

***Rhodotorula mucilaginosa*'DAN LİPAZ ENZİMİ
ÜRETİMİ VE AKTİVİTESİNE ETKİLİ PARAMETRELERİN
BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF PARAMETERS AFFECTING
THE PRODUCTION AND ACTIVITY OF LIPASE ENZYME BY
*Rhodotorula mucilaginosa***

Hamideh HAMMAMCHI

**Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR
Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2014

HAMİDEH HAMMAMCHİ'nin hazırladığı *Rhodotorula mucilaginosa*'DAN Lipaz Enzimi Üretimi ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi adlı çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan
(Prof. Dr.,)

Danışman
(Prof. Dr.,)

Üye
(Prof. Dr.,)

Üye
(Prof. Dr.,)

Üye
(Prof. Dr.,)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında:

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17/ 06 /2013

HAMİDEH HAMMAMCHİ

ÖZET

***Rhodotorula mucilaginosa*'DAN LİPAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE AKTİVİTESİNE ETKİLİ PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ**

Hamideh HAMMAMCHI

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Ocak 2014, 109 Sayfa

Lipazlar (E.C.3.1.1.3; trigliserol açilhidrolazlar) enzim sınıflandırmasında hidrolazlar ana sınıfında yer alan, triaçilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Endüstriyel lipazlar, genellikle hücre dışı lipaz üreten mikroorganizma türlerinden sağlanır. Mikrobiyal lipazlar çoğunlukla sıvı ortamlarda üretilir ve aktiviteleri karbon/azot kaynakları tür ve derişiminden, ortam pH'sından, sıcaklıktan ve metal iyonlarından etkilenir. Bu çalışmada Eskişehir ili Hasanbey Köyünden izole edilen *Rhodotorula mucilaginosa* lipaz kaynağı olarak kullanıldı, lipaz üretiminde önem taşıyan ortam koşulları ile ortam parametreleri incelendi. Karbon kaynakları olarak bitkisel yağlar (zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, mısır özü yağı ve fındık yağı) ve şekerler (glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, maltoz ve sukroz), azot kaynağı (pepton, amonyum sülfat, üre, maya özütü, kazein, amonyum oksalat, amonyum karbonat ve proteose pepton) içeren ortamlarda lipaz aktivitesi incelendi. Optimal ortam koşullarını belirlemek amacıyla, 3.0 – 9.0 başlangıç pH aralığı ve 10 - 40 °C sıcaklık aralığında üretimler yapılarak bu değişkenlerin lipaz aktivitesine etkileri

incelendi. Lipaz üretiminde önem taşıyan reaksiyon ortamı saptandı. Reaksiyon ortamı inkübasyon sıcaklığı 30 – 90 °C ve süresi 30 – 90 dakika aralığında lipaz aktivitesi araştırıldı.

Yapılan deneyler sonucunda *Rhodotorula mucilaginosa*'nın lipaz ürettiği, optimal ortam koşulları olarak pH'nın 5.0, sıcaklığın 30°C, çalkalama hızı 200 r.p.m, karbon kaynağının % 1 derişimde zeytin yağı, en uygun azot kaynağının pepton olduğu belirlendi. Karbon ve azot kaynaklarının zeytin yağı ile birleşmesi sonucunda lipaz aktivitesinin yükseldiği saptandı. Optimal reaksiyon koşulları incelendiğinde, inkübasyon sıcaklığının 60°C, inkübasyon süresinin 50 dakika ve substrat konsantrasyonu %1 oranında zeytin yağı olarak belirlendi. Şeker fabrikası atığı olan melas değerlendirilerek lipaz üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılabileceği saptadı.

Anahtar Kelimeler: Lipaz aktivitesi, Mikrobiyal lipaz üretimi, Optimizasyon,

Rhodotorula mucilaginosa.

ABSTRACT

DETERMINATION OF PARAMETERS AFFECTING THE PRODUCTION AND ACTIVITY OF LIPASE ENZYME BY *Rhodotorula mucilaginosa*

Hamideh HAMMAMCHI

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

January 2014, 109 pages

Lipases (E.C.3.1.1.3; tri glycerol acyl hydrolases) are hydrolizer enzymes which catalyze free fat into glycerol and triglycerid. Industrial lipase commonly is provided by external cellular activity from strains of microorganisms. Microbial lipases are produced in liquid phase and its activity is influenced by concentrations of carbon/nitrogen resources, pH, temperature and metal ions. In this study, *Rhodotorula mucilaginosa* as a lipase source, isolated from the village which is located near Eskisehir city. In the production of lipase, environmental conditions and media components are investigated as a important parameter. Vegetable oils as carbon source (olive oil, sunflower oil, soybean oil, corn oil and peanut oil) and carbohydrate source (gluconic, galactose, fructose, lactose, maltose and sucrose) and nitrogen sources (peptones, ammonium sulfate, urea, yeast extract, casein, ammonium oxalate, ammonium carbonate and proteose peptone) are used for lipase activity investigation. To find the optimal condition, firstly between 3.0 – 9.0 pH and 10 – 40°C several experiments are carried out to detect the effects of these varieants on lipase

production. The reaction conditions as a important parameter in lipase production are detected. Reaction conditions are studied between 30 - 90 centigrades and incubation for 30-90 minutes.

As a result of several experiments for production of lipase from *Rhodotorula mucilaginosa* , the optimal condition is pH 5.0, temperature 30°C, santrifuje 200 r.p.m, 1% concentration of carbon from olive oil and the best source of nitrogen, the pepton has been considered. As a result of combination of carbon and nitrogen sources with olive oil, the activity of lipase was increased. Our study showed that the most suitable factors for optimal reaction are, incubation temperature at 60°C, incubation period 50 min and substrat concentration are specified. In our study, we investigated that melasses which is the waste of sugar factories, under specified conditions can be used as a lipase production source.

Key words: Lipase activity, Microbial lipase production, Optimization,

Rhodotorula mucilaginosa.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca; ilgisini, sevgisini ve sonsuz anlayışını benden esirgemeyen her an yanımda olan, engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, bütün çalışmama ışık tutan her aşamasında ilgi ve desteğini gördüğüm çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e,

Çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan, çok değerli hocam Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e,

Uzaktan olsalar da her zaman güvenleri, maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan, üzüntülerimi, sevinçlerimi paylaştığım, çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen, her şeyimi borçlu olduğum annem Tahereh BABAPOUR'a ve babam Reza HAMMAMCHİ'ya; her zaman yanımda olan ve varlığı ile sevinçlerimi tamamlayan Vahid HAMMAMCHİ'ya,

Beni anlayan, dinleyen ve hep destek olan sevgisiyle bana güç veren canımdan bile çok sevdim Elmira KARİMİ ve değerli ailesine,

Varlığıyla hayatımı eşsiz yapan, sonsuz sevgisi, anlayışı, sabrıyla ve desteğiyle yüreğimi isitan, atacağım her adımda yanımda olan ve her konuda bana güven ve moral veren Hamid NAJAFİ'ye; ailemin uzaklığını bana hissettirmeyen Zhra MALEK ve Nina NAJAFİ'ye,

Ankara'da geçirdiğim iki yıl boyunca beni yalnız bırakmayan, hayatımı paylaştığım Solmaz MOSAYYEBİ ve Gözde KOŐARSOY'a, çalışmam boyunca yoğun temposuna rağmen bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Arş. Gör. Neslihan İDİL'e, Çalışma arkadaşım Arş. Gör. Hasan AKYIL'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimler ve Tarihçesi.....	3
2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	5
2.3. Enzimlerin Üretiminde Mikrobiyal Kaynaklar.....	8
2.4. Lipazlar.....	11
2.5. Lipaz Enzimi ve Kullanım Alanları.....	13
2.6. Lipaz kaynakları	17
2.6.1. Bakteriyel Lipazlar.....	18
2.6.2. Fungal Lipazlar.....	20
2.7. Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler.....	22
2.7.1. Karbon Kaynakları Etkisi.....	22
2.7.2. Azot Kaynakları Etkisi.....	23
2.7.3. pH Etkisi.....	24
2.7.4. Sıcaklık Etkisi.....	25
2.8. <i>Rhodotorula</i> sp.....	25
2.8.1. <i>Rhodotorula</i> sp.'nin Mikroskopik Özellikleri.....	26
2.8.2. <i>Rhodotorula</i> sp.'nin Mikroskopik Özellikleri.....	26
2.9. Atık Artık.....	27
2.9.1. Melas.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28

3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma.....	28
3.1.1. Mikroorganizma İzolasyonu.....	28
3.1.2. Mikroorganizma Tür Tayini.....	30
3.2. Mikroorganizmanın Tribütirin Agar Ortamında Lipolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	30
3.3. Mikroorganizma Ekim ve Üretim Koşulları.....	31
3.3.1. Lipaz üretim ortamı	31
3.3.2. İnokülasyon ve İnkübasyon.....	31
3.3.3. Üreme Eğrisinin Saptanması.....	32
3.4. Mikroorganizmada Lipaz Aktivitesi Tayini.....	32
3.5. Üremeye bağlı lipaz aktivitesinin saptanması.....	33
3.6. Üreme Ortamındaki Lipaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Saptanması.....	33
3.6.1. Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	34
3.6.2. Lipaz Sentezi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Saptanması.....	34
3.6.3. Üretim Ortamı Sıcaklığının Lipaz Üretimine Etkisinin Saptanması	35
3.6.4. Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarının Lipaz Sentezine Etkisinin Saptanması.....	35
3.6.5. Üretim Ortamı Havalandırma Hızının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	35
3.7. Üreme Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	36
3.7.1. Üreme Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	36
3.7.2. Üreme Ortamına İlave Edilen Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	38
3.8. Reaksiyon Ortamında Uygun Fizyolojik Koşulların Saptanması.....	39
3.8.1. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	39
3.8.2. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Süresinin Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	40

3.8.3. Reaksiyon Ortamı Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	40
3.9. Belirlenen Optimum Koşullarda Lipaz Üretimi ve Aktivitesinin Saptanması.....	41
3.10. Atık ve Artık Değerlendirme Çalışmaları.....	41
3.10.1. Melasın <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Suşunun Üreme ve Lipaz Sentezine Etkisinin Saptanması	41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	43
4.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma.....	43
4.1.1. Mikroorganizma İzolasyon ve Tanımlama.....	43
4.1.2. Mikroorganizma Tür Tayini.....	43
4.2. Mikroorganizmada Tribütirin Agar Ortamında Lipolitik Aktivitelerinin Saptanması.....	44
4.3. Mikroorganizmada Lipaz Aktivite Tayini.....	45
4.4. Üreme Eğrisinin Saptanması.....	46
4.5. Üreme Ortamındaki Lipaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Saptanması.....	47
4.5.1. Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	47
4.5.2. Lipaz Sentezi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Saptanması.....	49
4.5.3. Lipaz Üretimi İçin Uygun Sıcaklığın Saptanması.....	51
4.5.4. Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	53
4.5.5. Üretim Ortamı Havalandırma Hızının Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	55
4.6. Üreme Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisi	57
4.6.1. Üreme Ortamına İlave edilen Farklı Karbon Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisi Saptanması.....	57
4.6.2 Üreme Ortamına İlave edilen Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	65
3.8. Reaksiyon Ortamında Uygun Fizyolojik Koşulların Saptanması.....	70
3.8.1. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Aktivitesine Etkisinin	

Saptanması.....	70
3.8.2. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Süresinin Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	71
3.8.3. Reaksiyon Ortamı Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması.....	73
3.9. Belirlenen Optimum Koşullarda Lipaz Üretimi ve Aktivitesinin Saptanması.....	73
3.10. Atık ve Artık Değerlendirme Çalışmaları.....	75
3.10.1. Melasın <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Suşunun Üreme ve Lipaz Sentezine Etkisinin Saptanması	75
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

gr	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
O.D.	Optik Dansite
PDA	Patates Dekstroz Agar
r.p.m	Dakikadaki Devir Sayısı (Reverse Per Minute)
°C	Santigrad Derece
U	Aktivite
U/ml	Ünite/mililitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Tavuk Kümesinde PDA Besiyerleri İçeren Petrinin Havaya Açılması.....	29
Şekil 3.2. Tavuk Kümesinde Havaya Açılan PDA Besiyerinde Üreme.....	29
Şekil 4.1. Tribütirin Agarda <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Suşunun Lipolitik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	44
Şekil 4.2. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Kültür Ortamında Üretim Miktarının Günlere Göre Değişimi.....	46
Şekil 4.3. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Kültür Ortamında Lipaz Aktivitesinin Günlere Göre Değişimi.....	48
Şekil 4.4. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> kültür ortamında üreme miktarı ve differansiyel sentez hızının günlere göre değişimi.....	48
Şekil 4.5. Farklı Başlangıç pH Değerlerine Ayarlanmış Üretim Ortamlarında Lipaz Üretimi.....	50
Şekil 4.6. Farklı Başlangıç pH Değerlerine Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	50
Şekil 4.7. İnkübasyon Sıcaklığının <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'dan Lipaz Üretimine Etkisi.....	52
Şekil 4.8. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarına Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	52
Şekil 4.9. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	54
Şekil 4.10. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	54
Şekil 4.11. Farklı Döngüsel Çalkalama Hızının Üretim Ortamında Lipaz Aktivitesi Etkisi.....	56

Şekil 4.12. Farklı Döngüsel Çalkalama Hızına Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	56
Şekil 4.13. Farklı Karbon Kaynağı Olarak Yağların Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	59
Şekil 4.14. Farklı Karbon Kaynaklarına (Yağlar) Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızını Değişimi.....	59
Şekil 4.15. Farklı Karbon Kaynağı Olarak Şekerlerin Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	61
Şekil 4.16. Farklı Karbon Kaynaklarına (Şekerler) Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızını Değişimi.....	61
Şekil 4.17. Farklı Şeker Kaynaklarına İlave Olarak %1 Oranında Zeytin Yağının Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	64
Şekil 4.18. Farklı Karbon Kaynaklarına (Şekerler + Zeytin Yağı) Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	64
Şekil 4.19. Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	66
Şekil 4.20. Farklı Azot Kaynaklarına Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	66
Şekil 4.21. Farklı Azot Kaynaklarına İlave Olarak %1 Oranında Zeytin Yağını Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	68
Şekil 4.22. Farklı azot Kaynaklarına (Azot + Zeytin Yağı) Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	68
Şekil 4.23. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	72
Şekil 4.24. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Süresinin Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	72
Şekil 4.25. Reaksiyon Ortamı Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	74

Şekil 4.26. Değişik Melas Konsantrasyonlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Lipaz Verimi.....	76
Şekil 4.27. Değişik Melas Konsantrasyonlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Suşunun Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	76
Şekil 4.28. Değişik Melas Konsantrasyonlarında ve %1 Oranında Zeytin Yağı İçeren Ortamlarda <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Lipaz Verimi.....	77
Şekil 4.29. Değişik Melas Konsantrasyonlarında ve %1 Oranında Zeytin Yağı İçeren Ortamlarda <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Suşunun Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge2.1. Enzim Üreten Bazı Mikroorganizmalar ve Ürettikleri Enzimler.....	10
Çizelge 2.2. Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları	15
Çizelge 2.3. Bakteriyel Lipaz Kaynakları	19
Çizelge2.4. Fungal Lipaz Kaynakları	21
Çizelge 2.5. Çeşitli Mikroorganizmalarda en Uygun Lipaz Üreten Karbon Kaynakları (Yağlar).....	25
Çizelge 2.6. Rhodotorula Cinsinin Taksonomik Sınıflandırılması.....	26
Çizelge 4.1. Belirlenen Optimum Koşullarda Ayarlanmış Üretim Ortamlarında <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın Lipaz Aktivitesi, Üreme Miktarı Differansiyel Sentez HızınınDeğişimi.....	74

1. GİRİŞ

Son otuz yıl içinde pek çok sanayi dalında uygulama alanı bulan enzimler, günümüzde yeni kullanım alanlarının ortaya çıkmasıyla giderek önem kazanmaktadırlar [1]. Ticari enzimlere özellikle de mikrobiyal kaynaklı olan enzimlere olan ilgi pek çok alanda kullanıma sahip olmalarından dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar kimyasal metotlara göre daha ucuz ve de daha basittir. Enzimler başta gıda, eczacılık, deterjan, tekstil ve kozmetik olmak üzere pek çok sanayi dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel enzim pazarında büyük paya sahip olan hidrolitik enzimler içinde yer alan lipazlar, anahtar enzimler olarak ortaya çıkmakta ve endüstriyel uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadırlar [2, 3, 4].

Lipazlar (E.C.3.1.1.3; trigliserol açilhidrolazlar) enzim sınıflandırmasında hidrolazlar ana sınıfında yer alan, triaçilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

Lipazlar, doğada farklı kaynaklardan elde edilebilmektedirler. Özellikle mikrobiyal kaynaklı lipazlar, biyoteknolojik uygulamalar ve organik kimyada yüksek oranda kullanılmaktadırlar. Ekstraselüler mikrobiyal lipazlar ticari olarak çok önemli olup, bunların üretimi diğer kaynaklara göre çok daha kolaydır [5]. Mikroorganizmaların enzim üretiminde potansiyel olarak kullanılmasının avantajı ise ortam koşullarının değiştirilmesiyle ya da genetik manipulasyonlarla, sentezlenen enzim miktarının binlerce kez artırılmasıdır [1].

Lipazlar kullandıkları substratların fazla olması, ekstrem koşullarda (sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi) kararlı yapılarını koruyabilmeleri gibi başlıca nedenlerle en önemli biyokatalizörler olarak varsayılır. Bu yüksek lisans çalışmasında lipaz kaynağı olarak fungal familyasında bulunan *Rhodotorula mucilaginosa* türü mikroorganizmalar kullanıldı. Eskişehir ili Hasanbey Köyü tavuk kümesinden izole edilen bu

mikroorganizma, lipaz üretiminde önem taşıyan ortam koşulları ve ortam bileşenlerinin etkisi ve reaksiyon ortam koşulları parametreleri optimizasyonu hedeflendi. Ortam bileşenleri olarak; karbon kaynakları için çeşitli bitkisel yağlar ve şekerler, azot kaynakları olarak doğal kaynaklar ile organik azot kaynaklarının ve etkisi incelendi. Optimal ortam koşullarını belirlemek amacıyla çeşitli pH'larda, inkübasyon sürelerinde ve sıcaklıklarda üretim yapılarak lipaz aktivitesine etkileri incelendi. Reaksiyon ortamı koşullarını belirlemek amacıyla ise reaksiyon ortamı sıcaklığı, reaksiyon inkübasyon süresi ve substrat konsantrasyonu incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler ve Tarihçesi

İnsanlar enzim varlığının fark edilmesi ve ortaya konulmasından çok önce bu maddelerin gerçekleştirdikleri aktivitelerden dolayı bir şekilde ve bilinçsizce yararlanmayı bilmişlerdir. Bira, şarap, ekmek, yoğurt ve peynir gibi fermente gıdaların üretimi çok eski çağlardan beri bilinmektedir. Fermentasyon, organik maddelerin canlı hücreler tarafından anaerobik koşullarda metabolize edilerek biyodeğişime uğratılması olayıdır. Bu biyodeğişim olayı ise gerçekte canlı hücrelerin sahip olduğu enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir.

