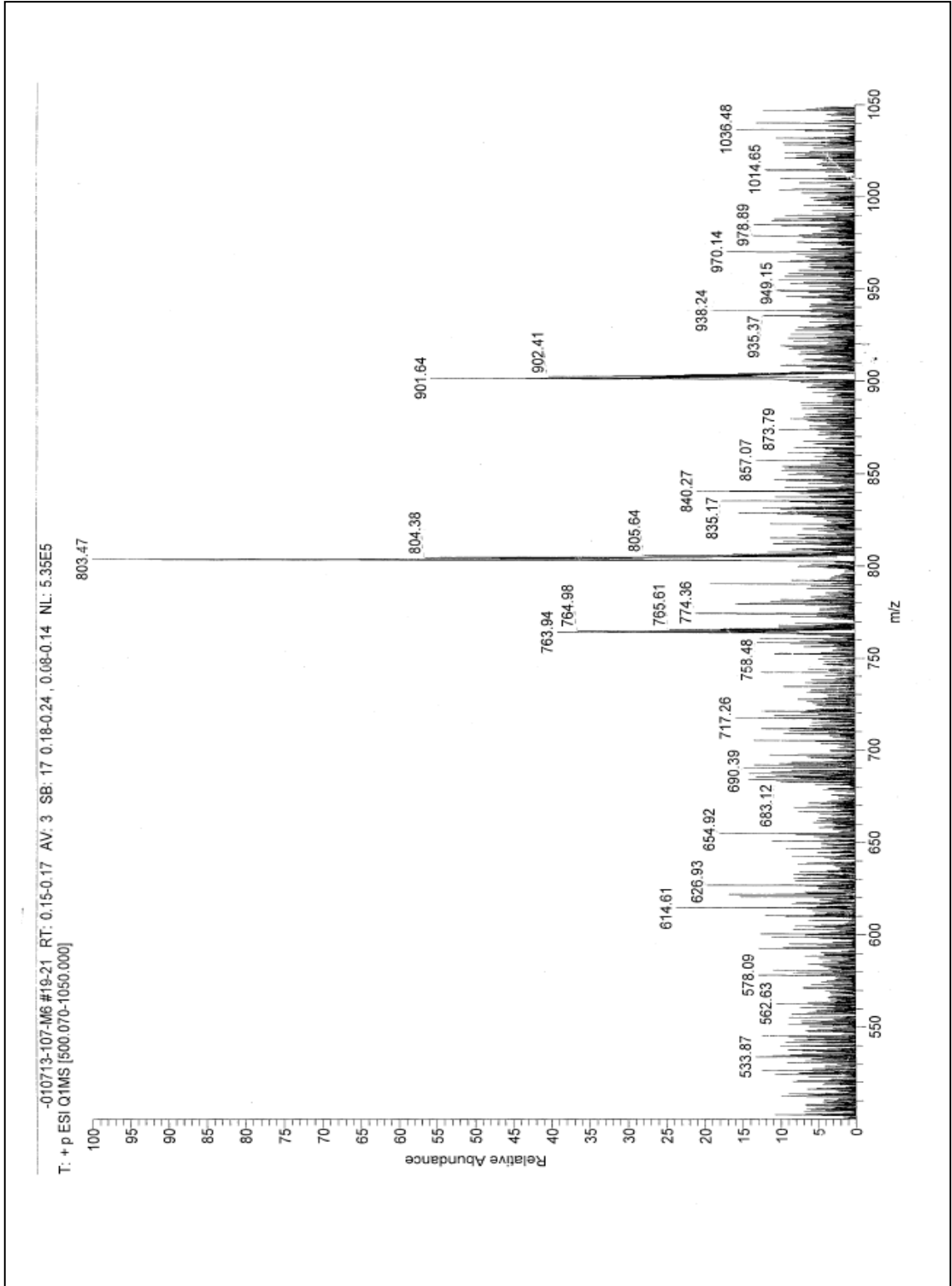
Şekil 51. *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/M6 ekstraktına ait kromotogram

HPLC’de analiz edilen orlistata ait kromotogram (Şekil 52) kısmi saflaştırılan *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/M6 ekstraktına ait kromotograma (Şekil 51) benzemektedir

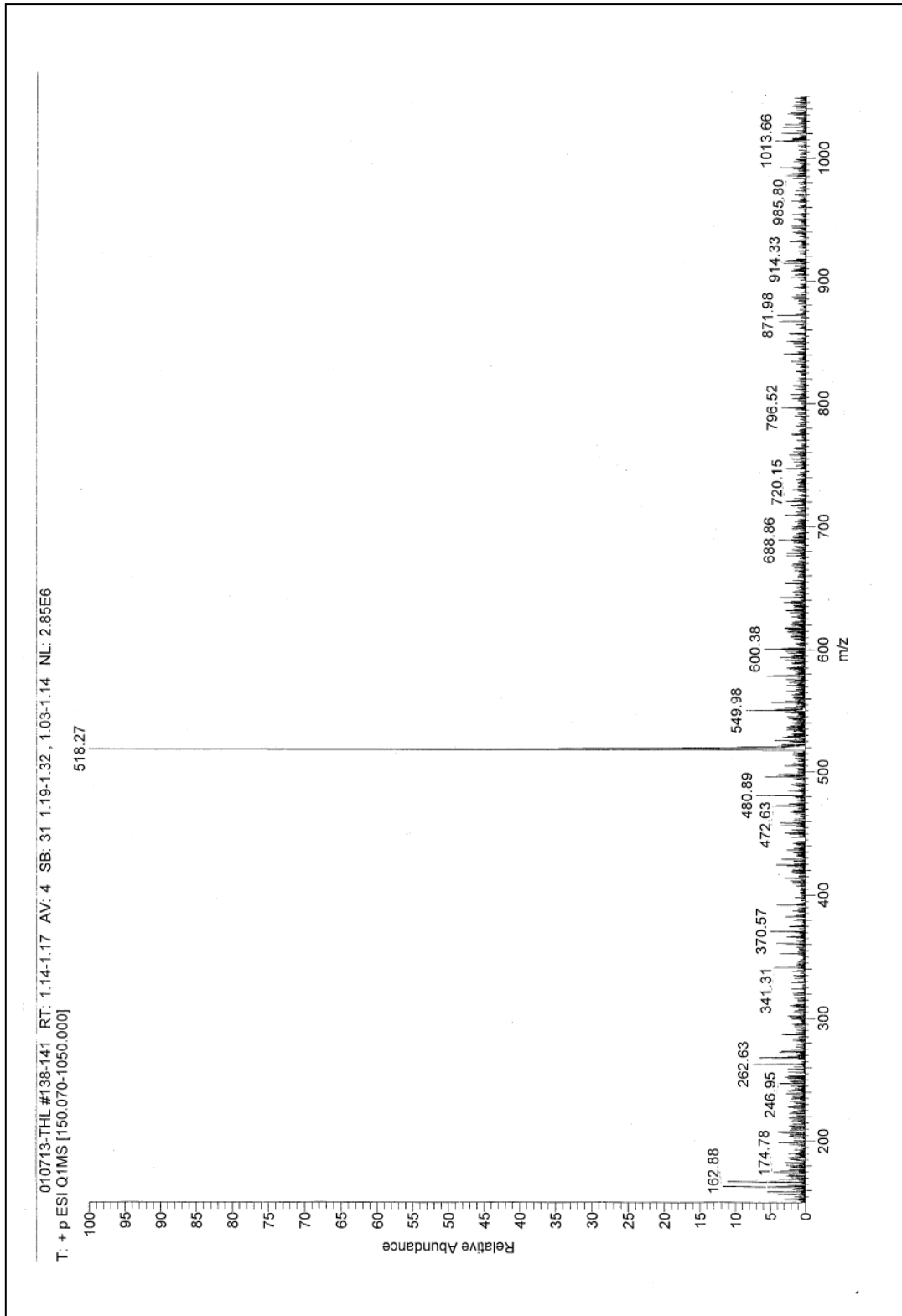


Şekil 52. Orlistata ait HPLC kromotogramı

LC-MS (Thermo Scientific TSQ Access Max) cihazına verilen numune ve orlistata ait pikler sırasıyla Şekil 53 ve Şekil 54'te gösterilmiştir.

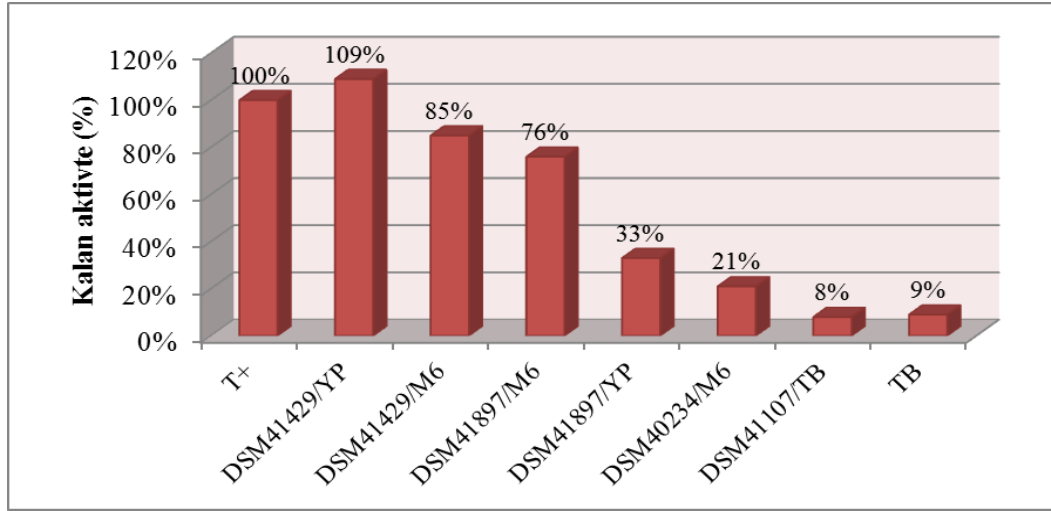


Şekil 53. Numuneye ait MS spektrumu

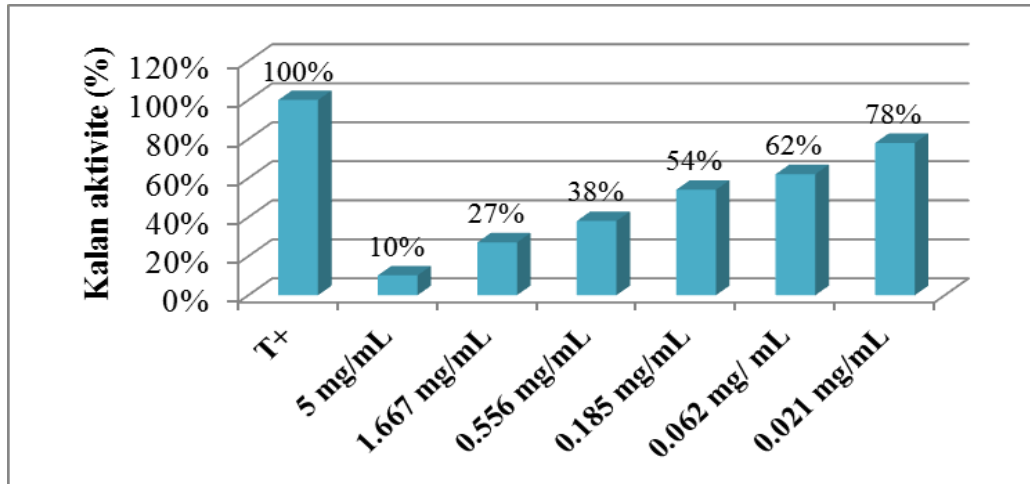


Şekil 54. Orlistata ait MS spektrumu

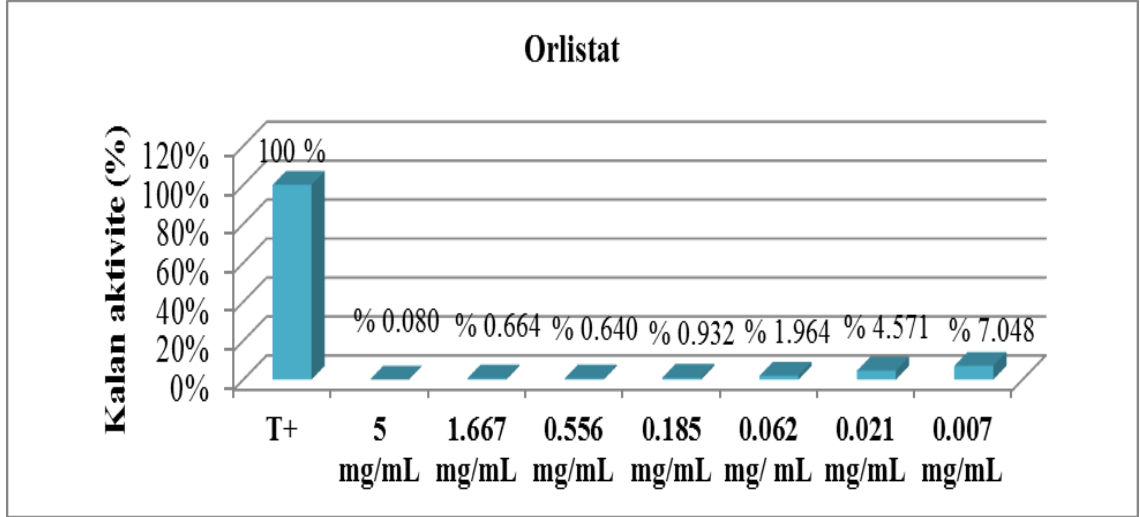
Streptomyces auratus DSM41897 suşunun M6 ve YP besiyerlerinde üretilmesiyle elde edilen ham ekstrakt miktarları sırasıyla 11.2 mg ve 10.3 mg, *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun YP ve M6 besiyerlerinde üretilmesiyle elde edilen ham ekstrakt miktarları sırasıyla 9.4 mg ve 11.7 mg, *S. antibioticus* DSM40234 suşunun M6 besiyerinde üretilmesiyle ham ekstrakte miktarı 4.2 mg'dır. Ekstraktlara ait lipolitik aktivite tayini sonuçları Şekil 55'te verilmiştir.