Enzimler, karbon, oksijen, hidrojen ve azottan oluşan, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden, biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan maddelerdir. Enzimler katalizör olarak, kimyasal reaksiyonları hızlandırmada ve bir molekülü diğer bir moleküle dönüştürmede kullanılırlar. Bu işlev enzimin yapısında herhangi bir değişiklik olmadan gerçekleşir [6, 7].

1850'lerde Louis Pasteur, fermantasyonla ilgili çalışmalar yaparak enzim biliminin ortaya çıkışında ve gelişiminde büyük katkılar sağlamıştır. Pasteur şekerin maya vasıtasıyla alkole fermentasyonunun 'fermentler' aracılığıyla katalizlendiği sonucuna varmıştır ve yaptığı denemeler sonucunda, fermantasyonun ancak canlı hücrelerde gerçekleşebileceği sonucuna varmıştır. Buna karşı Liebig, fermantasyonun gerçekleşebilmesi için mutlaka canlı hücreye gereksinim olmadığını savunmuştur. Bu görüş farklılığı 1870-1890 yılları arasında devam etmiştir. 1878'de Frederick W. Kühne bu fermentlere 'enzim' adını vermiş ve bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapısından ayrılmaz olduğunu kabul etmiştir. Bu görüş uzun yıllar geçerli olmuştur.

Daha sonra 1897'de Eduard Buchner maya hücrelerinden kabaca enzim izolasyonunu gerçekleştirmiş ve bu izole edilen enzim karışımındaki bir enzimin (invertaz) canlı hücre dışında da aynı fonksiyonu gösterdiği ortaya koymuştur. Yaptığı deneylerde maya ekstratlarının şekeri alkole fermente edebildiğini keşfetmiş ve fermentasyonu sağlayan moleküllerin canlı hücre yapısından çıkarıldığında da fonksiyonuna devam ettiğini ispat etmiştir. Bu ispat biyokimyacıları, yeni enzimlerin izolasyonu ve onların katalitik özelliklerini incelemeleri için teşvik etmiştir. Bunu takiben 1920'li yıllarda, bir enzim karışım sisteminden belli bir enzimin ayrılıp saf enzim preparatının elde edilmesi ağırlık kazanmıştır.

1926'da James Summer tarafından üreazın izole ve kristalize edilmesi, daha önceki enzim çalışmaları için ilerleme sağlamıştır. Ancak, 1930'larda John Northrop ve Moses Kunitz'ın pepsin ve tripsini kristalize etmeleri ve bunların protein olduklarını bulmalarından sonra Summer'ın vardığı sonuç geniş çapta kabul görmüştür ve bu iki bilim adamı Nobel ödülü ile onurlandırılmışlardır. J.B.S.Haldane, bu dönemde, "enzimler" adlı bir bilimsel inceleme yayınlamıştır. Enzimlerin moleküler yapısı tam olarak anlaşılmamasına rağmen, Haldane katalitik reaksiyonlarda kullanılabilen enzim ve substrat arasındaki zayıf bağların etkileşimi ile ilgili dikkat çekici bir öneri ileri sürmüştür. Fischer, 1894 yılında, enzimlerin özgünlüğünü "anahtar-kilit" modeli ile açıklamıştır. Koshland, 1959 yılında, enzim özgünlüğü konusunda "uyum meydana getirme" modelini öne sürmüştür. Enzim kinetiği konusu, Michaelis ve Menten tarafından 1913 yılından bugüne geçerliliğini koruyan temeller üzerine oturtulmuştur. Yirminci yüzyılın sonlarından itibaren enzimler ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar; binlerce enzimin saflaştırılmasına, birçoğunun kimyasal mekanizması ve yapısının açıklanmasına ve genel olarak enzimlerin çalışmasının anlaşılmasını sağlamıştır. Gelişen teknoloji ile bugün için yaklaşık 3000 dolayında enzim saf preparat halinde elde edilmiş ve kullanıma sunulmuştur [7].

2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Şimdiye kadar bilinen enzimlerin sayısı 700'ün üstündedir. Enzimler aktif veya inaktif durumda olmalarına göre adlandırılır. Enzim inaktif durumda ise substratının sonuna "jen" eki getirilerek adlandırılır. Örneğin pepsinojen. Enzim aktif durumda ise çözdükleri ve parçaladıkları substratın sonuna "ase=az" eki getirilerek ve etki ettiği reaksiyonun çeşidine göre adlandırılır. Örneğin; selüloza etki eden enzim selülaz olarak adlandırılır. Enzimler etkili oldukları substratın sonuna litik eki getirilerek de adlandırılır. Örneğin; proteinleri parçalayan enzimlere proteazlar denildiği gibi proteolitik enzimler de denilmektedir. Pepsin, amigdalin, pityalin gibi substratlarını veya aktivitelerini tanımlamayan, genel bir tanıma uymayan enzim adları da kullanılmıştır. Karışık adlandırmaların sonucu olarak aynı enzime farklı isimler verilmesinden dolayı adlandırmada sorunlar ortaya çıkmıştır.

Böylece isimlendirmedeki uyumun yok olması ve bilinen enzimlerin sayısının hızla artması nedeniyle, enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması için sistematik bir yol gereksinimi ortaya çıkarmıştır. Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından kurulan bir komisyonun 1964 yılında yayınladığı, 1978 ve 1984 yıllarında gözden geçirdiği rapor, günümüzde kabul edilen sistemin temelini oluşturur. Bu sistematik adlandırmada enzimlerin altı ana sınıfa ayrılmaktadır, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır. Buna göre enzim sınıfları şunlardır:

Enzim sınıfı 1: Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar, oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Yükseltgenme; moleküle oksijen eklemek veya molekülden hidrojen ayrılmakla, böylece + değer artmasıyla olur. İndirgenme ise; molekülden oksijen ayrılmakla veya moleküle hidrojen eklemekle yani + değer azalmasıyla olur. Oksidoredüktazlar hidrojen veya elektronları bir substrattan diğerine

taşırlar metabolizmada çok önemli rol oynarlar. Bu tepkimeleri düzenleyen enzimler 2 gruba ayrılmıştır.

- Dehidrogenaz: Hidrojen taşıyan ve aktaran enzimlerdir. (Elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler.)
- Oksidazlar: Elektron kaybeden ve aktaran enzimlerdir. (Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler.)

Enzim sınıfı 2: Transferazlar

Transferazlar, molekülden H^+ dışında, başka grupların (metil, karboksil, glikozil, amino, fosfat grupları, taşıyanguuplar) bir molekülden diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir.

Enzim sınıfı 3: Hidrolazlar

Hidrolazlar, su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Ester, peptit, asitanhidrit ve glikozidik bağlarına etki ederler. Bu sınıfın başlıca iki grubu a) C-N ve b) C-O bağlarının çözülmesini katalizleyen enzimlerdir. Birinci grupta başlıca proteazlar (proteolitik enzimler) ve ikinci grupta esterazlar ve karbohidrazlar bulunur.

PROTEAZLAR (proteolitik enzimler):

Bunlar peptit bağlarının su etkisiyle bölünmesini ve sentezini katalizlerler. Genellikle bunlar proteinaz, peptidaz ve amidaz olarak ayrılırlar. Proteinazlar proteinlerin iç peptid bağlarına etki ederek onları proteoz, pepton ve polipeptidlere bölerler. Bu grupta, mide salgısındaki pepsin ve genç danaların dördüncü midesinden özütleme ile elde edilen rennetin etkili enzimi rennin vardır.

Peptidazlar, proteinlerin proteinazlara bölünme ürünleri olan polipeptitlerin, serbest amino veya karboksil gruplarına bitişik peptit bağlarına etki ederler, serbest amino asitlere ayırırlar. Tüm bitkisel ve hayvansal dokularda ve kanda bulunurlar, dipeptidaz, aminopeptidaz, karboksipeptidaz ve alt gruplarına ayrılırlar. Amidazlar, peptid bağlarından başka C-N bağlarına ayıran üreaz ve erginaz gibi enzimlerdir. Üreaz üreyi karbondioksit ve amonyağa hidrolizler.

ESTERAZLAR

Bu enzimler doğal esterler üzerine etki ederler estereazlardan lipaz'lar yağların gliserin ve yağ asidine bölünmesini, fosfatazlar fosforik asitler esterlerinin ve süfatazlar sülfürik asit esterlerinin bölünmesini katalizler.

KARBOHİDRAZLAR

Bu enzimler basit glikozidlerin, oligosakkaritlerin ve polisakkaritlerin glikozid bağlarına etki ederler. Glikozidaz ve poliaz veya polisakkaridaz olarak ayrılırlar. Birinci grupta glikozidaz ve invertaz, ikinci grupta ise amilazlar bulunur.

Enzim sınıfı 4: Liyazlar

Liyazlar, C-C, C-O, C-N ve C-S bağlarını yükseltgenme ve hidroliz dışında (Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir) bir mekanizma ile kıran enzimlerdir. Örneğin C-C bağı, aldolaz ve dekarboksilazla yıkılır. Keza C-O ve C-N bağı yıkanlar da vardır.

Enzim sınıfı 5: İzomerazlar

İzomerazlar, optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizleyen diğer bir deyişle molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir. Razemaz, epimeraz örnek olarak verilebilir.

Enzim sınıfı 6: Ligazlar (Sentetazlar):

Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlar. Örneğin amino asitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesini sağlarlar. Ligazlar, yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak karbon ile C, O, S, N arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.

Sistemik adlandırma sisteminde her enzime enzim komisyonu (EC) tarafından verilen dört rakamlı kod numarası ve katalizlediği reaksiyonu tanıtan sistemik ad verilmektedir. Örneğin; ATP: glukoz fosfotransferaz enzimi, bir fosfat grubunun ATP'den glukoz transferini katalizlediğini belirtir. ATP:glukoz fosfotransferazın kod numarası (EC numarası) 2.7.1.1 dir. Burada birinci rakam, tepkimenin tipi veya sınıf adını (2; transferaz); ikinci rakam, alt sınıfı (7; fosfotransferaz); üçüncü rakam, akseptörün ilgili grubunu (1; -CH-OH); dördüncü rakam ise akseptör olan substratı (1; glukoz) ifade eder [7].

2.3. Enzimlerin Üretiminde Mikrobiyal Kaynaklar

Enzimler hakkındaki bilgi eskilere dayanmakla birlikte, mikrobiyal yolla üretimi yakın geçmişte önem kazanmıştır. İlk kez 1897'de Buchner yaşayan hücreden aktif enzim ayrılabilceği gösterilmiş ve mayanın alkol fermantasyonunun başlangıcında katılması yerine, yaşayan hücre olmadan maya özütünden yararlanmıştır. Küf enzimlerinin ilk kez ticari kullanımları 20. yüzyılın başında, bakteriyel enzimlerin kullanımı ise 1. Dünya Savaşı sırasında başlatılmıştır [8].

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Her ne kadar hayvansal ve bitkisel hücrelerden yararlanarak enzim

elde etme olanakları varolsa da, teknik ve ekonomik yönünden, katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri nedeni ile mikrobiyal kaynaklı endüstriyel enzimler daha avantajlıdır [9].

Mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil toksik ve patojen olmamalarına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır [10].

Endüstriyel enzim üretiminde en önemli basamak özgül enzim üretme özelliğine sahip kültür suşlarının seçilmesidir. Bu suşların stabil olması ve yüksek ürün meydana getirebilmesi aranılan en önemli özelliklerden birisidir.

Mikrobiyal enzim üretiminde fermantasyon metodlarının gelişimi, koşullarının kontrol altında tutulması ve doğru suşların seçimi ile üretim potansiyeli artmakta ve miktar sınırlaması faktörü de ortadan kalkmaktadır. Bu nedenle endüstriyel yolla enzim üretiminde mikroorganizmaların kaynak olarak kullanılması, yetersiz olan üretimde artış sağlanması bakımından en büyük avantajı sağlamaktadır. Bir diğer avantaj ise, pek çok sayıda enzimi ekonomik olarak mikroorganizmalardan elde etmek mümkündür. İyi seçilmiş ve planlanmış organizma suşları ile herhangi bir enzim üretimi genellikle mümkündür. Ancak tek bir organizma ile çalışmak dezavantajlı olabilir. Genellikle mikrobiyal kaynaklardan üretilen enzimlerin atmosferik basınçta 3.0 - 9.0 gibi geniş bir pH aralığında olmaları ve pek çoklarının 45 - 55°C lerde çalışabilmesi de bir başka avantajdır [11].

Ekstremofilik mikroorganizmalar: volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0 – 3.0 veya pH 10 - 12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5.0 - 30) yaşamak için adapte olmuşlardır [12]. Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır [13].

Buralarda yaşıyan termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır [14]. Ticari öneme sahip olan enzimlerin çoğu, hidrolazlar şeklinde tanımlanmakta olup, mikrobiyal kökenlidir. Bu enzimlerin çoğu ekstrasellüler olarak bulunur ve yüksek moleküler ağırlığa sahip substratlarla görev yaparlar. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır [15, 16].

Çizelge 2.1. Enzim Üreten Bazı Mikroorganizmalar ve Ürettikleri Enzimler.

Organizmalar		Enzimler
Küfler	<i>Aspergillus oryzae</i>	Amilaz, Proteaz
	<i>Aspergillus niger</i>	Amiloglaz oksidaz, katalaz, Amilaz, Sellulaz, Pektinaz, Glikoz.
	<i>Rhizopus spp.</i>	Amilaz, Amiloglukoksidaz, Lipaz.
	<i>Penicillium spp.</i>	Pektinaz, Lipaz.
	<i>Mucor spp.</i>	Proteaz, Lipaz.
	<i>Trichoderma viride</i>	Sellulaz.
Bakteriler	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	Streptokinaz-Streptodornaz
	<i>Bacillus subtilis</i>	Proteaz, Amilaz
	<i>Bacillus mesenterclus</i>	Proteaz
	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Katalaz
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	İnvertaz
	<i>Saccharomyces fragillis</i>	Laktaz

Bugün endüstriyel olarak mikrobiyal enzim üretiminde en çok kullanılan 11 küf, 8 bakteri ve 4 maya vardır (Çizelge 2.1). Bunlar toksikolojik açıdan incelenerek, özellikle gıda üretiminde kullanılabilir olduğu bildirilmiştir [17, 18]. Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak

kullanıma uygun bulunmuştur. Günümüzde bunlardan sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir [19]. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidratlar grubuna giren α -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır [20]. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır [21].

2.4. Lipazlar

Lipazlar triaçilgliseroller (E.C.3.1.1.3) gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini sağlayan enzimlerdir [22, 23]. Lipazlar aynı zamanda esterleşme transesterleşme, interesterleşme, amiloziz, asidoliziz ve alkoloziz gibi tepkimeleri de katalizlemektedir [24]. Lipazlar, genel olarak karboksilesterazlar ve gerçek lipazlar olmak üzere iki gruba ayrılır [25]. Karboksilesterazlar, suda kısmen çözünebilen, kısa zincirli karboksilik asit esterlerini parçalayan, gerçek lipazlar suda çözünmeyen uzun zincirli açilglisterollerini hidrolize etmektedir. Katalitik potansiyelleri çok yüksektir [26, 27].

Triaçilgliserollerin hidroliziyle, yağ asitleri ve gliserol meydana getiren lipazlar [22], lipid-su ara yüzeyinde aktif olup [28, 29, 30, 31], suda çözünmeyen uzun zincirli trigliseritlere karşı maksimum aktive gösterirler [31].

Araştırılan lipazlar, pH 4'e kadar asidik ve pH 8'e kadar bazik ortamlarda dayanıklı olmalarıyla birlikte, en fazla stabiliteyi pH 6,0-7,5 arasında göstermektedir. *A. niger*, *Chromobacterium viscosum* ve *Rhizopus* türlerinin hücre dışı lipazları asidik pH'da aktiftir. *P. nitroreducens*'ten izole edilen lipaz ise pH 11,0'de aktivite göstermektedir.

Yüksek sıcaklıklarda ve organik ortamlarda yüksek stabilitelerinden dolayı önem kazanmışlardır.

Lipazlar, enzim sınıflandırmasında sırasıyla hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) ve triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar [32].

Lipaz enzimlerinin spesifikliği, enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısıyla ilgilidir [33]. Genellikle lipazlar, yağ asidinin pozisyonel spesifikliği, stereospesifiklik (izomer seçicilik) gibi substratların özellikleri doğrultusunda sınıflandırılırlar [22, 34]. Bu bakımdan, lipazlar üç gruba ayrılırlar. İlk grup, spesifik olmayan gruptur. Bu grup lipazlar, trigliseritleri tamamen hidrolizleyip yağ asitleri ve gliserol oluşumunu katalizlerler. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girer [35, 36]. İkinci grup lipazlar, 1,3-spesifik olup triaçilgliserol parçasının 1 ve 3 pozisyonunda hidroliz gerçekleştirirler ve 1,2-diaçilgliseroller, 2,3-diaçilgliseroller, 2-monogliseroller ve serbest yağ asitleri oluştururlar [34, 35]. Ancak bu ürünler kimyasal olarak kararsızdır ve açıl göçüne maruz kalmaktadırlar. Bunun sonucunda 1, 3-spesifik enzimlerin son ürünleri; 1, 3-diaçilgliseroller, 1-monoaçilgliserol ve serbest yağ asitleri olabilir. Triaçilgliserollerin hidrolizi devam ettiği sürece 1,3-spesifik lipazlar, triaçilgliserollerin tamamen serbest yağ asitleri ve gliserole dönüşmesine sebep olurlar [22]. *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen lipazlar 1, 3- spesifiktir [35, 36]. Üçüncü grup, yağ asidi spesifik lipazlardır. Bu grup lipazlar, bazı yağ asitlerine spesifik olup bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar [34, 35].