Şekil 55. 10 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktların kalan aktivite değerleri

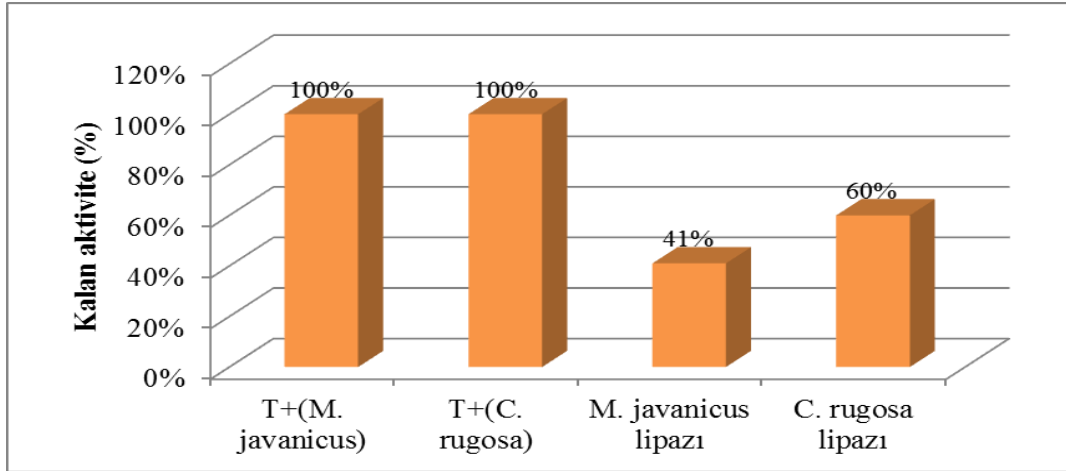


Şekil 56. HPLC'de yaklaşık 12.dk'da toplanan fraksiyonlara ait ekstraktın farklı konsantrasyonlarının DPE'ye karşı inhibitör aktivitesi



Şekil 57. HPLC’de yaklaşık 12.dk’da toplanan otlistat fraksiyonunun DPE’ye karşı inhibitör aktivitesi

3.8. Kısmi Saflaştırılan Metabolitin Bazı Mikrobiyal Lipazlara Karşı İnhibitör Aktivitesinin Ölçülmesi



Şekil 58 . HPLC’de 12.dk’da toplanan fraksiyonlara ait ekstraktın (7 mg/mL) bazı mikrobiyal lipazlara karşı inhibitör aktivitesi

3.8. Florojenik Yönteme İlişkin Sonuçlar

S. griseus subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde üretilmesiyle elde edilen, kolonda kısmi saflaştırılan ve ardından HPLC’de alıkonma süresine göre fraksiyonlara ayrılan ekstraktın yaklaşık 12’nci dk’da toplanan fraksiyonunun, florojenik yöntemle yapılan testte % 90 oranında inhibisyon gösterdiği belirlendi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Fermentasyon Ortamlarının Optimizasyonu

Streptomyces'lerin gelişimleri için genellikle maya özütü, malt özütü ve glukozdan oluşan besiyerleri tercih edilmektedir. Bu besiyerleri bakterilerin gelişmeleri için gerekli olan besleyici maddeleri ihtiva etmektedir, fakat özellikle kompleks yapıdaki sekonder metabolitlerin sentezlenebilmesi için farklı maddelerin ilavesine de ihtiyaç duyulabilmektedir.

Bu çalışmada incelenen suşlar, genel taramada farklı bileşenlere sahip 13 farklı besiyerinde üretilmiştir. Yedi adet suşun, besiyerlerinden hangisinde üretilmesiyle ve ne kadar süre boyunca inkübe edilmesiyle maksimum düzeyde inhibisyonun sağlandığı saptanmaya çalışılmıştır. Böylelikle inhibitör üretimi yönünden hangi besiyerinin tercih edilmesi gerektiği ve kaç günlük inkübasyon süresine ihtiyaç olduğu konusunda bir ön bilgi edinmemizi sağlamıştır. Bu amaçla her bir besiyeri ve suşa ait fermentasyon sıvısından yedi gün boyunca yapılan örnekleme sonuçları, pankreatik lipaz inhibisyonu bakımından test edilmiştir. Genel taramada, M1, M2, M6, M7, M65, YP ve TB besiyerleri öne çıkmış ve hemen hemen bütün suşlar % 50'nin üzerinde inhibisyon göstermiştir. İkinci aşama üretim sonuçları dikkate alındığında, YP, TB, M1, M2 ve M6, M7 besiyerlerinden elde edilen sonuçlar diğer besiyerlerine kıyasla öne çıkmıştır. Büyük hacimde üretimde, *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 ve TB besiyerlerinde üretimi yapılmıştır. Yapılan bu analizler sonucunda, *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşu için M6 olarak isimlendirilen besiyerinin en uygun besiyeri olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında aynı suşun TB besiyerindeki üretimine ait ekstraktın DPE'yi % 92 oranında inhibe ettiği testte TB besiyeri ekstraktı ise % 91 inhibisyon düzeyine (Şekil 55) ulaşmıştır. Dolayısıyla *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/TB ekstraktında gözlemlenen inhibisyonun besiyerinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

M6 besiyeri, nişasta, maya ekstraktı, malt ekstraktı, CaCO₃ içermektedir ve *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun bu besiyerinde, 28 °C'de, 6 gün süren inkübasyonuyla maksimum düzeyde inhibitör etkili metabolit elde edilmiştir. M6 besiyeri bileşenlerinden maya ekstraktı; temelde amino asit, peptid, karbonhidrat ve mineral madde içeriği ile malt ekstraktı; başta maltoz, glikoz, dekstrin, azotlu madde ve mineral madde içeriği ile ve de nişasta, CaCO₃ bileşenleriyle suşun maksimum düzeyde inhibitör etkili metabolit üretimini sağlamıştır.

Streptomyces vayuensis N2 suşunun streptolipin inhibitörü üretiminde kullanılan optimize besiyeri; dekstroz, soya unu, mısır likörü, nişasta ve CaCO₃ bileşenlerinden oluşmakta olup suşun bu besiyerinde 30 °C'de 7 günlük inkübasyonu sonrasında maksimum düzeyde streptolipin inhibitörü elde edilmiştir (Kılaru, 2005).

Ebelakton(lar), üretiminde *Streptomyces* MG7-G1 suşu, gliserin, balık unu ve CaCO₃ içerikli besiyerinde, 27 °C'de 3 günlük inkübasyon süresiyle maksimum düzeyde üretilmiştir (Umezewa vd., 1982).

Orlistat üretiminde kullanılan optimize besiyeri, M6 besiyeri bileşenlerinden oldukça farklı olarak: soya unu, soya peptonu, soya yağı, pamuk tohumu unu, gliserol, Triton- X-100 bileşenlerini içermektedir. Bu besiyerinde, inhibitör üretiminin, 6-7. gün arasında maksimuma ulaştığı bildirilmiştir (Erdei vd., 2005).

Streptomyces sp. MTCC 5219 suşunun inhibitör etkili metabolit üretiminde nişasta, glukoz, soya unu, maya ekstraktı, CaCO₃, NaCl ve MgSO₄'den oluşan besiyeri kullanılmıştır. 28 °C'de 3 gün süren inkübasyon sonrasında maksimum düzeyde inhibitör etkili metabolit üretilmiştir (Tokdar, 2011).

Sonuç olarak; M6 besiyeri, inhibitör madde üretiminde kullanılan optimize besiyerlerinden streptolipin üretiminde tercih edilen besiyeriyle nişasta ve CaCO₃ bileşenleri, ebelakton(lar) üretimi için kullanılan besiyeriyle CaCO₃ bileşeni ve *Streptomyces* sp. MTCC 5219 suşunun inhibitör etkili metabolit üretiminde tercih edilen besiyeri ile nişasta, CaCO₃ ve maya ekstraktı bileşenleri yönünden benzerlik göstermektedir.

M6 besiyeri, *S. antibioticus* DSM40234 suşu için de içermiş olduğu maya ekstraktı, malt ekstraktı, nişasta ve CaCO₃ bileşenleri ile optimize besiyeri olmuştur. Suşun, M6 besiyerinden elde edilen 10 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktının DPE'yi % 79 oranında inhibe ettiği test deney sonuçları (Şekil 55) bunu desteklemektedir.