Lipazlar (triaçil gliserol açıl hidrolazlar) bir çok tepkimeyi katalizleyebilme yetenekleri ile fizyolojik öneme ve endüstriyel potansiyele sahiptirler. Lipazlar esteraz enzimlerinin özel bir sınıfıdır ve yağlar üzerine etkilidir. Yağları hidrolize ederek onları gliserol ve yağ asitlerine parçalarlar. Esterazların aksine lipazlar sadece su/yağ ara

yüzeylelerinde aktivasyon gösterirler. Lipazlar aktif bölgelerinde serin yer aldığı için serin hidrolazlar olarak adlandırılmaktadır [36].

2.5. Lipaz Enzimi ve Kullanım Alanları

Genel olarak yaklaşık 4000 enzim bilinmekte olup, bunlardan 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır [31]. Bu ticari enzimler içerisinde % 3 pazar payına sahip olan lipazlar, biyokatalizörler içerisinde önemli bir yer almakta ve biyoteknolojik uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadırlar [35, 37].

Çok yönlü mikrobiyal lipazlar hızla gelişmekte olan modern biyoteknolojide vazgeçilmez bir role sahip olmuşlardır. Biyolojik önemlerinin yanında lipazlar, yağların işlenmesi, deterjan ve yağ temizleyicilerin üretimi, gıdaların işlenmesi, ilaç ve kimyasal madde sentezleri, kağıt üretimi ve kozmetik ürünlerinin sentezi gibi pek çok alanda karşımıza çıkmaktadır (Çizelge 2.3). Lipazlar aynı zamanda atıkların yok edilmesi için yapılan biyoremediasyon işlemi, biyoteknolojide kullanılan yeni bir yöntemdir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen lipazlar kullanılarak, yağlı atıklar ve yağ kalıntıları temizlenebilmektedir. Lipazlar ayrıca atık suların arıtılmasında geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Geliştirilen bir teknoloji ile fabrikalarda atık suların arıtımı sırasında oluşan tortulardan biyogaz elde edilmektedir. Bu teknolojide, içinde lipazın da yer aldığı enzim karışımları kullanılmaktadır. Lipazların kullanıldığı diğer bir uygulamada, kullanışlı ürünler içindeki polyeşter atıkları indirgenerek, laktonların ve esterifiye olmamış yağ asitlerinin üretimi sağlanmaktadır. Lipazlar; su soğutma sistemlerinde oluşan biyofilm tortularının kaldırılmasında, atık yağların değerlendirilmesi ve fabrikalardan çıkan atık gazların saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Lipofilik mikroorganizmaların, özellikle mayaların kullanılması ile endüstriyel atıklardan tek hücre proteini üretimi; atık yönetiminde lipazların farklı uygulama alanlarının oluşmasına yol açmaktadır. Lipazlar, yağ fabrikalarının atık sularına karışan zeytinyağı gibi yağların yok edilmesi için de kullanılmaktadır. Bu

işlem, atıkların içinde lipaz üreten mikroorganizmaların üretilmesiyle gerçekleştirilmektedir [4].

Hidrolitik lipazların en önemli ticari uygulamalarının başında çamaşır deterjanlarındaki kullanımları gelmektedir. Toplam lipaz satışının % 32'sini deterjan enzimleri oluşturmaktadır. Tahmini olarak her yıl yaklaşık 1000 ton lipaz katkılı 13 milyar ton deterjan üretilmektedir [3].

Günümüzde endüstriyel enzimler, özellikle de lipazlar meyve sularından pişirilmiş hazır gıdalara ve süt ve süt ürünlerinin zenginleştirilmesi gibi alanlarda ve çok çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Katı ve sıvı yağlar gıdaların önemli bileşenleridir. Trigliseritlerin fiziksel özellikleri, besin değeri ve lezzet; gliserol omurgasındaki yağ asitinin konumundan, zincir uzunluğundan ve doymamışlık derecesinden etkilenir. Lipazlar, gliseritlerdeki yağ asiti zincirinin konumunun değiştirilmesiyle, lipidlerin özelliklerinin değişmesine olanak sağlar. Göreceli olarak ucuz olan bu yöntem, yağın daha değerli bir yağa dönüşümüne olanak tanır.

Yağları hidroliz etmelerinden dolayı lipazlar, endüstriyel temizlik alanlarında ve evde kullanılan deterjanlarda geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Deterjan lipazlarında özellikle dikkat edilen hususlar; ilk olarak yağ lekelerini oluşturan trigliseritlerdeki çeşitlilik nedeniyle substrata spesifik olması, ikinci olarak sert yıkama koşullarında (pH 10-11, 30-60 °C) enzim stabilitesinin devamlılığı ve son olarak da sürfektan ve proteazlar gibi katkı maddelerinin neden olduğu proteolitik degradasyondan etkilenmemesidir [31, 3].

Deterjan yapımında enzim kullanımı, endüstriyel enzimlere talebi arttırmıştır. Dünya çapında yıkama sıcaklıklarını indirmeye yönelik yapılan çalışmalarda, ev deterjan formülasyonları için daha gelişmiş ürünler, yeni araştırma programları, genetik manipulasyonlarla bir takım uygun preparasyonların tanımlanması sağlanmıştır [37].

Yağlar, gıdalarda oldukça önemlidir [31]. Gliserol iskeletinde yağ asidinin pozisyonu, yağ asidinin zincir uzunluğu ve doymamış yağ oranı gibi faktörler trigliseritin fiziksel yapısını, besinsel değerini önemli oranda etkilemektedir [22, 3]. Lipazlar, gliseritteki yağ asit zincirlerinin konumunun değiştirilmesi ve bir veya daha fazla yağ asidinin yeni bir tane ile yer değiştirmesiyle lipitlerin özelliklerinin farklılaşmasına imkan sağlar. Bu yolla diğerlerine nazaran daha ucuz ve daha kaliteli yağlar elde edilir [31].

Çizelge 2.2. Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

Endüstri	Görevi	Ürün ya da Uygulama
Deterjan	Yağların Hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi	Peynir ve tereyağındaki tatlandırıcı ajanların geliştirilmesi
	Hızlı olgunlaştırma	Peynir
	Yağların modifikasyonu	Tereyağ
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, nemlendiriciler
Kağıt	Hidroliz	Geliştirilmiş kalitede kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
İlaç	Transesterifikasyonu	Sindirimi kolaylaştırıcı düzenleyiciler
	Hidroliz	Özel lipidler
Yağ	Transesterifikasyon	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
	Hidroliz	Mono ve diaçil gliseroller
İçecek	Aroma geliştirilmesi	İçecekler
Ekmek	Tat geliştirilmesi	Raf ömrünün uzatılması

Geleneksel olarak bakteriyal lipazlar tat gelişimini sağlayan gıda sistemlerinde, in situ olarak üretilmektedir. Pastörizasyon prosesi ve peynir olgunlaştırılması esnasında sütte bulunan özellikle *Pseudomonas*, bunun yanı sıra *Alcaligenes* ve *Achromobacter*

gibi bakteri türlerinin ve bazı sosislerin olgunlaştırılmasında lipolitik laktik asit bakterilerinin ürettiği lipazların tat gelişimine etkisi olduğu bilinmektedir [3]. Lipazlar, hamurlu gıdalar ve içeceklere lezzet katmak, et ve balık ürünlerinden yağları uzaklaştırmak amacıyla da kullanılmaktadırlar [31].

Lipazın hidrolitik özelliğinin diğer bir uygulaması ise gıda endüstrisinde trigliseritlerin, di- ve mono- gliseritlere kısmen etkili hidrolizidir ki bu di- ve monogliseritler gıda endüstrisinde biyolojik uyumlu emülsifiyerler ve gıda katkı maddeleri olarak iş görmektedir [37].

Zift veya ağacın hidrofobik bileşeni (başlıca trigliseritler ve mumlar), kağıt hamuru ve kağıt sektöründe bir çok problem yaratmaktadır. Lipazlar, kağıt yapımında üretilen kağıt hamurundan bu ziftin uzaklaştırılmasında kullanılır. Japonya'da, Nippon Kağıt Endüstrisi, ağaç trigliseritlerinin % 90'ını hidrolize eden *Candida rugosa* fungal lipazını kullanarak zifti kontrol eden bir metot geliştirmiştir [31, 3]. Organik sentezde katalizör olarak kullanılan lipazlar, substrat farklılıklarına göre etki göstermelerinden dolayı sentetik kimya için büyük avantaj sağlamaktadırlar [37]. Lipazlar geniş bir çeşitlilik gösteren kemoselektif (kimyasal seçicilik), regioselektif ve stereoselektif transformasyonları katalizlemede kullanılmaktadır. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır [31]. Bunlar, enantiyomerik bileşiklerin çözülmesinde kullanılırlar. Lipazın katalizlediği çözümler için organik solventlerin kullanımı solvent olarak suya oranla dört temel avantaja sahiptir. Bunlardan ilki, alkol veya asitlerin rasemik karışımları enantiyomerlerinde çözülmeden önce esterifiye olmaya ihtiyaç duymamaları, ikincisi bu enzimlerin, organik solventlerde sudan daha kararlı olmaları, üçüncüsü organik solventlerde çözünmemeleri nedeniyle iyileşme için immobilizasyona ihtiyaç duymamaları ve aktif durumlarındaki filtrasyonlarıyla toplanabilmeleri ve son olarak substrat ve ürünlerin sulu solüsyonda kararsız olmalarıyla bu durumda, organik solventte reaksiyon ürünün oluşması ve izolasyonu için gerekli olmasıdır [37].

Oleokimyasal prosesde lipazlar, enerji alıcıdır ve alkolozis, asidolizis, hidrolizis ve gliserolizis esnasında termal degradasyonun minimize edilmesinde kullanılırlar [32,38]. Substrata bağlı olarak lipazlar, asidolizis, alkolizis ve transesterifikasyonu katalizleyebilirler [38].

Polisakkaritler, polifenoller ve poliesterler gibi biyopolimerler oldukça fazla çeşitlilik ve kompleks bir yapı gösterirler. Bununla beraber bu bileşikler, yenilenebilir doğal kaynaklardan üretilmeleri ve biyodegradasyona uğramaları nedeniyle büyük bir öneme sahiptirler. Lipazlar, polimerik sentez için reaksiyon koşullarında sahip oldukları yüksek seçilim (stereoselektif, regioselektif ve kemoselektif) özellikleri gösterebilmeleri nedeniyle katalizör olarak kullanılmaktadırlar [39].

Çesitli bitkilerden elde edilen yağların kimyasal olarak kullanımı sonucu oluşan biyodizel, alternatif bir enerji kaynağıdır. Biyodizel yakıtı, yenilenebilir doğal kaynaklardan meydana gelmektedir. Bitki yağının metil veya diğer kısa zincirli alkol esterlerine dönüşümü organik solventlerdeki lipazlar kullanılarak basit bir transesterifikasyon reaksiyonu ile katalizlenebilir [39].

2.6. Lipaz kaynakları

Lipaz enzimleri hemen hemen tüm canlılar yani bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Ticari lipazlar genelde mikrobiyal kaynaklıdır. Lipaz üreten mikroorganizmalar bakteriler, funguslar ve mayalardır [36].

Lipaz üreten mikroorganizmalar oldukça geniş bir dağılım gösterir [40]. Lipazların elde edildiği kaynak, optimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık aralığını etkilemektedir [41,42].

2.6.1. Bakteriyel Lipazlar

Bakteriyel lipazların bir kısmı glikoprotein, bir kısmı da hücre lipoprotein yapısındadır. Araştırmacılar çoğu bakteride enzim üretiminin bazı polisakkaritler tarafından etkilendiğini bildirmiştir. Şimdiye kadar çalışılan bakteriyel lipazların büyük bir kısmının basit yapılı, substratlarına karşı spesifik olmayan ve ancak çok azının sıcaklığa karşı kararlı oldukları bildirilmiştir [43].

Bakteriyel lipaz üretiminde, *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., ve *Chromobacterium* sp. gibi mikroorganizmalardan faydalanılmaktadır (Çizelge 2.3.) [44]. Stafilokokkal lipazlar doğada lipoprotein yapısında bulunurlar. *S. aureus* ve *S. hyicus*'tan saflaştırılan lipazlar yaklaşık olarak 34-46 kDa ağırlığındadırlar. Bu lipazlar, Ca iyonu tarafından uyarılır ve EDTA tarafından inhibe edilirler. Optimum pH 7,5-9,0 arasında değişir. *S. hyicus* ve *S. aureus*'un lipaz genleri klonlanmış, sekans analizleri yapılmış ve diğer lipazlarla karşılaştırılmıştır.

Farklı *Pseudomonas* türlerinden elde edilen lipazlar, süpernatant kültüründen asidifikasyonla, amonyum sülfat çöktürmesiyle, sefaroze CL-6B kromatografisiyle ve CHAPS kullanılarak izoelektrik odaklama ile saflaştırılmıştır. *P. fragi*, *P. fluorescens* ve *P. aeruginosa* sırasıyla 33 kDa, 45 kDa ve 29 kDa ağırlığında olup monomerik yapıdadırlar. Lipazlar, Zn, Fe ve Al iyonları tarafından aktive edilir ve Ca iyonu tarafından inhibe edilir. *P. fragi*'nin lipaz geni klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır [44].

Çizelge 2.3. Bakteriyel Lipaz Kaynaklari [31, 42, 45].

Kaynak	Cins	Tür
Bakteri	<i>Bacillus</i>	<i>B.megaterium, B.cereus</i> <i>B.stearothermophilus,</i> <i>B.subtilis</i> <i>B.thermocatenulatus, B.brevis</i> <i>B.acidocaldarius, B.coagulans</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. canosu S. aureus</i> <i>S. epidermidis S. hyicus</i> <i>S. warneri</i>
	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Lactobacillus delbruckii</i>
	<i>Stereptococcu</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus freudenreichii</i> <i>M. luteus</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acne</i> <i>Propionibacterium granulosum</i>
	<i>Burkholderia sp.</i>	<i>Bu. glumae</i>
	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>P. aeruginosa, P. fragi</i> <i>P. mendocina,P. Fluorescens</i>
	<i>Choromobacterium</i>	<i>Ch. viscosum</i>
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Aci. pseudoalcaligenes</i> <i>Aci. Radioresistens</i>
	<i>Aeromona</i>	<i>Ae. hydrophila</i> <i>Ae. sorbia LP004</i>

2.6.2. Fungal Lipazlar

Fungal lipazlarda çalışmalar 1950'lerin başında başlamış, Lawrence ve daha sonra Bockerhoff ve Jensen tarafından bu enzimler çeşitli yönlerden tartışılarak kapsamlı olarak incelenmiştir. Bu lipazlar, düşük maliyetli, ısıya ve pH'ya karşı dayanıklı olmaları, substrat özgülüğü ve organik çözücülerde aktif olmalarından dolayı kullanılmaktadırlar. Bundan sonra birçok araştırmacı termal stabilite, substrat özgülüğü ve organik solventlerdeki aktivitelerinden dolayı değerli lipaz kaynağı olarak fungusları göstermişlerdir [37]. Ticari lipazların başlıca üreticileri *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae* türleridir. Lipazlar bu küflere ilave olarak, *Penicillium cyclopium* [46], *P. citrinum* [47,48], *Aspergillus japonicus*, *Mucor japonicas* [41], *M. meihei* [40,49] tarafından da üretilmektedir.

Rhizopus'un 1,3-(regio)-spesifikliğinden dolayı, özellikle trigliseridlerin monogliseridlerine dönüşümü ve katı ve sıvı yağların interesterifikasyon reaksiyonları için çok uygun olmasından dolayı lipazlar, özellikle gıda ve farmasötik uygulamalarda çok sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Çeşitli *Rhizopus* türlerinin lipazları (40'tan 45 kDa'ya kadar olanlar) orta-zincirli yağ asitlerine karşı maksimum aktivite gösterir. Yapılan bir çalışmada *R. delemar*'ın hücre dışı ve hücre içi lipaz enzimleri izole edilebilmiştir [43].

Entomophthorales cinsleri içinde lipaz üreticileri olarak *Entomophthora apiculata*, *E. coronata*, *E. thaxteriana*, *E. virulenta*, *Basidiobolus* spp. ve *Conidiobolus* spp. sıralanabilir. *Pichia*, *Hansenula* ve *Saccharomyces* türlerinin de lipaz ürettikleri bildirilmiştir. *Saccharomyces lipolytica*'dan iki çeşit hücre bağlayıcı lipaz saflaştırılmıştır. *Candida curvata*, *C. tropicalis*, *C. valida* ve *C. pelliculosa*'dan elde edilen lipazların, *C. deformans*'ın hariç olmasıyla birlikte, trigliseridlerdeki farklı ester bağlarına karşı spesifik olmadıkları bildirilmiştir. *Geotrichum candidum*, yağın hidroliziyle süt ürünlerinde asit oluşumundan sorumludur. *G. candidum* lipazı, yağ

asitlerine karşı 9. karbondan bir cis çift bağı oluşturma özelliğine sahiptir, bundan dolayı trigliseridlerin yapısal analizleri için kullanılmaktadır. *Aspergillus niger*' in hücreler içi ve hücre dışı lipazları 1, 3-(regiyo)-spesifiklerdir. *A. oryzae*' nin, *Rhizopus miehei* ve *Humicola lanuginosa* lipazlarının heterolog durumlarında oldukça iyi bir konakçı olduğu bildirilmiştir. *Penicillium roqueforti*'nin lipazı, mavi peynir'in aromasını vermekten sorumludur. Brie ve Camembert peynirlerinin beyaz yüzlü küflü taraflarından, *P.camemberti*'de de lipolitik aktivite varlığı belirlenmiştir. Bütirik asit için özgüllük gösteren lipazlar, *Penicillium cyclopium*, *P. verrucosum* var. *cyclopium* ve *P.crustosum* gibi *Penicillium* türlerinden izole edilmektedir. *P. cyclopium* lipazı, di- ve monogliseridlere karşı trigliseridlerden daha yüksek aktiviteye sahiptirler. *H. lanuginosa* DSM 3819'un lipazı, ısıya dayanıklılığı, bazik pH' da yüksek aktivitesi ve anyonik yüzey aktif maddelere karşı dayanıklılığı sayesinde bir deterjan katkı maddesi olarak kullanılmaya uygun olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 2.4. Fungal Lipaz Kaynakları [31, 42, 45].