Maksimum düzeyde inhibitör etkili metabolitin üretimi için gerekli optimum inkübasyon süresi; ebelakton(lar) üretimine göre (3 gün) uzun iken orlistat (6-7 gün) ve streptolipin (7 gün) üretim sürelerine yakın olup 6 gündür.

Çalışmamızda, suşlar arasında önemli farklılıklar bulunmasına rağmen maksimum inhibisyon, çoğunlukla 3. ve 4. günlerde gözlemlendi. İnkübasyon süresinin lipstatin üretimine nazaran kısa olması ve M6 besiyeri bileşiminin diğer besiyeri bileşenlerine nazaran sade oluşu olası maliyetleri kısmen düşürme açısından önemlidir.

4.2. İnhibitör Üretimi

Genel tarama sonuçlarına göre *S. fradiae* DSM40063 suşunun M6 besiyerinde (Şekil 24) gelişimiyle elde edilen örneklemelerin inhibisyon testinde 4. gün örneklemeinin DPE'yi en yüksek düzeyde (% 62) inhibe ettiği saptanmıştır.

S. antibioticus DSM40234 suşunun M6 besiyerinde (Şekil 25) üretimiyle elde edilen örneklemelerin inhibisyon testinde; ilgili suş, 3. günde maksimum düzeyde inhibisyon (% 63) göstermiştir.

S. rimosus subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun YP (Şekil 26), M1 (Şekil 29), M2 (Şekil 31), M6 (Şekil 27), M7 (Şekil 28) ve M65 (Şekil 30) besiyerlerinde gelişimiyle elde edilen örneklemelerin inhibisyon testinde; maksimum düzeyde inhibisyonlar sırasıyla 5. günde (% 72), 2. günde (% 80), 5. günde (% 62), 4. günde (% 74), 5. günde (% 71) ve 3. günde (% 83) gözlemlenmiştir.

S. auratus DSM41897 suşunun M6 (Şekil 32) besiyerinde gelişimiyle elde edilen örneklemelere ait sonuçlarda, maksimum düzeyde inhibisyona 4. günde (% 69) rastlanmıştır.

S. griseus subsp. *griseus* DSM41107 suşunun ise M6 (Şekil 34) ve TB (Şekil 33) besiyerlerinde gelişimiyle elde edilen örneklemelere ait sonuçlarda maksimum inhibisyon düzeyine TB besiyeri örnekleme için 6. günde (% 61), M6 besiyeri örnekleme için 6. günde (% 59) ulaşılmıştır.

İkinci aşama üretimi sonuçları dikkate alındığında; *S. fradiae* DSM40063 suşunun M6 besiyerinde (Şekil 40) maksimum inhibisyon düzeyine (% 42) 3. günde rastlanmıştır. Genel tarama ve ikinci aşama üretimi sonuçları mukayese edildiğinde; inhibisyon derecesinin ikinci aşama üretimde azalması inhibitör madde konsantrasyonunun azalmasına bağlanmış olup maksimum inhibisyonun görüldüğü günler arasında bir bağlantı kurulamamıştır.

S. antibioticus DSM40234 suşunun M6 besiyerinde (Şekil 37) üretimiyle elde edilen örneklemelerin inhibisyon testinde ilgili suş, 6. günde maksimum düzeyde inhibisyon (% 60) göstermiştir. Bu sonuç, genel tarama sonucuyla hem inhibisyon düzeyi hem de maksimum inhibisyonun görüldüğü gün (Şekil 25) açısından farklıdır. İnhibisyonun artan üretim hacminde azalması beklenen bir sonuç iken iki üretim arasında optimum gün yönünden bir bağlantı kurulamamıştır.

Streptomyces auratus DSM41897 suşunun YP besiyerinde (Şekil 35) ve M6 besiyerinde (Şekil 36) maksimum inhibisyonun görüldüğü günler; sırasıyla (% 50) ve (% 53) olarak gözlemlenmiştir.

S. griseus subsp. *griseus* DSM41107 suşunun ise M6 (Şekil 38) ve TB (Şekil 39) besiyerlerinde gelişimiyle elde edilen örneklemelere ait sonuçlarda, maksimum inhibisyon düzeyine M6 besiyeri örnekleme için 6. günde (% 45), TB besiyeri örnekleme için de 6. günde (% 42) ulaşılmıştır. Bu sonuçlar, genel tarama sonucuyla maksimum inhibisyonun görüldüğü günler açısından aynı iken inhibisyon düzeyi daha düşük olarak gözlemlenmiştir bu da inhibitör etkili metabolitin konsantrasyonunun ikinci aşama üretimde artan üretim hacmine bağlı olarak azalması sebebiyle normal karşılanmıştır.

S. rimosus subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun M1 (Şekil 41), M2 (Şekil 42), M6 (Şekil 43), M7 (Şekil 44), M65 (Şekil 45) ve YP (Şekil 46) besiyerlerinde gelişimiyle elde edilen örneklemelerin inhibisyon testinde; maksimum düzeyde inhibisyonlar sırasıyla 6. günde (% 42), 4. günde (% 45), 6. günde (% 38), 2. günde (% 41), 5. günde (% 47) ve 2. günde (% 34) gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, genel tarama sonucuyla mukayese edildiğinde optimum gün genel taramada; M1 besiyeri için 2. gün olarak gözlemlenmiştir. İnhibitör etkili metabolitin 2. günde değil de 6. günde (ikinci aşama üretimi sonucu) maksimum düzeyde üretilmesi sonucu, 2 günlük süre, üretim için çok kısa olduğundan dikkate değer bulunmuştur.

M2 besiyeri için ise genel taramada 5. gün optimum gündür (Şekil 31) ve ikinci aşama üretimde süre daha kısa olup 4. günde maksimum inhibisyon düzeyi gözlemlenmiştir. Optimum gün süresi iki üretim için birbirine yakın olup ikinci aşama üretimde inhibisyon düzeyindeki azalış inhibitör madde konsantrasyonundaki azalışa bağlanmıştır.

M6 besiyeri için; genel taramada optimum gün, 4. gün (Şekil 27, % 74) iken ikinci aşamada bu süre yine 4. gün olarak tespit edilmiştir. İkinci aşama üretimde artan üretim hacmine bağlı olarak inhibitör madde konsantrasyonundaki azalış sonucunda inhibisyon düzeyi (Şekil 35, % 38) de azalmıştır.

M7 besiyeri için; genel taramada optimum gün, 5. gün (Şekil 28, % 71) iken ikinci aşamada bu süre uzamış ve 6. gün olarak tespit edilmiştir. İkinci aşama üretimde artan üretim hacmine bağlı olarak inhibitör madde konsantrasyonundaki azalış sonucunda inhibisyon düzeyi (Şekil 44, % 41) de azalmıştır.

M65 besiyeri için; genel taramada optimum gün, 3. gün (Şekil 30, % 84) iken ikinci aşamada bu süre uzamış ve 5. gün olarak tespit edilmiş; dolayısıyla günler arasında bağlantı kurulamamıştır. İkinci aşama üretimde artan üretim hacmine bağlı olarak inhibitör madde konsantrasyonundaki azalış sonucunda inhibisyon düzeyi (Şekil 45, % 47) de azalmıştır.

YP besiyeri için; genel taramada optimum gün, 5. gün (Şekil 26, % 72) iken ikinci aşama üretimde bu süre kısalmış ve 2. gün (Şekil 46, % 34) olarak tespit edilmiştir. İkinci aşama üretimde, kalan enzim aktivitesi 2. günden sonra artış göstererek 5. günde % 88'e (Şekil 46) ulaşmıştır. Dolayısıyla optimum gün süresi, iki üretim için birbirinden oldukça farklı olduğundan aralarında bağlantı kurulamamıştır.

Streptomyces auratus DSM41897 suşunun YP besiyerinde ikinci aşama üretim sonuçlarına (Şekil 35) göre inhibisyon düzeyi 1. günden 7. güne kadar düzenli olarak artmış ve 7. günde maksimum düzeye (% 50) ulaşmıştır.

Streptomyces auratus DSM41897 suşunun M6 besiyerinde ikinci aşama üretim sonuçlarına (Şekil 36) göre ise inhibisyon düzeyi 1. günden 6. güne kadar düzenli olarak artarken 7. günde azaldı. Maksimum inhibisyon 6. günde gözlemlenmiş olup % 47'dir.

Genel tarama sonuçları ile ikinci aşama üretimi sonuçlarının farklılık göstermesinin bakteri prekültürlerinden ya da inkübasyon sırasında köpüklenmeden de kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Suş prekültürlerinde bakteri gelişiminin yetersiz düzeyde kalması ve besiyerinin köpüklenmesiyle üretilen metabolitlerin okside olması inhibisyon düzeyinin azalmasına neden olacaktır.

Öte yandan üretilen sekonder metabolitler çok düşük miktarlarda olabilmekte, bu da inhibisyonun belirlenmesinde sıkıntılara neden olabilmektedir. Bu sebeple *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde büyük hacimde üretilmesiyle elde edilen fermentasyon sıvısının ekstraksiyonuyla az miktarda üretilen metabolitlerin konsantre edilmesi sağlanmıştır. Lipolitik aktivite testi sonucunda; ekstraktın, 31.2 mg/mL konsantrasyonda dilüsyonunun, DPE'yi % 89 oranında inhibe ettiği (Şekil 50) belirlenmiştir. Bu oran, hipotezimizi doğrulamaktadır ve elde edilen sonuç ilgili suşun genel tarama sonucu (Şekil 34) ve ikinci aşama üretim sonucuyla (Şekil 38) paralellik göstermektedir.

HPLC'de yaklaşık 12.dk'da toplanan fraksiyonlardan elde edilen ekstraktın; 5 mg/mL, 1.667 mg/mL, 0.556 mg/mL, 0.185 mg/mL, 0.062 mg/mL ve 0.021 mg/mL farklı konsantrasyonlu dilüsyonları hazırlanmış ve bu dilüsyonların, DPE üzerine

inhibitör etkisi test edilmiştir. Dilüsyonlara ait inhibisyon düzeyleri, sırasıyla % 90, % 73 , % 62 , % 46, % 38 ve % 22 (Şekil 56) olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla metabolitin, DPE'yi doza bağımlı olarak inihibe ettiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada orlistatin da aynı konsantrasyonlu dilüsyonları hazırlanmış ve yapılan inhibisyon testinde ise sırasıyla % 99.92, % 99.34, % 99.36, % 99.07, % 98.04 ve % 95.43 (Şekil 57) düzeylerinde inhibisyon gözlemlenmiştir. Orlistata ait sonuçlar, elde edilen metabolit ile mukayese edildiğinde; orlistatin inhibisyonda daha etkili olduğu ve inhibisyon derecesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

İnoküle edilmemiş M6 besiyerinin, DPE'ye etkisinin incelenmesi için besiyerinden de ekstraksiyon yapılmış ve elde edilen 23.68 mg/mL konsantrasyonlu besiyeri ekstraktının, DPE'yi % 31 oranında inihibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 50). HPLC'den elde edilen fraksiyonun 5 mg/mL konsantrasyonlu dilüsyonunun, % 90 inhibisyon göstermesi dikkate alındığında; sözkonusu inhibisyonun, besiyerinden kaynaklanmadığı, *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde üretmiş olduğu metabolitten ileri geldiği saptanmıştır.

Streptomyces rimosus subsp. *paromomycinus* DSM41429 suşunun 100 mL YP ve M6 besiyerlerinde üretilmesiyle elde edilen ekstraktlara uygulanan inhibisyon testinde, *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429/M6 ekstraktının DPE'yi % 15 oranında inihibe ettiği *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus* DSM41429/YP ekstraktının ise inhibitör etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir (Şekil 55). Bu sonuçlar M6 besiyerindeki üretim için; genel tarama sonucundan (Şekil 27, % 74 inhibisyon) farklı iken ikinci aşama üretim sonucuna (Şekil 43, % 38 inhibisyon) benzerlik göstermektedir. YP besiyerinden elde edilen sonuç (Şekil 55), YP besiyerinden elde edilen genel tarama sonucuyla (Şekil 26, % 72 inhibisyon) ve ikinci aşama sonucuyla (Şekil 46, % 34 inhibisyon) mukayese edildiğinde; sonuçlar arasında bir ilişki kurulamamıştır.

Streptomyces auratus DSM41897 suşunun da 100 mL M6 ve YP besiyerlerinde üretiminden elde edilen 10 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktları sırasıyla % 24 ve % 67 oranında inhibisyon göstermiştir (Şekil 55). Bu sonuçlar, ikinci aşama üretim sonuçlarını (Şekil 35 ve Şekil 36) destekler nitelikte bulunmuştur.

S. antibioticus DSM40234 suşunun 100 mL M6 besiyerinde üretiminden elde edilen 10 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktı % 79 oranında inhibisyon göstermiştir

(Şekil 55). Bu sonuç, genel tarama ve ikinci aşama üretimde gözlemlenen inhibisyon düzeylerine (Şekil 37) göre daha yüksek olup beklenen bir sonuçtur.

S. griseus subsp. *griseus* DSM41107 suşunun 100 mL TB besiyerinde üretiminden elde edilen 10 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktı % 92 oranında inhibisyon göstermiştir. Aynı testte TB besiyeri ekstraktı % 91 oranında inhibisyon gösterdiğinden sözkonusu inhibisyonun besiyerinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil 55). Ayrıca suşun TB besiyerinde ikinci aşama üretim sonucu (Şekil 39) bu düşüncüyü desteklemektedir.

HPLC’de yaklaşık 12.dk’da toplanan fraksiyon (7 mg/mL), *C. rugosa* ve *M. javanicus* mikrobiyal lipazlarına karşı inhibitör aktivitesi test edilmiştir. 7 mg/mL konsantrasyonlu ekstraktın *C. rugosa* ve *M. javanicus* lipazlarını sırasıyla % 40 ve % 59 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 58). *C. rugosa* ve *M. javanicus* lipazlarına yönelik daha önce yapılan herhangi bir inhibisyon testine rastlanmamış olup metabolitin farklı lipazlara etki edip etmediğini test etmek amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, metabolitin pankreatik lipaza karşı inhibitör etkisinin doğrulanması açısından önemlidir.

S. griseus subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde üretilmesiyle elde edilen ve HPLC’de yaklaşık 12’nci dk’da toplanan fraksiyonun florojenik yöntemle yapılan inhibisyon testinde; fraksiyon, DPE’yi % 90 oranında inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla spektrofotometrik yöntemle yapılan testte gözlemlenen inhibisyon oranı (Şekil 56) florojenik yöntemle de doğrulanmıştır.

4.3. Ekstraksiyon

S. griseus subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 fermentasyon ortamında üretmiş olduğu inhibitörün ekstraksiyonu için etil asetat kullanıldı. Etil asetat:fermentasyon sıvısı oranının 2:1 (v:v) olarak ayarlanarak yapıldı. Alternatif olarak etil asetat:fermentasyon sıvısı oranı 1:1 (v:v) olarak ayarlanıp, sulu fazın tekrar ekstrakte edilmesiyle ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Etil asetatla yapılan ekstraksiyonun yanında, 1:2 (v:v) fermentasyon sıvısı: (Etil Asetat:Butanol (1:1, v:v)) oranı, 1:1 (v:v) fermentasyon sıvısı:(Aseton:H₂O (1:1, v:v)) ve 1:1 (v:v) (fermentasyon sıvısı):(Aseton:Petrol eteri (1:2, v:v)) çözücü sistemi denemeleri yapılmış etil asetatla yapılan sıcak ekstraksiyon işleminde karar kılınmıştır.