Kaynak	Cins	Tür
Funguslar		<i>Mucor lipolyticum</i> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Humiloca lanuginose</i> <i>Aspergillus niger</i>
Mayalar	<i>Candida sp.</i> <i>Rhodotorula sp.</i>	<u><i>Rhodotorula glutinis</i></u> <u><i>Rhodotorula rubra</i></u> <u><i>Rhodotorula pilimanae</i></u> <u><i>Rhodotorula mucilaginosa</i></u>
	<i>Saccharomyces sp.</i> <i>Torulopsis sp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>T.ernobi</i>

Lipazların endüstriyel çapta üretimi seçilmiş mikroorganizmaların kültürleri ile yapılmaktadır. Endüstriyel olarak önemli lipaz üreten mayalar *Candida cylindraceae*, *C. curvata*, *Yarrowia lipolytica*, *C. mycoderma*, *Debaraomyces mycoderma*, *Rhodotorula pilimanae*, *R. rubra*, *Geotrichum candidum* ve *Cryptococcus albidus*'tur [50, 51, 52, 53].

2.7. Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler

Lipaz üretimi, karbon ve azot kaynakları türü ve derişimi, pH, sıcaklık ve ortamdaki iyonlardan etkilenir [52]. Karbon ve azot kaynakları, mikroorganizma çoğalması için temel gereksinimlerdir. Bunun yanında temel kaynaklardan özellikle karbon kaynakları türüne göre lipaz üretimi farklı derecelerde indüklenmektedir. Sıcaklık ve pH mikroorganizmanın optimal çoğalma koşulları ve elde edilen enzimin kararlılığı açısından, ortamda bulunan iyonlar ise lipaz üretiminin çeşitli basamaklarında kofaktör olarak önem taşımaktadır.

2.7.1. Karbon Kaynakları Etkisi

Mikrobiyal lipaz üretiminde karbon kaynağı olarak çoğunlukla zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya fasulyesi yağı, susam yağı, pamuk yağı, mısır yağı, yer fıstığı yağı ve palmye yağı gibi bitkisel yağlar kullanılmıştır (Çizelge 2.5). Kullanılan yağların derişimleri % 0.5 ve % 1.5 arasında değişmekte, genellikle en uygun derişimin % 1 olduğu görülmektedir [5].

Çizelge 2.5. Çeşitli Mikroorganizmalarda en Uygun Lipaz Üreten Karbon Kaynakları (Yağlar) [31, 37].

Mikroorganizma	En uygun lipaz üreten yağ
<i>Bacillus</i> A30-1 (ATCC 53841),	Mısır yağı ve zeytinyağı
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Zeytinyağı ve palmiye yağı
<i>Rhizopus oryzae</i>	Kolza tohumu ve mısır yağının
<i>P. alcaligenes</i> M-1	Sitrik asit ve soya yağı
<i>P. aeruginosa</i> 'nın KKA-5	Hint
<i>P. mephitica</i>	Zeytin yağı, yer fıstığı yağı, pamuk yağı ile oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit
<i>Ophiostoma piceae</i>	Zeytin, soya fasulyesi, ayçiçeği, susam pamuk, mısır yağı ve yer fıstığı yağı

Lipaz üretimi için kullanılan karbon kaynaklarından biri de glukozdur; *P. fragi* lipazının üretimi için glukoz gerekli görülmüştür. *Talaromyces emersonii*'de ise kuru mikroorganizma kütlesi başına lipaz aktivitesinin, karbon kaynağı olarak laktoz, mannoz, ksiloz, fruktoz, dekstrin ve ramnoz kullanıldığında glukozla daha yüksek olduğu gözlenmiştir [36].

2.7.2. Azot Kaynakları Etkisi

Bacillus cinsi mikroorganizmalardan lipaz üretiminde, azot kaynağı olarak çoğunlukla çeşitli derişimlerde pepton ve maya özütü kullanılmıştır. Birkaç türde doğal kaynak olarak soya unu kullanımı görülmektedir [5]. Genellikle mikroorganizmalar yüksek miktarda lipazı organik azot kaynakları (özellikle polipepton, mısır unu özütü, maya

özütü) kullanıldığında sağlar. *Penicillium citrinum* türü için yapılan bir incelemede pepton içeren ortamda maksimum üretim elde edilmiştir [31].

Humicola sp., *T. lanuginosus*, *Penicillium purpurogenum* ve *Chrysosporium sulfureum* mikroorganizmalarından ısı kararlı lipaz üretim çalışmalarında azot kaynağı olarak maya özütü kullanımının yüksek lipaz üretimi verdiği açıklanmıştır. Salleh *et al.* (1993) tarafından, *Rhizopus oryzae* tarafından hücre dışı lipaz üretimi için pepton optimal azot kaynağı olarak belirlenmiştir. Lin *et al.* (1996) *P. alcaligenes* F-111 tarafından soya tozu, pepton ve maya özütü içeren ortamda bir hücre dışı alkali lipaz üretildiğini, üretilen bu lipazın aktivitesinin sodyum dodesil sülfat, sodyum tripolifosfat, sodium dodesil benzen sülfonat ve sodyum alkil benzen sülfonat gibi katyonik surfaktanlardan etkilenmediğini bildirmiştir [31].

Üre ve amonyum sülfat kullanımı genel olarak lipaz sentezini inhibe etmekte, oleik asit ve Tween 80 lipaz üretimi için hızlandırıcı etki göstermektedir [31].

2.7.3. pH etkisi

Çoğalma ortamının başlangıç pH değeri lipaz üretimi için önemlidir. Maksimum aktivite *P. fragi* için pH > 7; *P. aeruginosa* için pH = 9 iken gözlenmiş olup ortamın asitliğinin artmasının lipaz aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Buna karşılık maksimum çoğalma *S. lipolytica*, *M. caseolyticus*, *B. licheniformis*, *A. wentii*, *M. hiemalis*, *R. nigricans*, *Mucor racemosus*, *R. oligosporus*, *P. aeruginosa* EF2 için asidik pH (4.0 - 7.0) olarak açıklanmıştır [36].

2.7.4. Sıcaklık etkisi

Oso (1978), *T. emersonii* 'den lipaz üretiminde 45° C'in en iyi sıcaklık olduğunu bildirmiştir. 22–35° C aralığındaki sıcaklıkların da *A. wentii*, *M. hiemalis*, *R. nigricans*, *M. racemosus*, *R. oligosporus* ve *P. aeruginosa* 'nın maksimum lipaz üretimi için optimum olduğu açıklanmıştır [36].

P. fluorescens'ten elde edilen lipazın bir proteaz olan subtilisin tarafından 20° C'de inaktive olduğu bildirilmiş, bu etki mikroorganizma çoğalma ortamında daha yüksek sıcaklıklarda (30 – 40° C) daha fazla görülmüştür [36].

2.8. *Rhodotorula* sp.

Rhodotorula cinsinin taksonomik sınıflandırılması 1927 yılında Harrison tarafından yapılmıştır (Çizelge 2.6). *Rhodotorula* havada, toprakta, göllerde, okyanuslarda ve mandıra ürünlerinde bulunan bir mayadır. Bitkiler, insanlar ve diğer memelilerde koloni oluşturabilirler [54].

Çok yüksek oranda yağ içermeleri nedeniyle, *Rhodotorula* spp. gıdalarda bulunan en önemli maya türlerindedir. *Rhodotorula*'lar spor oluşturmazken bu mikroorganizmaların ender olarak yalancı misel oluşturdıkları saptanmıştır.

Çoğalmaları, çok yönlü tomurcuklanmayla (multilateral) olur. Kültür ortamlarında ve gıdalar üzerinde pembe, kırmızı, turuncu ve somon rengi pigment oluştururlar. Genelde, mezofilik olup, psikrofil türleri de vardır. Taze kanatlı etleri, balık, karides ve sığır kıymasında bozulma etkeni olmalarının yanı sıra, tereyağının yüzeyinde

kolaylıkla gelişirler [55]. Ayrıca, *Rhodotorula* cinsi mayalar şarapları kontamine ederek, ürünün aromasını olumsuz etkilemektedirler [56].

Rhodotorula cinsi için çalışmalarda kullanılan 3 tane aktif tür vardır: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* ve *Rhodotorula mucilaginosa* [54].

Çizelge 2.6. *Rhodotorula* Cinsinin Taksonomik Sınıflandırılması

Alem	Fungus
Filum	Basidiomycota
Sınıf	Urediniomycetes
Altsınıf	Sporidiales
Aile	Sporidiobolaceae
Cins	<i>Rhodotorula</i>

2.8.1. *Rhodotorula* sp.'nin makroskopik özellikleri

Rhodotorula kolonileri hızlı büyümekte, düzgün koloniler gözlenmekte, parlak ya da mat, bazen pürüzlü, yumuşak ve mukoittirler. Genellikle pembe, mercan kırmızısı, turuncu veya sarı kolonilerde gözlenmiştir [57].

2.8.2. *Rhodotorula* sp.'nin mikroskopik özellikleri

Rhodotorula oval şekilli düzgün bir koloni yapısı gösteren pembe renkli ve mukoid bir görünümündedir. Yalancı hif ya yoktur ya da gelişmemiştir. Hifler yoktur. *Rhodotorula*'nın *Cryptococcus*'dan farkı inositolü asimile etmemesi ve *Candida*'dan farkı ise pembe kırmızı kolonileri ve yalancı hifin olmamasıdır [57].

2.9. Atık artık

1985-90 yılları arasında başlayan endüstriyel ekonomiye geçiş dönemi nedeniyle, hızlı bir şekilde artan üretim miktar ve çeşitliliğine paralel olarak endüstriyel atıklarda da büyük ölçüde artış görülmüştür. Yeni kurulan sanayii tesislerinin çoğunluğunun büyük şehirler civarında olması, bu yörelerde ortaya çıkan kentleşme sorunlarının yanı sıra önemli çevre sorunlarını da ortaya çıkarmıştır [58]. “Biyoteknoloji” adı verilen bu çalışma alanı mikroorganizmalar yolu ile atık maddelerin parçalanması ve yeni ürün elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Mikroorganizmalar çeşitli atık artık ile hazırlanmış besiyerlerinde üretilerek lipaz verimine bakılmış ve bu maddelerin lipaz üretiminde ucuz karbon kaynağı olarak kullanılabilirliği saptanmıştır. Bu amaçla üreme ortamına karbon ve enerji kaynağı olarak şeker fabrikası atığı olan melas eklenmiştir.

2.9.1 Melas

Şeker fabrikalarında, şeker üretimi sırasında kristalleşmeyen şuruplar melası oluştururlar. Melas, şeker fabrikalarının kıvamlı koyu renkli yapışkan atıklarından biridir. Melasın şeker içeriği % 50, %30 diğer maddeler , %20 su içerir. Saf şeker miktarı 1.32 kg'dır. Şeker fabrikalarında atık olarak kalan melas; etanol, ekmek mayası, tek hücre proteini ve laktik asit üretiminde kullanılabilir. Melastan biyoteknolojik yolla etil alkolde üretilebilmektedir. Melas kristalize olmaz, ucuzdur, her zaman bulunabilir ve endüstriyel etil alkol üretimi için uygundur. *Saccharomyces cerevisiae* melastan etil alkol üretimin de çok yaygın olarak kullanılmaktadır [59].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada lipaz üretimi için mikrobiyal kaynak olarak Eskişehir il merkezine 7 kilometre uzaklıkta bulunan Hasanbey Köyü tavuk kümesinden izole edilen ve bir maya türü olan *Rhodotorula mucilaginosa* kullanıldı.

3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma

3.1.1. Mikroorganizma İzolasyonu

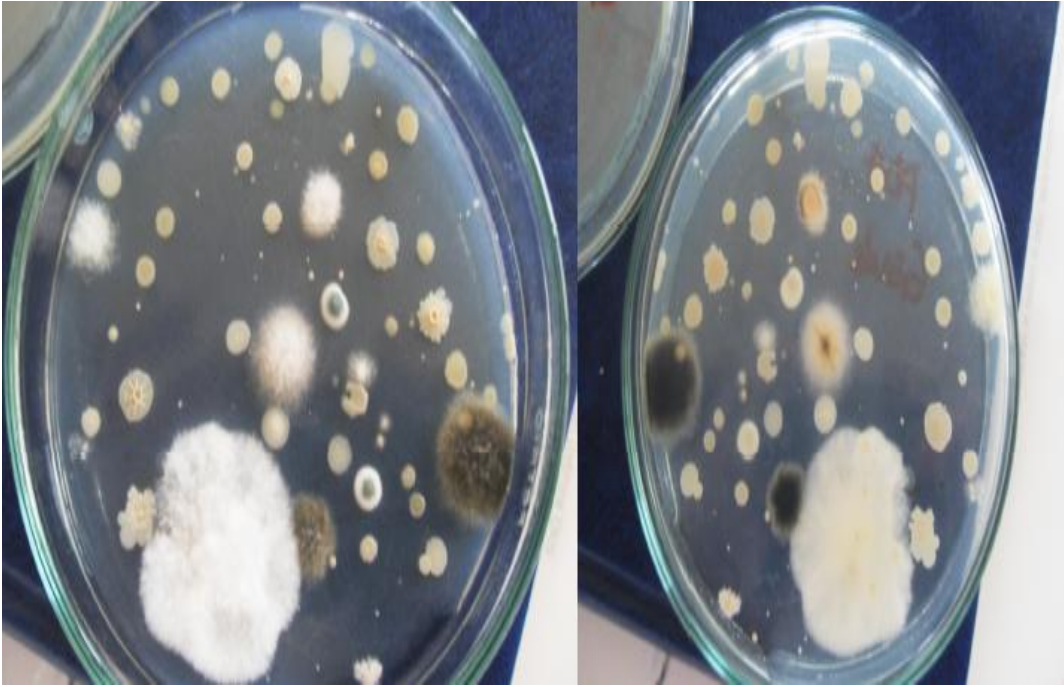
Araştırmada incelenen örnek Eskişehir ili Hasanbey Köyü tavuk kümesinden alınmıştır. Petrielerde önceden hazırlanmış PDA (Potato dextrose agar) besiyerlerini kapakları 10 dakika boyunca açık bırakılarak tavuk kümesinde bekletilmiştir (Şekil 3.1).

Daha sonra kapağı kapatılan petri etrafı parafilm ile kaplanmış ve laboratuvara ortamına taşınarak 30 °C'de 5 gün boyunca etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petride üreme gözlemlendi (Şekil 3.2).

Karışık kültür olarak üreyen mikroorganizmaları saf olarak elde etmek amacıyla seri pasaj yapıldı ve üremeleri için inkübasyona bırakıldı. Petri kaplarında çoğaltılan saf mikroorganizma, PDA içeren eğik tüplere pasajlanarak + 4°C'de saklandı. Belli sürelerle stok tazeleme yapıldı. Örnekden preparat hazırlandı, Kurutma sonrasında metilen mavisi ile 5 dakika basit boyama yapılarak kurutuldu ve sonrasında immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta 100'lük objektifte incelendi.



Şekil 3.1. Tavuk Kümesinde PDA Besiyerleri İçeren Petrinin Havaya Açılması.



Şekil 3.2. Tavuk Kümesinde Havaya Açılan PDA Besiyerinde Üreme.

3.1.2. Mikroorganizma Tür Tayini

Çalışmada kullanılan mikroorganizma türünün belirlenmesi amacıyla örnek Bioeksen Medikal ve Biyoteknolojik Araştırma Merkezi'ne tür tayini için gönderildi. Yapılan 18S rRNA analizi sonucunda, çalışmada kullandığımız mikroorganizmanın *Rhodotorula mucilaginosa* olduğu araştırma merkezi tarafından tespit edildi.

3.2. Mikroorganizmanın Tribütirin Agar Ortamında Lipolitik Aktivitelerinin Saptanması

Mikroorganizmanın lipolitik aktivitesinin tesbiti için, %1 agar, % 0,5 pepton ve %3 maya özütünden oluşan özgün lipaz besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dakika 1.5 atm basınç altında otoklavda steril edildi, 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril pipet ile % 1(0.1 ml) oranında tribütirin yağı ortama ilave edilerek karıştırıcıda homojenize edildi, önceden steril edilen tüplere 7'şer ml dağıtılıp dik durumda katılaştırıldı. PDA'lı tüplerde basit ekim yöntemiyle ekilen ve 30 °C'de inkübe edilen *Rhodotorula mucilaginosa* kültürlerinden steril mantar delici ile 1 cm çapında parçalar kesilip tüplere batırma yöntemi ile ekim yapıldı.

Tüpler 30 °C'de 7 gün boyunca inkübe edildi ve besiyerinde meydana gelen berraklık gözlemlendi. Lipolitik aktivitenin değerlendirilmesi için berraklığın derinliği 3.günden itibaren ölçüldü ve 7.güne kadar ölçüme devam edildi. Tüplerde meydana gelen berraklık lipaz pozitif (+) olarak değerlendirilirken, besiyerinde herhangi bir değişikliğin olmaması lipaz negatif (-) olarak değerlendirildi.

3.3. Mikroorganizma Ekim ve Üretim Koşulları

3.3.1. Lipaz Üretim Ortamı

Lipaz üretim ortamı mikroorganizma için uygun karbon, azot kaynaklarını ve iyonları içermektedir. Üretim ortamının bileşimi, sıcaklığı ve pH gibi enzim üretim koşulları, incelenmek istenen parametre olarak değişmektedir. Lipaz üretim ortamı olarak Hatzinikolau ve arkadaşları, 1996 tarafından önerilen besiyeri kullanıldı [60].

Besiyerinin bileşimi g/lt olarak şu şekildedir: 12 NaH₂PO₄, 2 KH₂PO₄, 0.25 CaCl₂.2H₂O, 0.3 MgSO₄.7H₄O, 0.03 ZnSO₄.7H₄O, 0.015 MnSO₄.4H₄O, 0.005 FeSO₄.7H₄O ve 1 Pepton içermektedir. Üretim ortamının pH'sı 5'e ayarlanarak 250 ml hacimli erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 1.5 atm basınç altında 121°C'de, 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Otoklav sıcaklığı 65 °C altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı ilave edildi.

3.3.2. İnokülasyon ve İnkübasyon

Tüplerde önceden hazırlanmış olan yatık PDA besiyerine *Rhodotorula mucilaginosa* suşu yayma yöntemi ile ekildi ve statik etüvde 30 °C'de 3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında elde edilen kültürler 3 McFarland (9.0x10⁸ CFU/ml) bulanıklığına ayarlandı.

Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi.

3.3.3. Üreme Eğrisinin Saptanması

Bir maya türü olan *Rhodotorula mucilaginosa*'nın üreme eğrisinin tespiti için hazırlanan lipaz üretim besiyerlerinin pH'sını 5'e ayarlayarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızında 1 - 10 gün aralığında gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örneklerin optik yoğunlukları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve elde edilen veriler grafik haline getirilerek üreme eğrisi saptandı.

3.4. Mikroorganizmada Lipaz Aktivitesi Tayini

Lipaz aktivitesinin tayininde titrasyon metodu kullanılmıştır. Kültür ortamı filtratının enzim kaynağı olarak kullanıldığı lipaz aktivite tayininde değerler formülde yerine konularak lipaz aktivite miktarı unit aktivite olarak saptandı. Kültür ortamı filtratı enzim kaynağı olarak kullanıldı ve aktivite tayini 4 basamakta gerçekleştirildi [61].

1. İnkübasyon ortamına 1 ml zeytin yağı, 4.5 ml 50 mM asetat tampon (pH 5.6), 0.5 ml 0.1 M CaCl₂ ve 1 ml filtrate ilave edildi. Kör olarak kullanılan tüpe filtrat yerine su eklendi. Enzim kaynağı olarak üretim sonrasında Whatman no: 1 filtre kağıdından süzülerek elde edilen supernatant kullanıldı.

2. Karışım çalkalamalı su banyosunda 30 °C'de 200 r.p.m de 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi.

3. Reaksiyonu durdurmak için ortamına 20 ml etanol eklendi.

4. Ortam 50 mM KOH ile pH 10.5'a kadar titre edildi. Değerler aşağıdaki formülde yerine konularak açığa çıkan yağ asidi miktarı unit aktivite olarak hesaplandı.

$$\frac{50 \times \text{Harcanan KOH Miktarı}}{30} = \text{U/ml}$$

3.5. Üremeye Bağlı Lipaz Aktivitesinin Saptanması

Enzim aktivitesinin hücre başına düşen sentez miktarı differansiyel sentez hızı olarak hesaplandı. Difransiyel sentez hızı, enzim aktivitesinin üreme miktarına oranlaması ile hesaplandı.

$$\text{Difransiyel sentez hızı} = \frac{\text{Enzim aktivite miktarı}}{\text{Mikrobiyal üreme miktarı}}$$

3.6. Üreme Ortamındaki Lipaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Saptanması

Lipaz üretimi, karbon ve azot kaynakları çeşidi ve derişimi, üretim ortamı pH ve sıcaklığından etkilenir [62].

Karbon ve azot kaynakları, mikroorganizma çoğalması için temel gereksinimlerdir. Bunun yanında temel kaynaklardan özellikle karbon kaynakları türüne göre lipaz üretimi farklı derecelerde indüklenmektedir. Sıcaklık ve pH mikroorganizmanın optimal çoğalma koşulları ve elde edilen enzimin kararlılığı açısından önem taşımaktadır.

3.6.1. Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması

Lipaz üretim ortamına *Rhodotorula mucilaginosa* ekilmiş 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızında üretime bırakılmıştır. İnkübasyonun 1 ile 10. günleri arasında her gün titrasyon metoduyla enzim aktiviteleri saptanmıştır.

3.6.2. Lipaz Sentezi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Saptanması

Enzimatik tepkimelerin hızı, hidrojen iyonu derişimine göre farklılık göstermektedir. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH değeri, optimum pH'ıdır. pH'ı optimum değerde sabit tutmak veya en azından elverişli durumda tutmak amacıyla tampon çözeltiler kullanılır. Optimum pH: kullanılan tamponun cinsi, substratın yapısı ve enzimin elde edildiği kaynakla ilişkilidir.

Üretim ortamı pH'sının lipaz sentezine etkisini belirlemek amacıyla hazırlanan üretim ortamı pH'sı 3 - 9 aralığında ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65 °C'nin altına düştüğünde %1 zeytin yağı eklendi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafikle edildi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.6.3. Üretim Ortamı Sıcaklığının Lipaz Üretimine Etkisi

Sıcaklığın *Rhodotorula mucilaginosa*'dan lipaz üretiminde lipolitik enzim aktivitesine etkisinin incelendiği çalışmada, Üretim ortamının pH'sı 5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65 °C'nin altına düştüğünde %1 zeytin yağı eklendi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1'er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 10 – 40 °C aralığında 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafiklendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.6.4. Çalkalamalı ve Statik İnkubasyon Koşullarının Lipaz Sentezine Etkisinin Saptanması

Çalkalamalı ve Statik İnkubasyon Koşullarının Lipaz Sentezine Etkisinin Saptanması amacıyla, lipaz üretim ortamına *Rhodotorula mucilaginosa* iki paralel grup olacak şekilde ekildi. Birinci grup örnekler 150 r.p.m döngüsel hızına sahip inkübatörde, diğer grup statik koşulda 30 °C'de 6 gün üretildiler. Bu süre sonrasında üretim ortamlarında lipaz aktivitesi tesbit edildi.

3.6.5. Üretim Ortamı Havalandırma Hızının Lipaz Aktivitesine Etkisi

Lipaz aktivitesine döngüsel çalkalama hızının etkisini belirlemek amacıyla lipaz üretim ortamının pH'sı 5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65 °C'nin altına düştüğünde %1 zeytin yağı eklendi. Üretim ortamına

önceden hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 100 – 250 r.p.m aralığında döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek belirlendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler çizelge ve grafik haline getirildi.

3.7. Üreme Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisi

3.7.1. Üreme Ortamına İlave edilen Farklı Karbon Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Lipaz üretiminde önemli parametreler içerisinde, üretimi en önemli derecede etkileyen faktör ortamdaki karbon kaynaklarıdır. Ortamda karbon kaynağı olarak yağların bulunmasının lipaz enzimi üretimini indükleyeceği düşünülerek öncelikle bitkisel yağların etkisi incelenmiştir. Bitkisel yağ olarak zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, mısır özü yağı ve fındık yağı kullanılmıştır.

En uygun karbon kaynağını belirlemek amacıyla temel ortam olarak kullanılan sıvı besiyerinin pH'sı 5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65 °C' nin altına düştüğünde her bir besiyerine %1 oranında değişik karbon kaynağı ilave edildi.

Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel

çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafiklendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

Şekerlerin karbon kaynağı olarak lipaz üretiminde etkisini araştırmak için tekrar lipaz üretim ortamı pH'sı 5'e ayarlanarak hazırlandı ve 250 ml'lik erlenmeyerlere dağıtıldıktan sonra her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 oranında glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, maltoz ve sukroz ilave edildi. Besiyerleri otoklavda 110 °C'de 1.5 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi, otoklavın sıcaklığı 65 °C' nin altına düştüğünde önceden hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafiklendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

Son olarak %1 zeytin yağına ilave olarak şekerlerin lipaz aktivitesi etkisini incelemek amacıyla üretim ortamlarının pH'sı 5.0'e ayarlanarak 100 ml olacak şekilde 250 ml'lik erlenmeyerlere dağıtıldı ve her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 oranında glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, maltoz ve sukroz ilave edilerek 110 °C'de 1.5 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi, otoklavın sıcaklığı 65 °C' nin altına düştüğünde besiyerlerine %1 oranında zeytin yağı eklendi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafiklendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.7.2. Üreme Ortamına İlave edilen Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Farklı azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla hazırlanan lipaz üretim ortamını 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı, her besiyerlerine sırasıyla %1 oranında pepton, amonyum sülfat, üre, maya özütü, kazein, amonyum oksalat, amonyum karbonat ve proteose pepton ilave edililerek pH'ları 5'e ayarlanarak 110 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Ortam sıcaklığı 65 °C'nin altına düştüğünde %1 zeytin yağı eklenerek, Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafikleildi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

Bu çalışmada azot kaynaklarının lipaz aktivitesine ve mikrobiyal üremeye etkisi incelemek amacıyla hazırlanan üretim besiyerine sadece %1 oranında pepton, amonyum sülfat, üre, maya özütü, kazein, amonyum oksalat, amonyum karbonat ve proteose pepton azot kaynağı olarak eklendi, daha sonra besiyeri pH'ları 5.0'e ayarlanarak 110 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafikleildi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.8. Reaksiyon Ortamında Uygun Fizyolojik Koşulların Saptanması

Lipaz aktivitesi için reaksiyon ortamının uygun inkübasyon sıcaklığı, süresi ve substrat konsantrasyonu belirlenmesi amacıyla *Rhodotorula mucilaginosa* kültür ortamı supernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı. Bu amaçla *Rhodotorula mucilaginosa*'nın temel besiyerinde, 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 6 günde üretimi gerçekleştirildi

3.8.1. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

İnkübasyon sıcaklığını saptamak amacıyla yapılan bu deneyde, üretim ortamı koşulları sabit tutularak tepkime ortamı 30 – 90 °C arasında değişen sıcaklıklarda denenmiştir. Bu deneyde üretim ortamının pH'sı 5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Otoklav sıcaklığı 65 °C'nin altına düştüğünde %1 zeytin yağı eklendi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1'er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek hücresel kısım uzaklaştırıldı ve supernatant (filtrat) elde edilerek enzim aktivitesi incelendi. Enzim aktivitesinin ilk aşamasında 1 ml substrat olan zeytin yağı ile 1 ml enzim örneği olarak kullanılan supernatant 10 – 90 °C sıcaklık arasında ayrı ayrı 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda lipaz aktivitesi titrasyon metoduyla belirlenerek elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.8.2. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Süresinin Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

İnkübasyon süresinin enzim aktivitesine etkisini incelemek amacıyla yapılan bu deneyde, üretim ortamı koşulları sabit tutularak tepkime ortamı 30 – 90 dakika aralığında değişen farklı inkübasyon sürelerinde denendi. Bu deneyde üretim ortamının pH'sı 5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65 °C'nin altına düştüğünde %1 zeytin yağı eklendi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek hücresel kısım uzaklaştırıldı ve supernatant (filtrat) elde edilerek enzim aktivitesi incelendi. Enzim aktivitesinin ilk aşamasında 1 ml substrat olan zeytin yağı ile 1 ml enzim örneği olarak kullanılan supernatant 10 – 90 °C sıcaklık arasında ayrı ayrı 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda lipaz aktivitesi titrasyon metoduyla belirlenerek elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.8.3. Reaksiyon Ortamı Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisini incelemek amacıyla yapılan bu deneyde, üretim besiyerinin pH'sı 5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65 °C'nin altına düştüğünde %1 zeytin yağı eklendi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman

no: 1 kağıdından süzülerek hücresel kısım uzaklaştırıldı ve supernatant (filtrat) elde edildi. Enzim aktivitesinin tayininde substrat olarak kullanılan zeytin yağı %0.5 – 3 ml arasında değişen yoğunlukları sabit miktardaki enzimle reaksiyona sokularak 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda lipaz aktivitesi titrasyon metoduyla belirlenerek elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.9. Belirlenen Optimum Koşullarda Lipaz Üretimi ve Aktivitesinin Saptanması

Rhodotorula mucilaginosa'dan lipaz üretimi için en iyi koşullar belirlendikten sonra bu koşullarda (pH=5.0, Sıcaklık=30 °C, karbon kaynağı: %1 zeytinyağı yağı, azot kaynağı: %1 pepton), 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı, 121 °C'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65 °C'nin altına düştüğünde %1 zeytin yağı eklendi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 200 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafiklendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.10. Atık ve Artık Değerlendirme Çalışmaları

3.10.1 Melasın *Rhodotorula mucilaginosa* Suşunun Üreme ve Lipaz Sentezine Etkisinin Saptanması

Şeker fabrikasının atığı olan melasın lipaz üretimine etkisini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada, başka hiçbir katı maddesi eklenmeden distile su ile farklı

oranlarda sulandırılarak %1, %2, %3, %4 ve %5 oranlarında total şeker içerecek şekilde hazırlandı. Daha sonra her bir ortamın pH'ları 5.0'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 110 °C'de 1.5 atm basınç altında 10 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 6 gün süresiyle gerçekleştirildi bu süre sonrasında üreme ve lipaz aktivitesi ölçülerek en uygun melas oranı saptandı.

Daha sonra aynı işlemlere ilaveten üretim ortamına %1 zeytin yağı eklenerek pH 5'e ayarlandı, 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 110 °C'de 1.5 atm basınç altında 10 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 6 gün süresiyle gerçekleştirildi bu süre sonrasında üreme ve lipaz aktivitesi ölçülerek en uygun melas oranı saptandı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma

4.1.1. Mikroorganizma İzolasyon ve Tanımlama

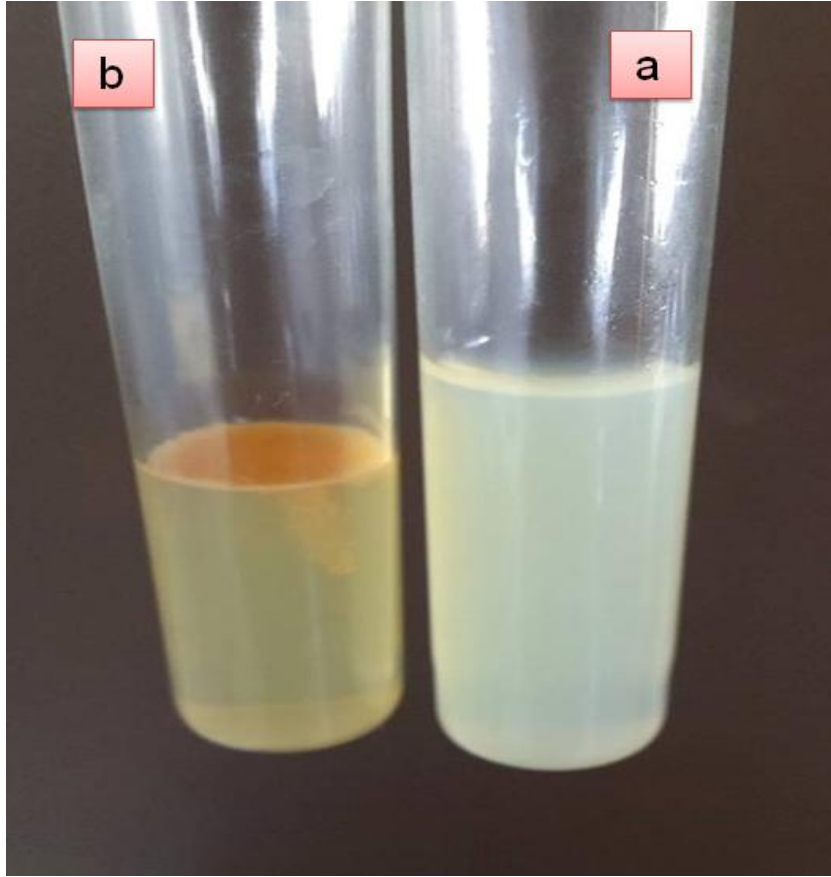
Eskişehir ili Hasanbey Köyünde tavuk kümesine petrielerde hazırlanmış PDA (Potato dextrose agar) besiyeri kapakları açık bırakılarak 10 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra PDA besiyerinde 30°C'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılan ortamlarda karışık kültür olarak üreyen mikroorganizmalar saflaştırılarak +4 °C'de buzdolabında saklandı. Örneklerden preparat hazırlandı, Kurutma sonrasında metilen mavisi ile 5 dakika basit boyama yapılarak kurutuldu ve sonrasında immersiyon yağı damlatılıp mikroskopta 100'lük objektifte mikroorganizmanın morfolojisi incelendi.

4.1.2. Mikroorganizma Tür Tayini

Çalışmada kullanılan mikroorganizma türünün belirlenmesi amacıyla örnek Bioeksen Medikal ve Biyoteknolojik Araştırma Merkezi'ne tür tayini için gönderildi. Yapılan 18S rRNA analizi sonucunda, çalışmada kullandığımız mikroorganizmanın *Rhodotorula mucilaginosa* olduğu araştırma merkezi tarafından tespit edildi.

4.2. Mikroorganizmada Tribütirin Agar Ortamında Lipolitik Aktivitelerinin Saptanması

Rhodotorula mucilaginosa lipolitik aktivitesinin tespiti için Tributirinli Agar besiyerine 30 °C'de 7 günlük inkübasyon süresi sonunda, tüplerde meydana gelen berraklık gözlemlendi (Şekil 4.1.). Tüplerde meydana gelen berraklık lipaz pozitif (+) olarak değerlendirilirken, besiyerinde herhangi bir değişikliğin olmaması lipaz negatif (-) olarak değerlendirildi.



Şekil 4.1. Tribütirin Agarda *Rhodotorula mucilaginosa* Suşunun Lipolitik Aktivitesinin Belirlenmesi.

a : Kontrol tüpü.

b : Örnek tüpü lipaz (+)

Birçok araştırmacı, çalışılan mikroorganizmaların lipolitik aktivitelerini belirlemek amacıyla tribütirin agar yöntemini kullanmıştır [62, 66, 67]. Besiyerinde substrat olarak kullanılan tribütirin karbon kaynağı olarak dört karbonlu sentetik bir trigliserittir [68]. Tribütirinin lipaz aktivitesine özgül bir substrat olmadığı, fakat lipazlar tarafından da hidroliz edildiği bildirilmiştir [69].

4.3. Mikroorganizmada Lipaz Aktivite Tayini

Rhodotorula mucilaginosa suşunda lipaz aktivitesi tayininde titrasyon yöntemi kullanıldı. Kültür ortamı filtratının enzim kaynağı olarak kullanıldığı deneyde elde edilen veriler formülde yerine konularak lipaz aktivite miktarı saptandı. 1 unite lipaz aktivitesi uygun koşullar altında yağ asidini açığa çıkaran aktivite olarak belirlendi.