İnhibitör üretimiyle ilgili yapılan çalışmalarda ekstraksiyon için tercih edilen optimum çözücü, streptolipin ekstraksiyonu için etil asetat olup canlı kütle:çözücü

oranı 1:40 (w:v) olarak ayarlanıp 1 saat, 30 °C'de ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildiğinde inhibitör madde geri kazanımı maksimum düzeyde olmuştur (Kilaru, 2005). Orlistat ekstraksiyonunda ise izo-bütil asetat, methanol, asetonitril, hegzan ya da heptan, metanol-su karışımı çözücülerinin sırasıyla uygulandığı beş adımdan oluşan bir ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır (Erdei vd., 2005). *Streptomyces* sp. MTCC 5219 suşunun inhibitör etkili metabolitinin ekstraksiyonu için etil asetat kullanılmışken, ebelakton(lar)ın ekstraksiyonunda bütanol:su (v:v) ya da bütil asetat:su (v:v) çözücülerıyla birkaç saat muamele edilerek yapılmıştır (Tokdar, 2011; Umezeawa vd., 1982).

Çalışmamızda etil asetatla yapılan sıcak ekstraksiyon ve çözücünün uçurulmasıyla 53.3 mg/mL ham ekstrakt elde edilmiştir. Bu ekstraktan DMSO ile hazırlanan 31.2 mg/mL konsantrasyonlu dilüsyonu lipolitik aktivite testi için ayrılmış etil asetat ile hazırlanan 22.1 mg/mL konsantrasyonlu ekstrakt kısmi saflaştırma için kullanılmıştır. Bu ekstrakt, preparatif TLC plakasına spotlanmış ve bileşenlerin ayrılması sağlanmıştır. Fraksiyonlar F1, F2 ve F3 olarak isimlendirilmiş (Şekil 48), her bir fraksiyon plakadan kazınarak alınmış, tekrar test edilmiştir. Bu fraksiyonlardan F3'ün inihibisyon yönünden aktif olduğu belirlenmiştir. 5 mg/mL konsantrasyonlu F3 ekstraktı DPE'yi % 91 oranında (Şekil 49) inhibe etmiştir. Ancak HPLC'de elde edilen fraksiyon % 90 inhibisyon oranıyla (Şekil 56) daha düşük inhibisyon düzeyine sahiptir.

4.4. Biyoaktif Molekülün Belirlenmesi

Yapılan HPLC analizinde, *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde üretimiyle elde edilen inhibitör etkili metabolitin, orlistat ile aynı alıkonma zamanına sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, başlangıçta iki metabolitin aynı olması mümkün mü sorusunu akıllara getirmiş; ancak inhibisyon testlerinde gözlemlenen sonuçlar (Şekil 56 ve Şekil 57) ve MS'de alınan spektrumlar (Şekil 53 ve Şekil 54) bu hipotezi çürütmüştür. Kısmi saflaştırılan *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/M6 ekstraktına ve orlistata ait HPLC kromotogramında 1. ve 2. dakikalar arasında gözlenen pikin çözücü metanole ait olduğu; ayrıca 4. ve 6. dakikalar arasında gözlenen *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/M6 ekstraktına ait piklerin metabolite ait safsızlık(lar) olduğu kanısına varılmıştır.

MS'de alınan orlistata ait spektrumda gözlenen 518.27 g/mol kütleli bileşiğin 495.713 g/mol kütleli orlistata Na bağlanmasıyla oluştuğu düşünülmüştür. Öte yandan

kısmi saflaştırılan *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/M6 ekstraktına ait MS spektrumuna, HPLC kromotogramında 4. ve 6. dakikalar arasında gözlemlenen safsızlık(lar)a ait pikler nedeniyle bir yorum getirilememiştir.

5. ÖNERİLER

Kısmi saflaştırma ve HPLC’de yapılan ilave bir istenmeyen bileşenlerden arındırma işlemi, elde edilen inhibitör etkili metabolitin etkinliğinin ölçüsüyle birebir bağlantılı olduğu için bu işlem aşamalarında kullanılan parametreler oldukça önemlidir. Dolayısıyla metabolitin saflık derecesini artırmak için kısmi saflaştırmada kullanılan kolon boyutu değiştirilebilir belki daha uzun olabilir ve yine bu işlem aşamasında kullanılan çözücü ve çözücü kombinasyonları değiştirilerek, fazlaştırılarak farklı denemeler yapılabilir.

Lipaz inhibisyonunu sağlayan metabolitler, yağların sindirimiyle doğrudan ilişkilidir. Orlistat, streptolipin, ebelakton B inhibitörleriyle ilgili olarak fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, pankreatik lipaz enziminin inhibisyonuyla yağların bağırsakta emiliminin azaldığı, dışkıdaki yağ oranının arttığı gözlenmiştir. Orlistat ve streptolipinin; farelerde, serum trigliserid seviyesini ve karaciğer lipid seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. *S. griseus* subsp. *griseus* DSM41107/ M6 ekstraktının da bu yöndeki etkisi test edilebilir.

Streptomyces griseus subsp. *griseus* DSM41107 suşunun M6 besiyerinde üretmiş olduğu inhibitör etkili metabolitin, anti-lipaz aktivitesi dışında ne tür etkilerinin olduğu başka bir araştırma konusu olabilir. Streptolipin metaboliti, antimikrobiyal, antioksidant aktivite testlerine tabii tutulmuş ve bu testler sonucunda peroksit miktarını azaltmaya yönelik etkisi keşfedilmiştir. Bu etki, antioksidant enzim aktivitesini artırarak gerçekleşmektedir. Katalaz enzimi bir antioksidan enzim olup streptolipinle muamele edilen farelerde aktivitesi önemli düzeyde artmıştır. Dolayısıyla bu tür testler çalışmanın çerçevesini genişletme adına örnek alınarak mevcut metabolite de uygulanabilir.

Farklı mikrobiyal lipazlara yönelik yapılan inhibisyon testi sonuçlarının ümit verici olması sağlığa zararlı ve/vaya patojen mikroorganizmalara karşı da metabolitin inhibitör aktivitesinin ölçülmesini teşvik etmektedir. Yapılacak yeni testlerin, ekstraktın, sözkonusu zararlı mikroorganizmalarla mücadelede belki de kullanılabileceği fikrini akıllara getirmiştir.