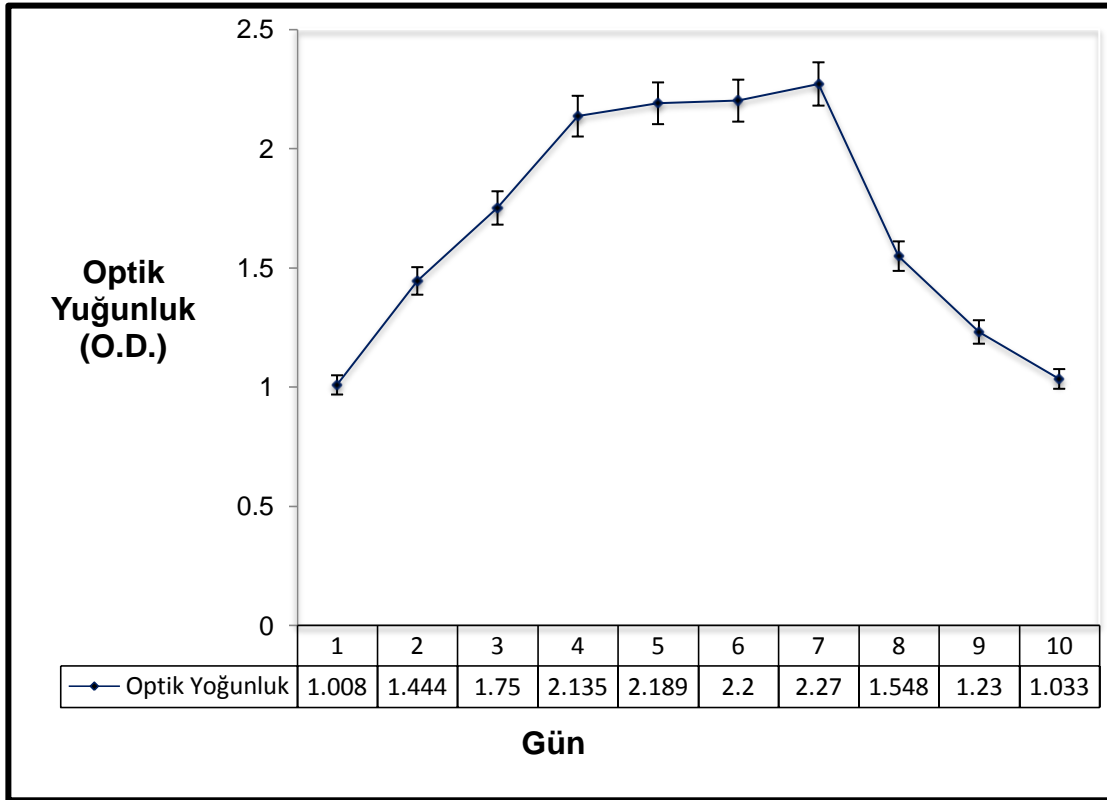
Yapılan farklı çalışmalarda titrasyon metoduyla lipaz aktivitesinin tayininde zeytinyağı, triolein, tribütirin, triasetin, tripropiyonin gibi farklı substratlar da kullanılmaktadır [68, 70, 71, 72].

Sztajer vd., (1988) tarafından yapılan bir çalışmada fungus, aktinomiset ve bakteriler tarafından ekstraselüler lipaz üretimi için süt ve süt ürünleri ile bitkisel yağları içeren 60 farklı örnekten lipolitik aktiviteye sahip 160 suş izole etmişlerdir. Tribütirin agar yöntemi kullanılarak izole edilen bu suşlar içinde, bakteri, aktinomiset ve fungusları içeren 19 suş en yüksek lipaz aktivitesi göstermiştir. Bu suşların lipolitik aktivitesi zeytin yağı ve Tribütirin kullanılarak titrasyon yöntemi ile doğrulanmıştır [73].

4.4. Üreme Eğrisinin Saptanması

Bir maya türü olan *Rhodotorula mucilaginosa*'nın üreme eğrisinin tespiti için hazırlanan lipaz üretim ortamlarının pH'sını 5'e ayarlayarak steril koşullarda 1 ml olacak şekilde ekim yapıldı ve inkübasyon 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızında ayarlanarak, 1.0 - 10 gün aralığında gerçekleştirildi. Üreme O.D. değeri Jenway spektrofotometre'de 450 nm'de belli aralıklarla ölçüldü. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması alınarak hesaplanmış ve üreme eğrisi grafik üzerinde gösterildi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda üreme eğrisi grafiğinde de görüldüğü gibi 4. Güne kadar log fazı, 4. günden 7. güne kadar durgunluk fazı ve 7. günden 10. güne kadar ise ölüm fazı belirlendi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *Rhodotorula mucilaginosa* Kültür Ortamında Üretim Miktarının Günlere Göre Değişimi

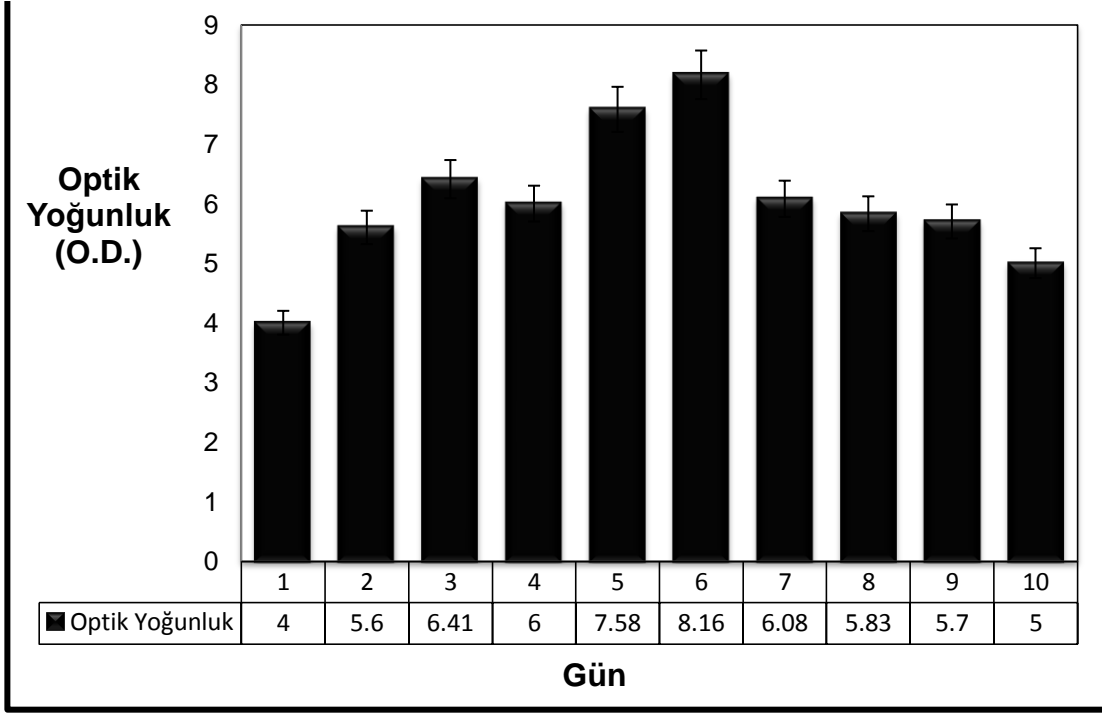
4.5. Üreme Ortamındaki Lipaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Saptanması

4.5.1. Optimum İnkübasyon Süresinin Saptanması

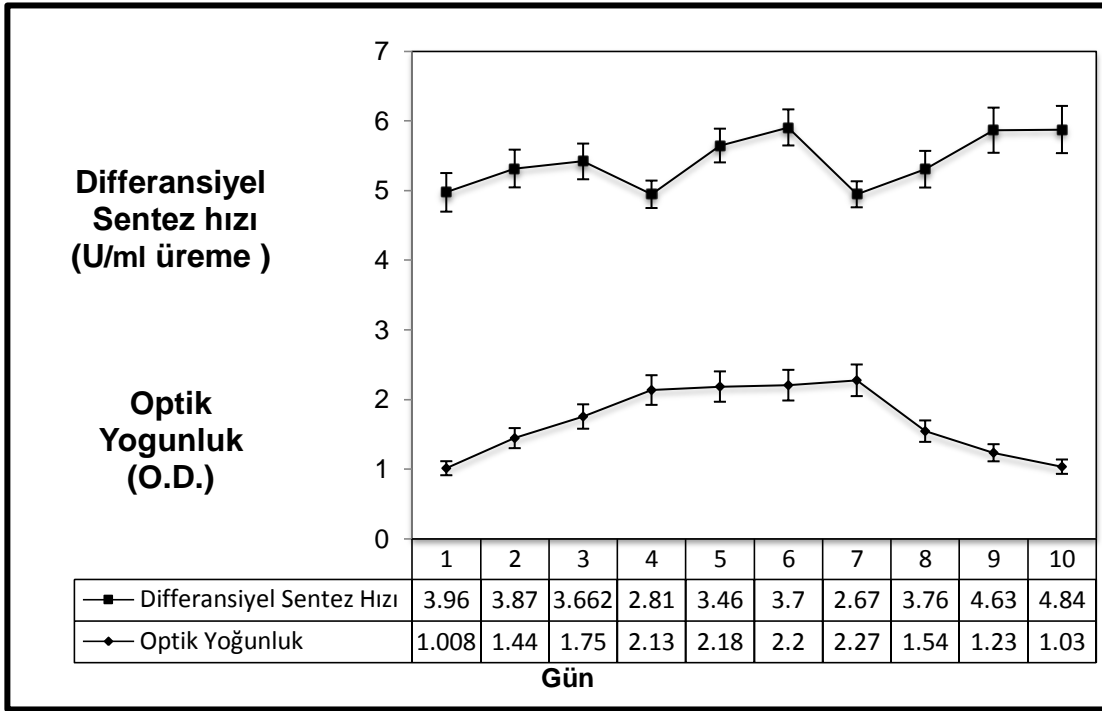
Rhodotorula mucilaginosa suşunda lipaz aktivitesinin en yüksek olduğu inkübasyon süresini günlere göre belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, 1.0 - 10 gün aralığında lipaz aktivitesi ve üreme ölçüldü. Sonuçlar Çizelge 4.1. ve Şekil 4.3. da gösterildi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde lipaz sentezinin en yüksek 8.16 U/ml olduğu saptanarak grafiklendi (Şekil 4.3.). Bu enzim ile yapılan çeşitli çalışmalara bakıldığında enzimin en yüksek seviyede sentezlendiği inkübasyon sürelerinin, kullanılan besiyeri ortamı ve mikroorganizma bağlı olarak çeşitlilik gösterdiği görüldü.

Rapp ve Backhaus (1992), belirledikleri mikroorganizmalarda lipaz aktivitelerini ölçmek için mikroorganizmaları %1 zeytinyağı içeren çalkalamalı kültürde büyütürken titrimetrik olarak lipaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Çalkalamalı kültürde büyütülen 34 küf, 15 maya ve 21 bakteri en yüksek aktiviteyi göstermişlerdir. Küfler arasında en iyi aktiviteyi *Rhizopus* türleri göstermiştir. *Rhizopus circinans* 96 saatlik inkübasyon sonunda 44 U/mL ile en iyi aktivite gösteren tür olarak belirlenmiştir [74].



Şekil 4.3. *Rhodotorula mucilaginosa* Kültür Ortamında Lipaz Aktivitesinin Günlere Göre Değişimi.



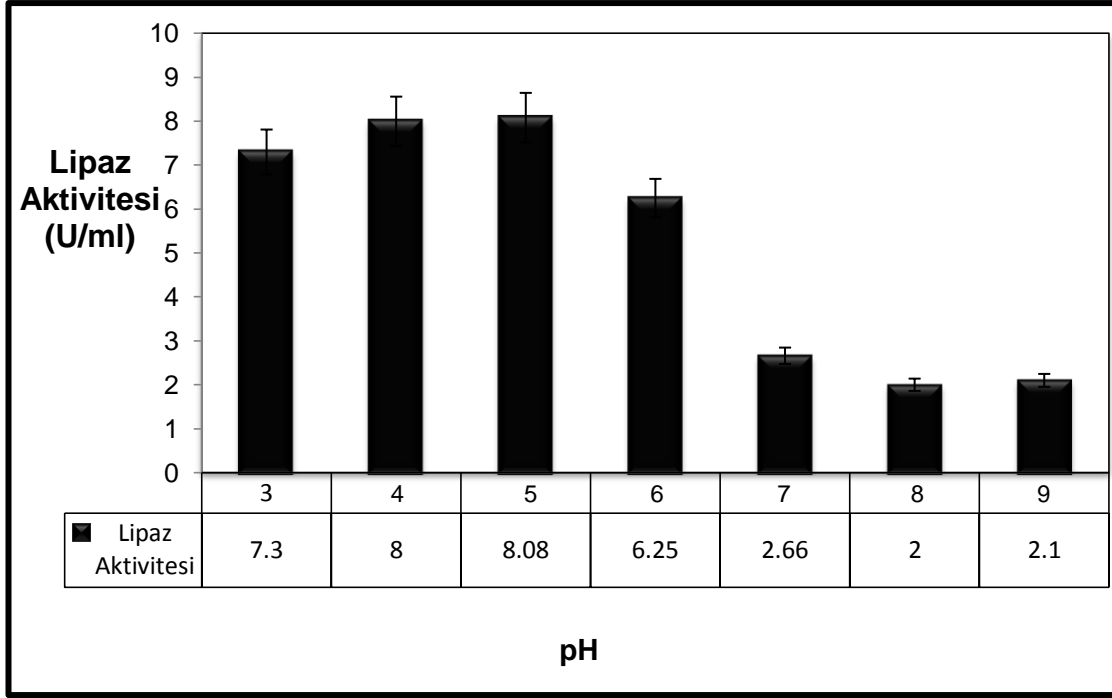
Şekil 4.4. *Rhodotorula mucilaginosa* Kültür Ortamında Üreme Miktarı ve Diferansiyel Sentez Hızının Günlere Göre Değişimi.

4.5.2. Lipaz Sentezi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Saptanması

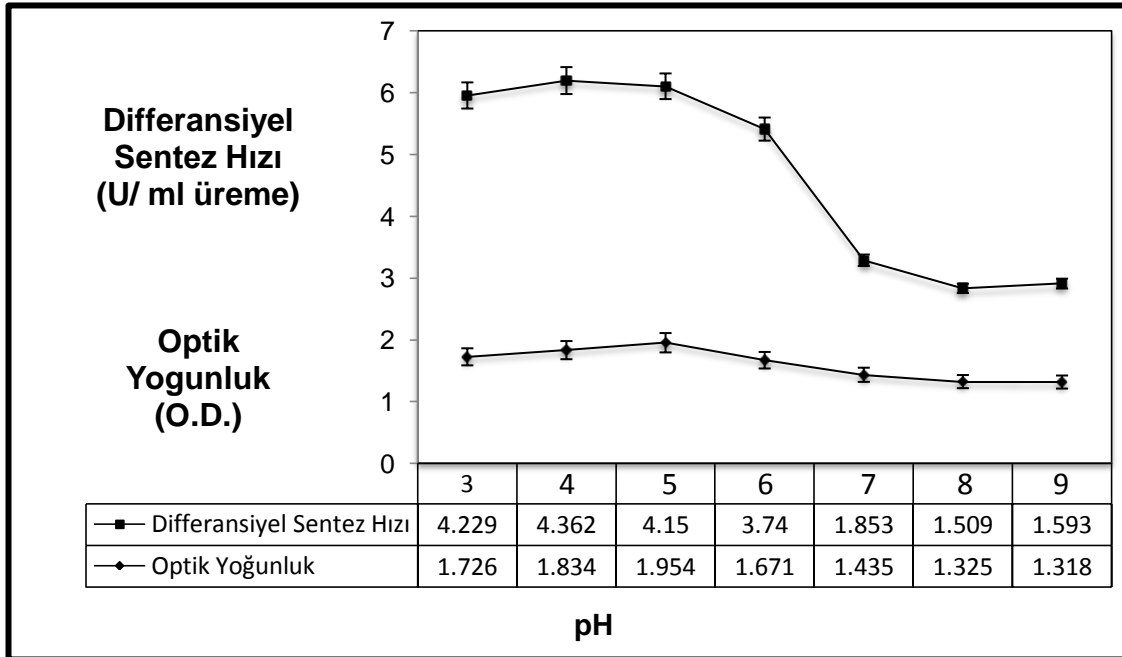
Uygun başlangıç pH değerinin tespiti için temel besiyerinin pH'sını 3.0 – 9.0 aralığında ayarlandı. Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde 6 günde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek belirlendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler çizelge ve grafik haline getirildi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunun optimum lipaz üretim i için en uygun pH değeri 5.0 olarak belirlendi, pH 7.0 – 9.0 aralığında ise üremenin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.5.), optimum üremenin pH 4.0 - 5.0 aralığında diğer pH değerlerine göre daha yüksek olduğu belirlenirken, optimum differansiyel sentez hızı pH 4.0 olarak tespit edildi, pH 3.0 – 5.0 aralığında sentez hızında çok fazla değişiklik saptanmaziken pH 7.0'e en düşük sentez hızı tespit edilerek grafiklendi (Şekil 4. 6.).

Temel ortamının başlangıç pH'sı lipaz üretimi için önemlidir [33]. Lipazlar sadece katalitik olarak belirli pH'larda aktiftirler. Lipazlar, pH 4 ve pH 10 aralığında aktif olduğu halde birçok lipaz için optimum pH'nın 7-9 arasında olduğu bildirilmiştir [75]. Literatürde yüksek pH kararlılığına sahip birçok lipaz bildirilmiştir. Bunlardan bazıları, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus japonicas*, *Aspergillus terreus* lipazlarıdır. Fungal lipazların pH kararlılıkları büyük oranda benzerlikler göstermektedir [76, 77, 78]. 1999 da Crozo ve Revah'ın yaptıkları deneyler sonucunda bir maya türü olan *Yarrowia lipolytica* suşunda pH 4.7 de en yüksek lipaz aktivitesi belirlemişler [79]. Kebabcı 2010 yılında yaptığı çalışmada *Yarrowia lipolytica* ve *Candida tropicalis* suşlarında lipaz aktivitesinin en yüksek olduğu pH'yı 3.0 – 6.0 olarak saptamıştır ve pH 7.0 den itibaren aktivitenin tespit etmiştir [80].



Şekil 4.5. Farklı Başlangıç pH Değerlerine Ayarlanmış Üretim Ortamlarında Lipaz Üretimi.