Büyük hacimde üretim (500 mL ölçüsünde) ile toplamda 53.3 mg ham ekstrakt elde edilmiştir. Bu ekstraktın, lipolitik aktivite testinde, kısmi saflaştırma aşamasında ve HPLC’de fraksiyonlarına ayrılması sırasında büyük bir kısmı harcanmakta ve geriye 5 mg madde kalmaktadır. Dolayısıyla lipaz inhibisyon testleri dışında yapılacak çalışmalar için gerekli miktarda ekstrakta sahip olabilmek için litre düzeyinde üretim

yapılabilmesine imkân sağlayacak fermentöre ve ekstraksiyon sistemine ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Aharonowitz, Y. and Demain, A. L., 1978.** Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14, 159-164.
- Akoh, C.C. and Min, D. B., 1998.** Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification, *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Marcel Deccer, Inc, New York, 641-698.
- Anonim, 2003.** T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Obezite, Diyabet ve Metabolik Hastalıklar Daire Başkanlığı (<http://www.beslenme.gov.tr/index.php?lang=tr&page=42>).
- Anonim, 2010.** T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Türkiye obezite (Şişmanlık)'yle mücadele ve kontrol programı (2010-2014), Ankara, Türkiye, 112 s.
- Anonim. 1992.** Enzyme Nomenclature. Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB), California.
- Antonova-Nikolova, S., Tzekova, N. and Yocheva, L., 2005.** Taxonomy of *Streptomyces* sp. strain 3B. *J. Cult. Collect.*, 4, 36-42.
- Arpigny, J. L. and Jaeger, K. E., 1999.** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343:177-183.
- Balcao, V.M. and Malcata, F.X., 1998.** Lipase catalyzed modification of milk fat. *Biotechnology Advances*, 16, 2, 309-341.
- Berdy, J., 1986.** Further antibiotics with practical application. In *Biotechnology*, vol 4, Ed. by H. Pape & H.J. Rhem, VCH Verlag, Weinheim, 487-505.
- Birari, R. B. and Bhutani, K. K., 2007.** Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*, 12, 19/20.
- Bitou, N., Ninomiya, M., Tsujita, T. and Okuda, H., 1999.** Screening of lipase inhibitors from Marine Algae. *Lipids*, Vol. 34, 5, 441-445.
- Boucher, I., Dupuy, A. and Vidal, P., 1992.** Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 38, 188-193.
- Branca, F., Nikogosian, H. and Lobstein, T., 2007.** The challenge of obesity in the WHO European region and the strategies for response. WHO, Denmark.
- Chakrabarti, R., 2009.** Pharmacotherapy of obesity: emerging drugs and targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13, 195-207.

- Chen, L., Daniel, R. M. and Coolbear, T., 2003.** Review: Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255-275.
- Colagiuri, S., 2010.** Diabetes: Therapeutic options. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12, 463–473.
- Côtes, K., Dhouib, R. and Douchet, I., 2007.** Characterization of an exported monoglyceride lipase from *Mycobacterium tuberculosis* possibly involved in the metabolism of host cell membrane lipids. *Biochemical Journal*, 408, 3, 417–427.
- Cross, T., 1982.** Growth and examination of *Actinomycetes* some guidelines in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins Company, Vol:4, 2340-2343.
- Daniel, J., Deb, C. and Dubey, V. S., 2004.** Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *Journal of Bacteriology*, 186, 15, 5017-5030.
- De La Garza, A. L., Milagro, F. I., Boque, N., Campion, J. and Martinez, J. A., 2011.** Natural inhibitors of Pancreatic Lipase as new players in obesity treatment. *Planta Med.*77(8):773-85.
- Deb, C., Daniel, J., Sirakova, T. D., Abomoelak, B., Dubey, V. S. and Kolattukudy, P.E., 2006.** A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 7, 3866–3875.
- Delorme, V., Diomandé, S. V., Dedieu, L., Cavalier, J. F. and Carrière, F., 2012.** MmPPOX Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Lipolytic Enzymes Belonging to the Hormone-Sensitive Lipase Family and Alters Mycobacterial Growth. *PLoS ONE* 7(9).
- Demain, A.L., 1998.** Induction of microbial secondary Metabolism. *International Microbiology*, 1, 259-264.
- Egan, S., Wiener, P., Kallifidas, D. and Wellington, E. M. H., 1998.** Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within *Streptomyces* isolated from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 5061-5063.
- Ekanem, A. P., Wang, M., Simon, J. E. and Moreno, D. A., 2007.** Antiobesity Properties of two African Plants (*Afromomum meleguetta* and *Spilanthes acmella*) by Pancreatic Lipase Inhibition. *Phytother. Res.* 21, 1253–1255.
- Erdei, J., Gulyas, E., Balogh, G., Toth, L., Keri, V. and Csorvasi, A., 2005.** Fermentation process for lipstatin and method of extracting lipstatin from a fermentation broth. U.S. Patent 6844174B2.

- Ergene, A., 1987.** Toprak Biliminin Esasları, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:635, Atatürk Üniversitesi Basımevi, ISBN: 0116999900792, 560 s.
- Faich, G.A., 1996.** Pharmacotherapy for obesity: Do the benefits outweigh the risks? N Eng J Med 335: 659-60.
- Gondoin, A., Grussu, D., Stewart, D. and McDougall, G. J., 2010.** White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. Food Research International 43, 1537–1544.
- Guerciolini, R., 1997.** Mode of action of orlistat. Int J Obes 21 (Suppl 3), 12-23.
- Hall, A. M., Thomas, G. A., Tiwari, K. S. and Walker, T. K., 1953.** Nutrition of *Acetobacter* species, Archives of Biochemistry and Biophysics, 46(2), 485-7.
- Hochuli, E., Kupfer, E., Maurer, R., Meister, W., Mercadal, Y. and Schmidt, K., 1987.** Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*, chemistry and structure elucidation. The Journal of Antibiotics, Vol.8, 1086-1091.
- Hopmann, C., Kurz, M. And Toti, L., 2003.** Percyquinnin, A process for its Production and its use as A Pharmaceutical, US 6596518 B2.
- Jaeger, K. E, Schneidinger B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Schimossek, K., Zonta, A. and Reetz, M. T., 1997.** Bacterial lipases for biotechnological applications. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 3, 3-12.
- Jaeger, K. E., and Reetz, M. T., 1998.** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Tibtech, Vol (16), 396–403.
- Karanth, N. G., Kilaru, N. B., Rao, L. J. M. and Sattur, A. P., 2007.** A novel compound, useful for pancreatic lipase inhibition and the process for isolation thereof, WO2007049119A1.
- Keating, G. M. and Jarvis, B., 2001.** Orlistat: In the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus. Drugs 61, 2107- 2119.
- Kilaru, N. B., 2005.** Production of novel lipase inhibitor from *Streptomyces* sp., Department of Fermentation Technology and Bioengineering Central Food Technological Research Institute, PhD thesis, University of Mysore, India.
- Korcan, E., 1995.** Topraktan ve havadan izole edilen *Actinomycetes* türlerinin aktivitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Osman Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Lee, S. Y. and Rhee, J. S., 1993.** Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. Enzyme Microb. Technol., 15: 617-623.
- Liu, D-Ze., Wang, F., Liao, T-Gen., Tang, J-Guo., Steglich, W., Zhu, H-Jie. and Liu, J-Kai., 2006.** Vibralactone: A Lipase Inhibitor with an Unusual Fused β -

Lactone Produced by Cultures of the Basidiomycete *Boreostereum vibrans*, Org. Lett.,8 (25), 5749–5752.

- McClendon, K., Riche, D. and Uwaifo, G., 2009.** Orlistat: current status in clinical therapeutics. *Expert Opin Drug Saf*, 8: 727-744.
- McGinnis, J. M. and Foege, W. H., 1993.** Actual causes of death in the United States, *JAMA* 270, 2207-2212.
- Mendoza, L. D., Rodriguez J. A., Leclaire, J., Buono, G., Fotiadu, F., Carrière, F. and Abousalham, A., 2012.** An ultraviolet spectrophotometric assay for the screening of *sn*-2-specific lipases using 1,3- *O*-dioleoyl-2- *O*- α -eleostearoyl-*sn*-glycerol as substrate. *Journal of Lipid Research*, 53, 1, 185-194.
- Metin, M., 2008.** Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi, Ege Üniversitesi Yayınları, Mühendislik Fakültesi Yayın No: 33, Yedinci baskı, ISBN 975-483-279-X, 802 s.
- Mukherjee, M., 2003.** Human digestive and metabolic lipases. *Journal of Molecular CatalysisB: Enzymatic* 22, 369–376.
- Mulcahy, H. E. and Ballinger, A. B., 1999.** Orlistat: a new agent for the treatment of obesity. *The British Journal of Cardiology*, 6, 274-283.
- Mutoh, M., Nakada, N., Matsukuma, S., Ohshima, S., Yoshinari, K., Watanabe, J. and Arisawa, M., 1994.** Panclins, novel pancreatic lipase inhibitors. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *Journal of Antibiotics*. Dec,47(12):1369-75.
- Naidenova, M. and Vladimirova, D., 2002.** Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in Bulgaria. *Journal of Culture Collections*, 3, 15-24.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F. and Kiso, Y., 2005.** Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (11), 4593–4598.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C. and Shinose, M., 2001.** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *PNAS*, 98, 21, 12215–12220.
- Oskay, M. and Tamer, A.U., 2009.** *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Dünyü, Bugünü ve Yarını. *e-Journal of New World Sciences Academy*, 4(2), 48–60.
- Oskay, M., 2009.** Comparison of *Streptomyces* diversity between agricultural and non-agricultural soils by using various culture media. *Scientific Research and Essays*, 4(10), 997-1005.

- Oskay, M., Tamer, A.Ü. and Azeri, C., 2004.** Antibacterial activity of some *Actinomyces* isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3(9), 441-446.
- Öztürk, B., 2002.** Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 12, 20-23.
- Paiva, A. L., Balcao, V. M. and Malcata, F. X., 2000.** Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 187-204.
- Pata, C., Yazar, A., Akbay, E., Ulu, O. ve Konca, K., 2003.** Obezite tedavisinde Orlistat ve Sibutraminin vücut kilosu ve koroner kalp hastalığı risk faktörlerine etkilerinin karşılaştırılması. *Türkiye Tıp Dergisi*, 10(1), 9-13.
- Pencreac'h, G., Graille, J., Pina, M. and Verger, R., 2002.** An ultraviolet spectrophotometric assay for measuring lipase activity using long-chain triacylglycerols from *Aleurites fordii* seeds. *Analytical Biochemistry*, 303, 17-24.
- Petersen, M. T. N., Fojan, P. and Petersen, S. B., 2001.** How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*, 85(2), 119-131.
- Popkin, B. M., Kim, S., Rusev, E. R., Du, S. and Zizza, C., 2006.** Measuring the full economic costs of diet, physical activity and obesity-related chronic diseases. *Obesity reviews* 7, 271-293.
- Radunz, A., He, P. and Schmid, G. H., 1998.** Analysis of the seed lipids of *Aleurites montana* Z. *Naturforsch*, 53, 305-310.
- Robinson, J. and Niswender, K., 2009.** What are the risks and the benefits of current and emerging weight-loss medications? *Current Diabetes Reports*, 9, 368- 375.
- Saraç, N., Boran, R., Ökmen, G. ve Uğur, A., 2008.** Toprak Ve Süt Kökenli Gram Pozitif Bakterilerde Lipaz Üretimi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 1 (2), 23-28.
- Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, J., Beguin, P. and Schneider, Y., 2012.** Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. *Food Chemistry*, 1, 68-73.
- Sharma, N., Seo, S. and Sharma, V. K., 2005.** Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, volume 97(3), 453-456.
- Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U. C., 2001.** Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Slanc, P., Doljak, B., Kreft, S., Lunder, M., Janes D. and Strukelj, B., 2009.** Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytotherapy Research*: 23, 874-877.

- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., and Tsunasawa, S., 1992.** Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. J Biochem., 112(5), 598-603.
- Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., and Kanda, T., 2007.** Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. J Agric Food Chem, 55, 4604-4609.
- Tanakol, R., 2003.** Obezite tedavisinde Orlistat. Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism, (Suppl. 2), 87-97.
- Telefoncu, A., 1993.** Besin Kimyası. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No: 149. İzmir, 172 s.
- Thompson, C., Chiu, M., Christiansen, G., Dale, G., Folcher, M., Li, X-M. and Morris, R., 1999.** Differentiation in *Streptomyces* a procaryotic multicellular developmental system. Biozentrum: Biennial Report., 1-6.
- Tokdar, P., Ranadive, P., Mascarenhas, M., Patil, S. and George, S., 2011.** A new pancreatic lipase inhibitor produced by a *Streptomyces* sp. MTCC 5219. International Journal of Chemical Engineering and Application vol. 2, no. 2, 135-38.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Takeuchi, T., Hamada, M., Kondo, S. and Ishizuka, M., 1982.** Ebelactones and production thereof, US 4358602 A.
- URL-1,2013.**
<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/actinomycetes.htm> (20 Şubat 2013).
- URL-2, 2013.** http://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim_inhibit (23 Mayıs 2013).
- URL-3, 2013.** <http://tr.wikipedia.org/wiki/Trigliserit> (4 Eylül 2013).
- URL-4, 2013.** <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-12.pdf> (10 Haziran 2013).
- URL-5, 2013.** <http://carlasabandar.wordpress.com/> (18 Eylül 2013).
- URL-6, 2013.** <http://maptest.rutgers.edu/drupal/?q=node/50> (22 Şubat 2012).
- URL-7, 2013.** <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Orlistat.svg>.(1 Ocak 2013).
- URL-8, 2013.** <http://www.kocintok.com.tr/detay.php?id=193> (22 Temmuz 2013).
- URL-9, 2013.** http://www.ochemonline.com/TLC_stains (25 Ağustos 2013).
- Verger, R., 1997.** Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. Tibtech Reviews, 15, 32-38.

- Verger, R., Serveau-avesque, C. and Chahinian, H., 2006.** Method for the high-speed detection and/or measurement of a lipase or phospholipase activity. PCT Int. Appl. WO 2006/085009.
- Vining, L. C., 1990.** Functions of secondary metabolites. Annual review of Microbiology, 44, 395-427.
- Waksman, S. A., 1957.** The species concept among the *Actinomycetes* with special reference to the genus *Streptomyces*. Bacteriology Review, 21, 1-29.
- Weibel, E. K., Hadvary, P., Hochuli, E., Kupfer, E. and Lengsfeld, H., 1987.** Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*, producing organism, fermentation, isolation and biological activity. J. Antibiotics, 40, 1081-1085.
- Wendisch, F. K. and Kutzner, H. J., 1991.** The family Streptomycetaceae in prokaryotes. Second edition, Ed. by A. Ballows et al., Springer Verlag, vol. 1, 922-995.
- WHO, 2006.** <http://www.who.int/topics/obesity/en/>.
- Williams, S. T., Goodfellow, M. and Alderson, G., 1989.** Genus *Streptomyces* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4, Williams & Wilkins Company, Baltimore, 2452–2492.
- Woodruff, H. B., 1980.** Natural products from microorganisms. Science, vol. 208, 1225-1229.
- Yallop, C. A., Edwards, C. and Williams, S. T., 1997.** Isolation and growth physiology of novel thermoactinomycetes. Journal of Applied Microbiology, 83(6), 685-692.
- Yamac, M., Isık, K., ve Şahin, N., 2011.** Numerical classification of *Streptomyces* isolated from karstic caves in Turkey. Turkish Journal of Biology, 35(4), 473-484.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Rize’de doğdu. 2009 yılında, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Biyoloji ABD’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi’nde 2009-2011 yılları arasında sırasıyla İngilizce hazırlık ve Bilimsel hazırlık eğitimi aldı. Özel sektörde Gıda Mühendisi ünvanıyla farklı aralıklarla çalıştı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.