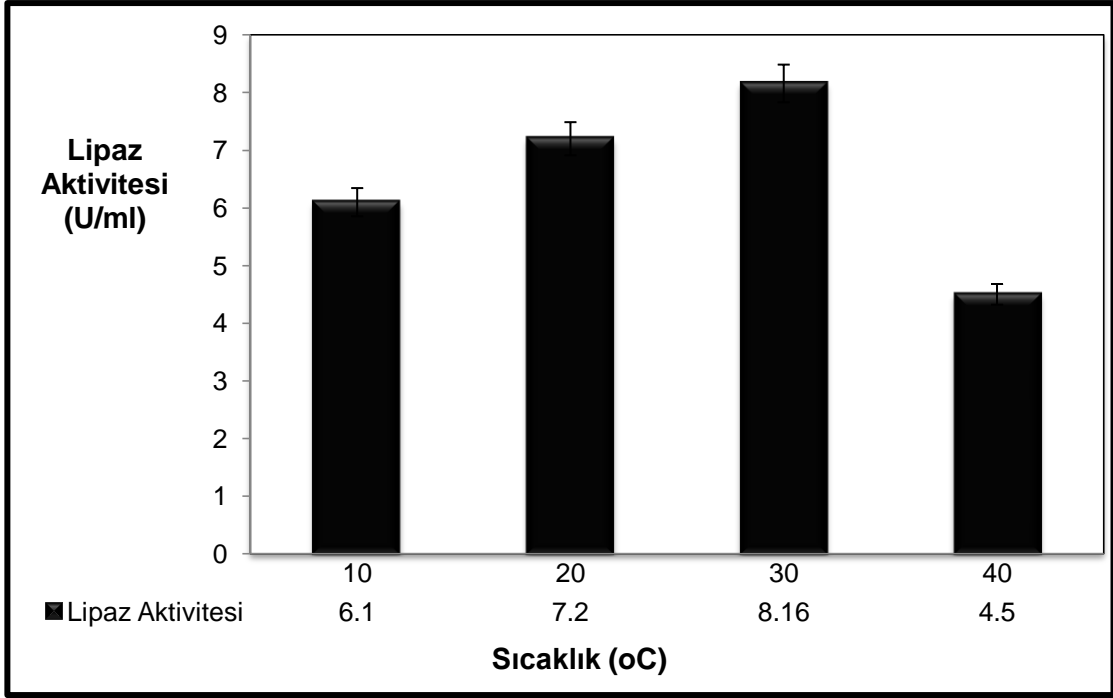
Şekil 4.6. Farklı Başlangıç pH Değerlerine Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.

4.5.3. Lipaz Üretimi İçin Uygun Sıcaklığın Saptanması

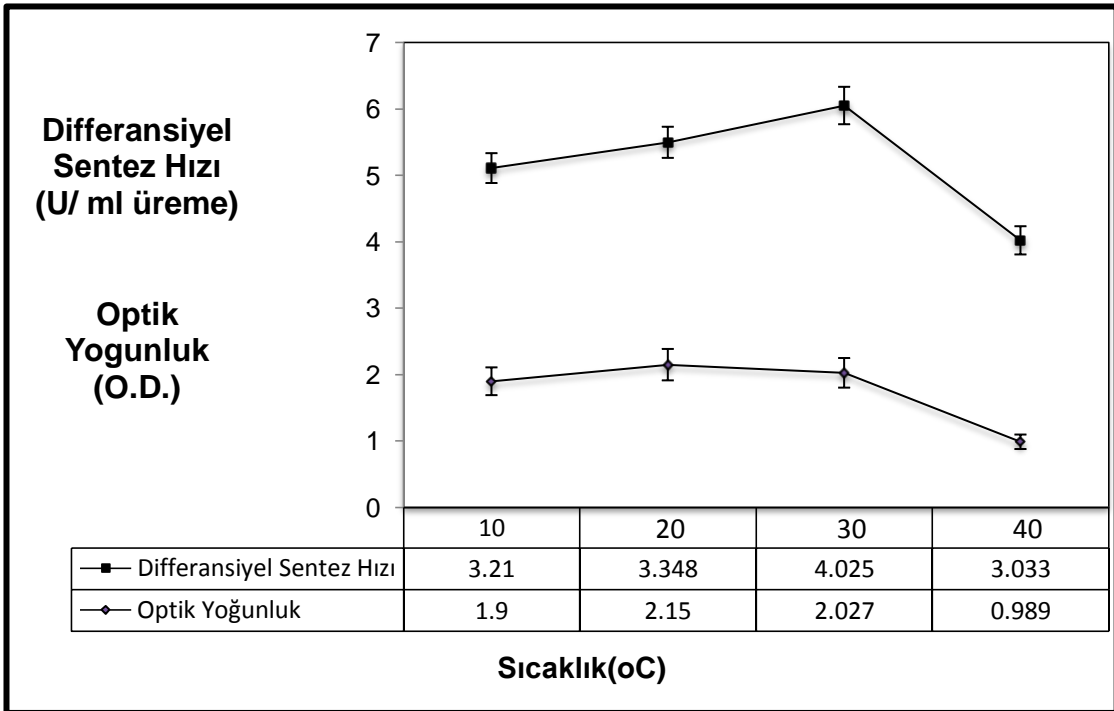
İnkübasyon sıcaklığının lipaz üretimine etkisini belirlemek için yapılan bu çalışmada temel besiyeri pH'sı 5.0'e ayarlanarak, Hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim sıcaklığı 10 - 40 °C aralığında 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızında 6 gün olarak ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçüldü. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler çizelge ve grafik haline getirildi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde maksimum lipaz üretim sıcaklığının 20 – 30 °C, optimum üretim sıcaklığının ise 30 °C olduğu ve üremenin artan sıcaklık ile düştüğü belirlendi (Şekil 4.7.). Optimum üreme sıcaklığının 20 °C olduğu belirlendi, buna karşın maksimum differansiyel sentez hızının 30 °C sıcaklığında olduğu saptanarak grafiklendi (Şekil 4.8.).

Lipaz üretimi için optimum sıcaklığın mikroorganizmanın kendi gelişme sıcaklığı ile aynı olduğu bildirilmiştir [33]. *Yarrowia lipolytica* ile yapılan benzer bir çalışmada lipaz enzimi üretimi için uygun sıcaklığın 29.5 °C olduğu saptanmıştır [79]. Ho ve ark., 2002'de gerçekleştirdikleri çalışmada ise *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178 suşunda lipaz üretimi 27.5°C sıcaklığında en yüksek aktiviteye ulaşmışlardır [81]. *Yarrowia lipolytica* ve *Candida tropicalis* suşları ile yapılan bir diğer çalışmada bulgularımızla paralel olarak 30 °C'nin lipaz enzimi üretimi için en uygun sıcaklık olduğu görülmektedir [80]. M. N. Hosseinpour ve ark., *A. niger* ATCC MYA-135 ve *Rhizopus oryzae* ile lipaz enzimi üretiminde üretirken en yüksek aktiviteyi 30.3°C sıcaklığında tespit etmişlerdi [82]. He and Tan (2006), *Candida* sp. Türleri ile gerçekleştirdikleri lipaz üretimi çalışmalarında en yüksek aktiviteyi 26 °C sıcaklığında elde etmişlerdir [83].



Şekil 4.7. İnkübasyon Sıcaklığının *Rhodotorula mucilaginosa*'dan Lipaz Üretimine Etkisi.



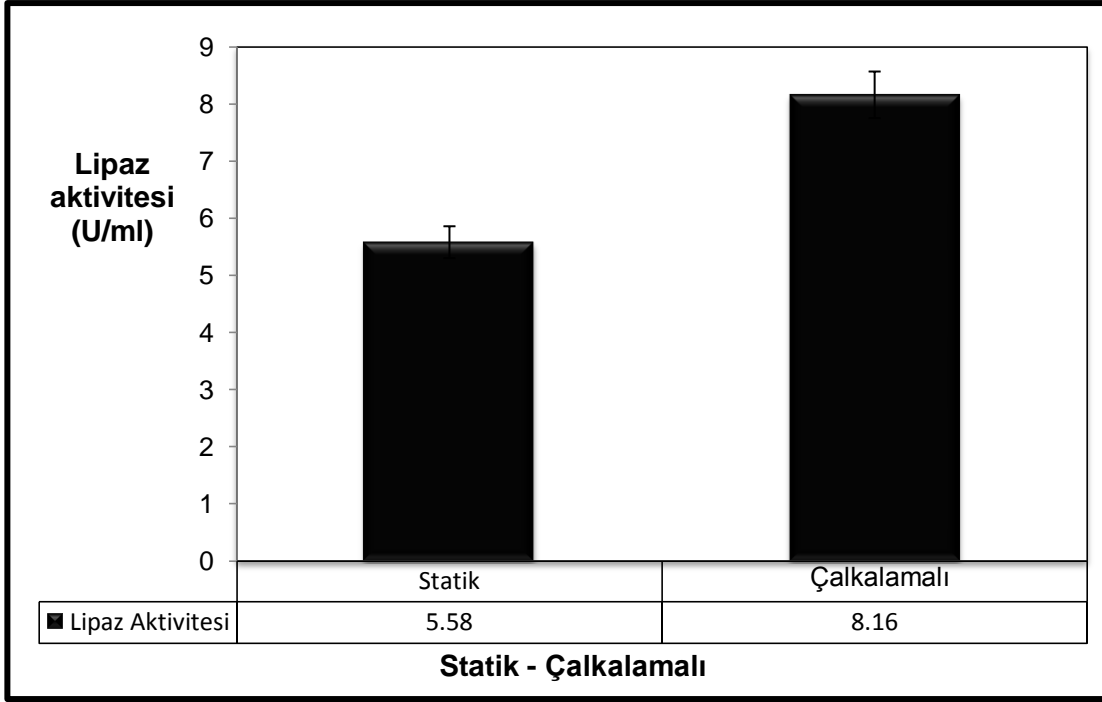
Şekil 4.8. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarına Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi..

4.5.4. Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

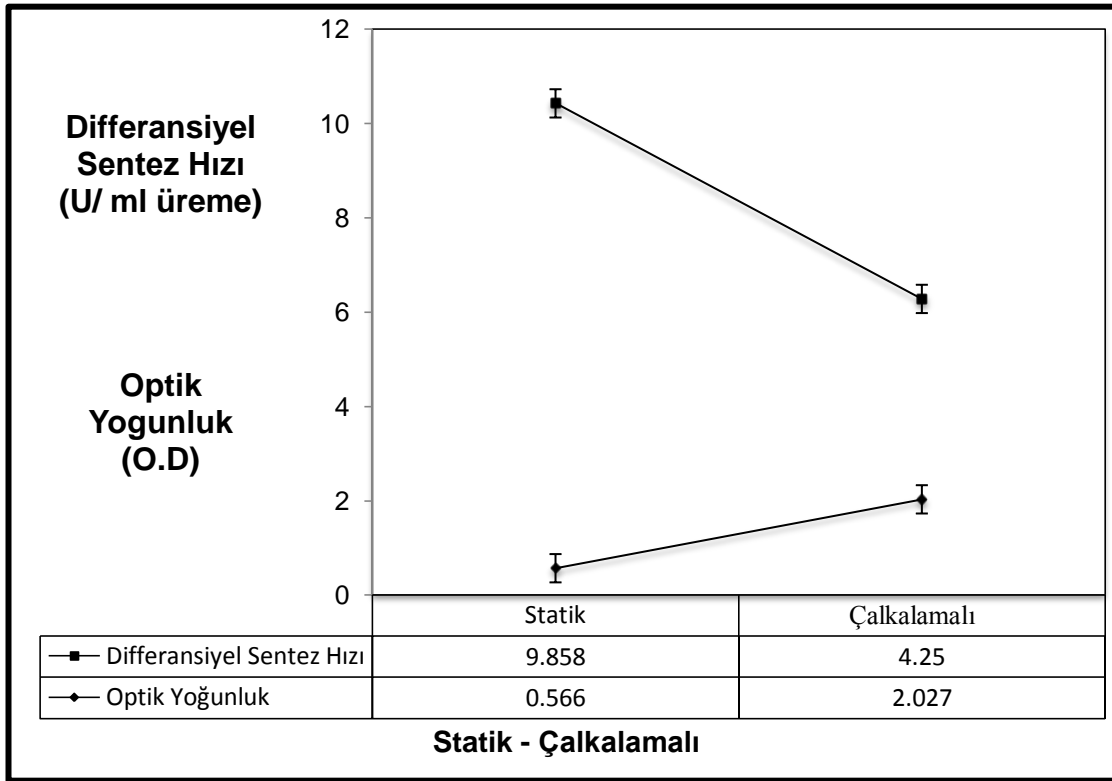
Lipaz aktivitesine çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının etkisini tespit etmek amacıyla lipaz üretim ortamına *Rhodotorula mucilaginosa* iki paralel grup olacak şekilde ekildi. Birinci grup örnekler 150 r.p.m döngüsel hızına sahip inkübatörde, diğere grup statik koşulda 30 °C'de 6 gün üretildiler. Bu süre sonrasında üretim ortamlarında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek grafiklendi. Daha sonra örnekler Whatman no:1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde lipaz aktivitesinin çalkalamalı inkübasyon koşulunda daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.9.), üreme miktarının çalkalamalı koşulda en yoğun olduğu tespit edildi (Çizelge 4.10.). Her ne kadar differansiyel sentez hızı statik koşullarda çalkalamalı koşullara göre daha yüksek bulunsa da bunu üremenin çok az oluşu ile açıklamak mümkündür.

Yapılan diğere araştırmaları incelediğimizde genel olarak mikroorganizmalar özellikle maya türlerinin lipaz üretimi çalkalamalı koşullarda gerçekleşmektedir. Teng ve Xu, (2008), yeni izole ettikleri *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 suşu ile lipaz üretmek için üretim ortamını çalkalamalı etüvde üretimi gerçekleştirerek en yüksek lipaz aktivitesini 13.875 U/ml olarak tespit etmişlerdir [84]. Kaushik ve arkadaşları, (2006), *Aspergillus carneus'dan* lipaz üretimi çalışmaları sonucunda, en yüksek lipaz aktivitesine çalkalamalı etüvde üretimi gerçekleşen ortamlarda 12.7 U/ml olarak tespit etmişlerdir [85].



Şekil 4.9. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının Lipaz Aktivitesine Etkisi.



Şekil 4.10. Statik ve Çalkalamalı İnkübasyon Koşullarının *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.

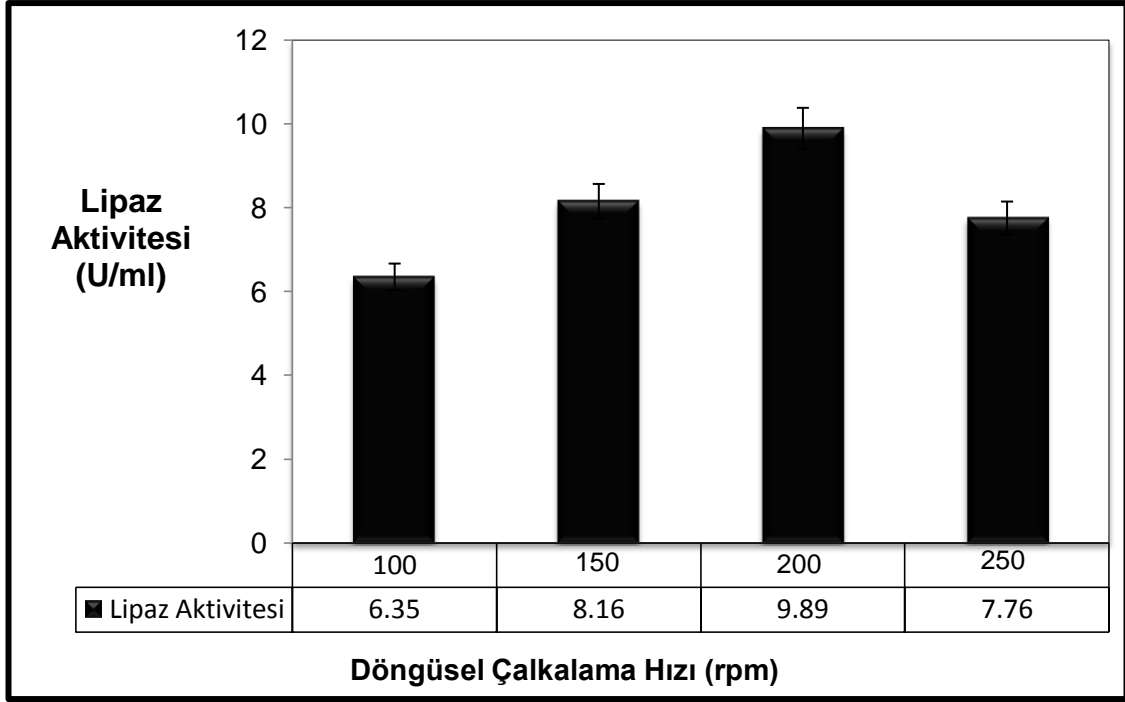
4.5.5. Üretim Ortamı Havalandırma Hızının Lipaz Aktivitesine Etkisi

Lipaz aktivitesine döngüsel çalkalama hızının etkisini belirlemek amacıyla lipaz üretim ortamına önceden hazırlanmış olan 3 McFarland standardındaki kültürlerden steril koşullarda 1' er ml alınarak üretim ortamına inoküle edildikten sonra üretim 30 °C'de 100 – 250 r.p.m aralığında döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek belirlendi. Daha sonra örnekler Whatman no:1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler çizelge ve grafik haline getirildi.

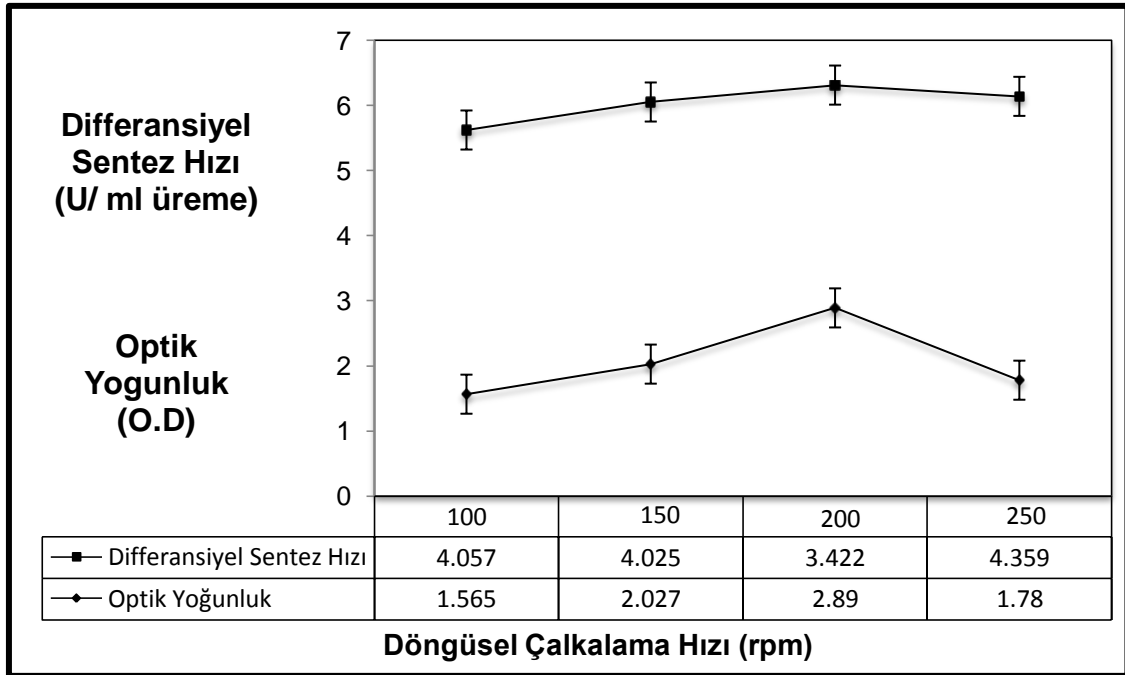
Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde en yüksek lipaz aktivitesi 200 r.p.m'de ve optimum döngüsel çalkalama hızının 150 – 200 r.p.m'de olduğu tespit edildi (Şekil 4.11.), En yoğun ürettiği döngüsel çalkalama hızı 200 r.p.m ve maksimum differansiyel sentez hızı ise 250 r.p.m olarak saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi (Şekil 4.12.).

Yapılan diğer çalışmaları incelediğimizde genellikle mayaların en yüksek lipaz üretimleri 150 - 250 r.p.m olarak görülmektedir. Potumarthi ve arkadaşları., (2008). *Rhodotorula mucilaginosa* suşu üzerinde farklı döngüsel çalkalama hızlarını (100, 200 ve 300 rpm) deneyerek bu mikroorganizmanın 200 r.p.m de en fazla lipaz aktivitesinin olduğunu göstermişlerdir [86]. Bir diğer çalışma ise *Y. lipolytica* üzerinde Alonso ve arkadaşları tarafından (2005), farklı döngüsel hızlarında (100 - 400 rpm) gerçekleştirmişlerdir ve elde ettikleri sonuçlara göre bu türün 200 r.p.m de en yüksek lipaz ürettiğini belirlemişler [87].

Düşük karıştırma hızı oksijen seviyesi ve alımını etkileyen iken daha yüksek bir karıştırma hızı, mikroorganizma için mekanik ve / veya oksidatif stres neden olabilir.



Şekil 4.11. Farklı Döngüsel Çalkalama Hızının Üretim Ortamında Lipaz Aktivitesi Etkisi.



Şekil 4.12. Farklı Döngüsel Çalkalama Hızına Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.

4.6. Üreme Ortamına İlave Edilen Farklı Karbon ve Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisi

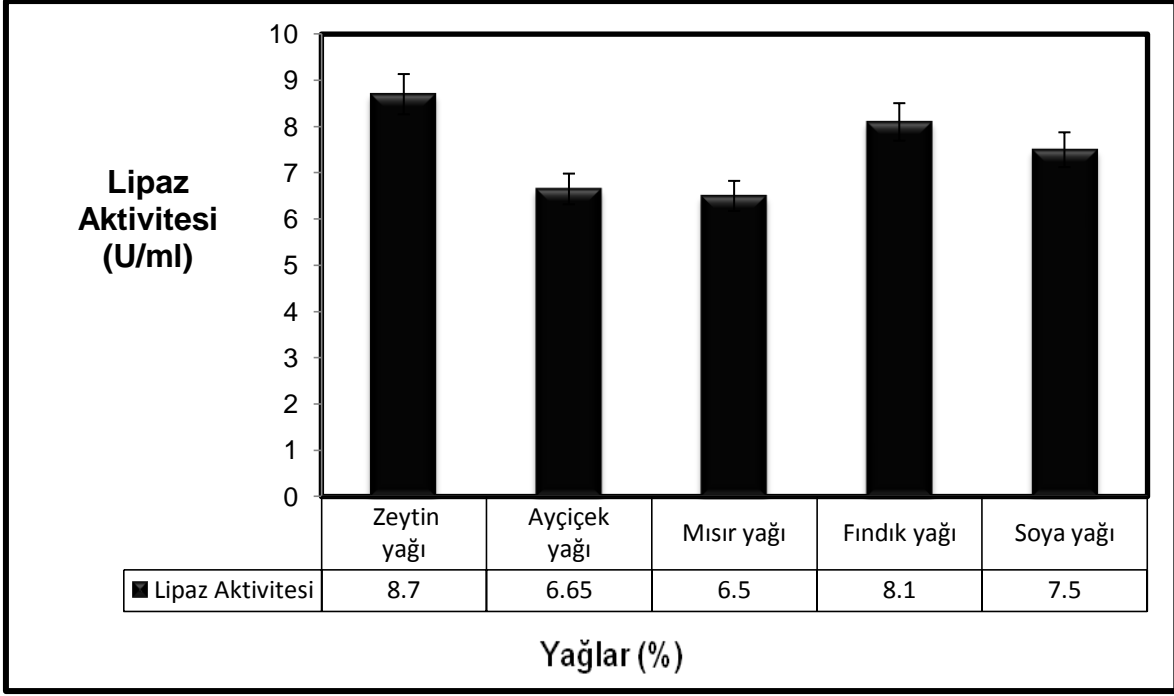
4.6.1. Üreme Ortamına İlave edilen Farklı Karbon Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine etkisi

Lipaz üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada farklı yağlar ve şekerler karbon kaynağı olarak seçilmiştir. Öncelikle lipaz üretim besiyerleri pH'sı 5.0'e ayarlanarak hazırlandı, her bir besiyerine karbon kaynağı olarak ayrı ayrı %1 oranında zeytin yağı, ayçiçek yağı, mısır yağı, soya yağı, fındık yağı ilave edildi ve üretim gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek belirlendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

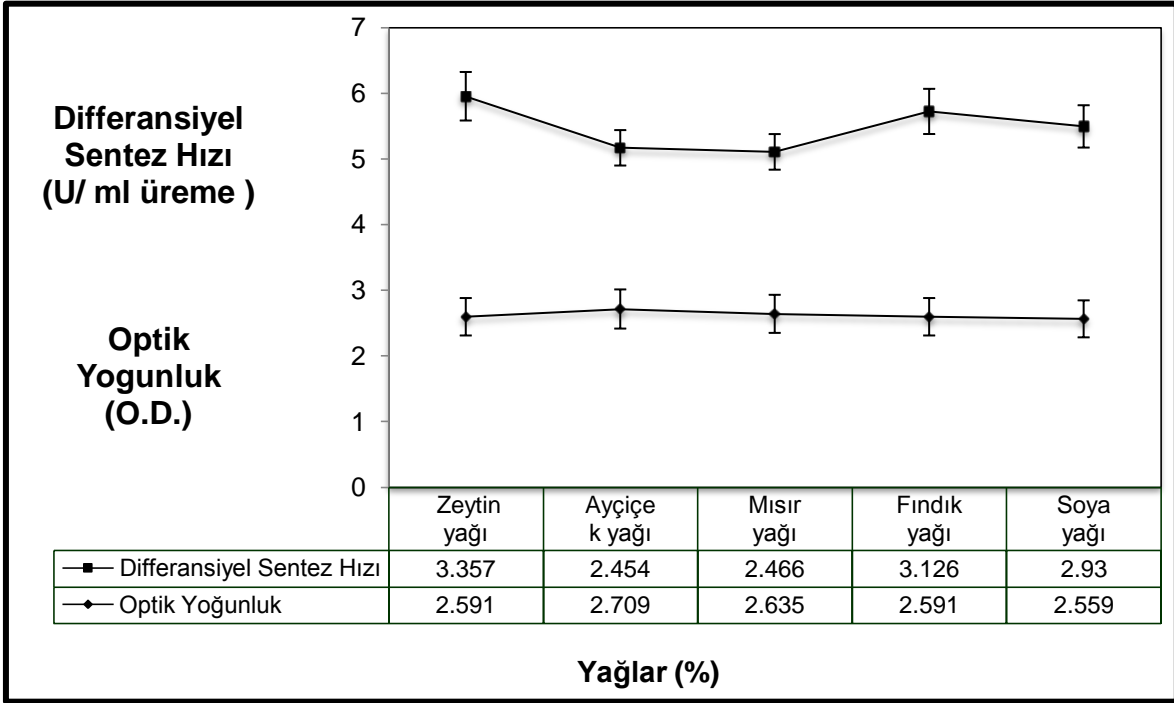
Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde en yüksek lipaz aktivitesi zeytin yağı ve fındık yağında tespit edildi (Şekil 4.13.), En yoğun üreme ayçiçek yağı olarak belirlenirken zeytin yağı ve fındık yağında ise üreme 2.591 olarak tespit edildi ve maksimum differansiyel sentez hızın zeytin yağında saptanarak grafiklendi (Şekil 4.14.).

Küf ve mayalarla yapılan çalışmalarda ise, lipaz aktivitesi için *Ophiostoma piceae* fungusunda karbon kaynağı olarak sebze yağları (zeytin, soya, ayçiçek, susam, pamuk tohumu, mısır ve yerfıstığı yağları) kullanıldığı maksimum lipaz aktivitesi zeytin yağında elde edilmiştir [88]. *Rhizopus oryzae* için ortama çeşitli yağlar eklendiğinde lipaz aktivitesi ve hücre gelişiminin yağ ilave edilmemiş ortamla karşılaştırıldığında üç kata kadar arttığı, hücre gelişimi ve lipaz üretimi için en uygun substratların kolza tohumu ve mısır yağı olduğu bildirilmiştir [89]. *Candida* sp.'nin maksimum lipaz aktivitesi % 2.5 oranında karbon kaynağı olarak susam yağı içeren besiyerinde 38.00

U/ml olarak belirlenmiş, bunu 3500 U/ml aktivite ile zeytin yağı ve mısır yağının takip ettiği tespit edilmiştir [90]. *Penicillium camembertii thom* PG-3 suşu ile yapılan çalışmada ise karbon kaynağı olarak jojoba yağı kullanıldığında 422.0 U/ml ile en yüksek, susam yağı kullanıldığında 61.5 U/ml ile en düşük lipaz aktivitesi belirlenmiştir [91]. Benjamin ve Pandey (1996), tarafından yapılan bir çalışmada *C. rugosa* suşunun en yüksek lipaz ürettiği karbon kaynağının zeytin yağı olduğunu belirlemişler [92]. Cihangir ve Sarıkaya, 2003, *Aspergillus* sp.'den çeşitli karbon kaynaklarının lipaz sentezine etkisini üzerine yaptıkları araştırmada en yüksek aktiviteyi 15.30 U/ml olarak saptamışlardır [93]. Smaniotto ve ark., 2012, yeni izolat olan *Sporidiobolus pararoseus maya türünden* fermantasyon yöntemiyle lipaz üretiminde karbon kaynağı olarak %1 oranında zeytin yağı kullanarak maksimum lipaz aktivitesini 26.9 U/mL olarak tespit etmişlerdir [94].



Şekil 4.13. Farklı Karbon Kaynağı Olarak Yağların Lipaz Aktivitesine Etkisi.



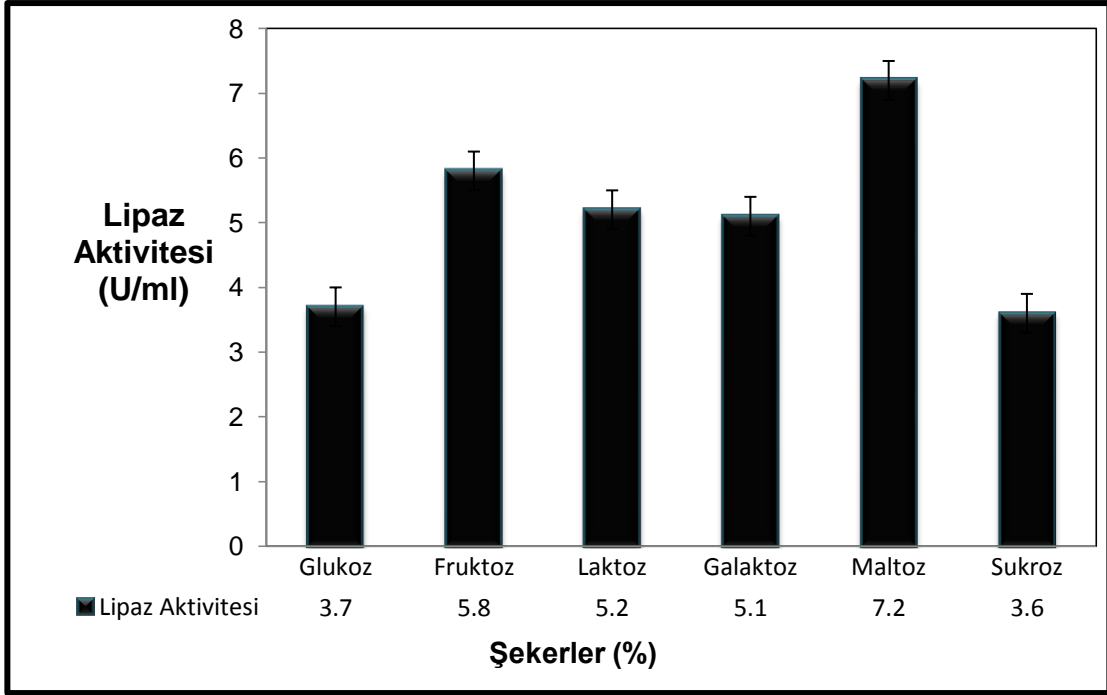
Şekil 4.14. Farklı Karbon Kaynaklarına (Yağlar) Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızını Değişimi.

Daha sonra karbon kaynağı olarak şekerlerin lipaz aktivite etkisini incelemek amacıyla üretim besiyerine karbon kaynağı olarak ayrı ayrı %1 oranında glukoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, maltoz ve sukroz ilave edilerek ekim gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek belirlendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler çizelge ve grafik haline getirildi.

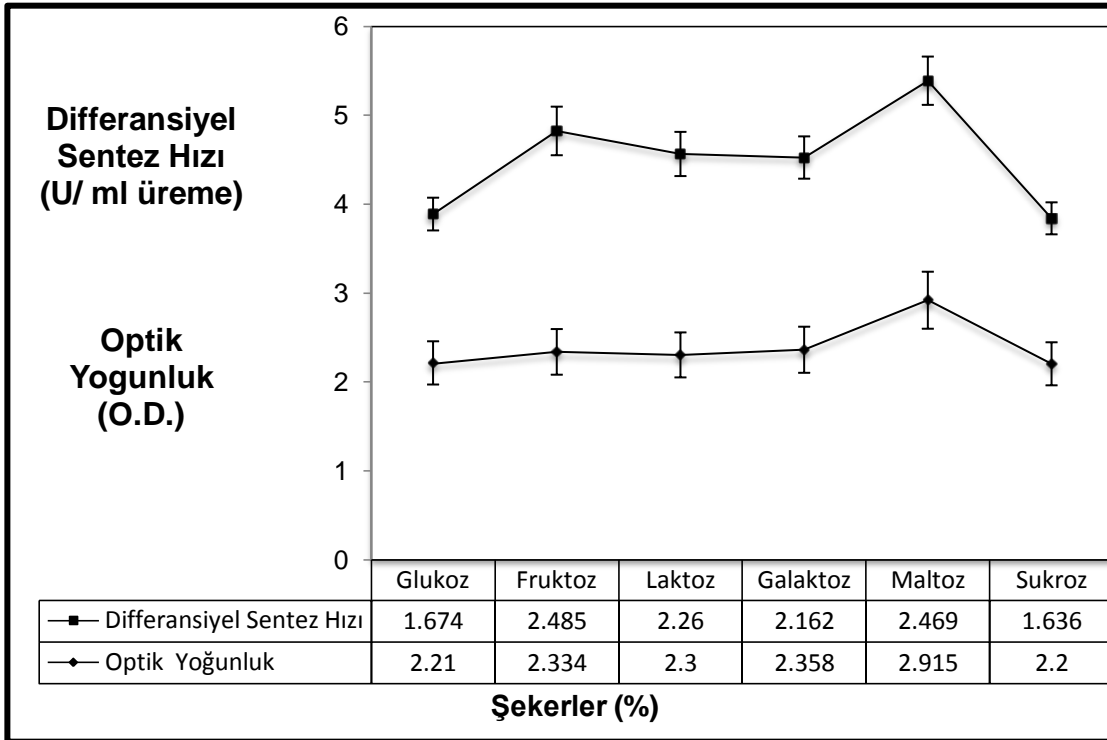
Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde en yüksek lipaz aktivitesi maltoz varlığında saptanırken galaktoz, fruktoz ve laktoz varlığında ise birbirine yakın aktivite tespit edildi (Şekil 4.15.), en yoğun ürettiği şeker karbon kaynağı olarak maltoz belirlenirken galaktoz, fruktoz ve laktoz varlığında ise birbirine yakın Üreme tespit edildi, optimum differansiyel sentez hızı maltoz olarak saptanarak grafiklendi (Şekil 4.16.).

Karbon kaynağı olarak farklı yağlar ve şekerlerin lipaz aktivitesine etkisi incelendiğinde yağ içeren üretim ortamlarında şeker içeren ortamlara göre aktivite çok daha fazla tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra *Rhodotorula mucilaginosa* suşunun en yoğun ürettiği ortam yağ içeren ortam olduğu belirlendi.

Diğer karbon kaynaklarının yanı sıra şekerlerin de lipaz üretimde önemli etkileri vardı [72]. Park SY ve arkadaşları., 2013, maya türü olan *Pichia lynferdii* NRRL Y-7723 ile lipaz aktivitesini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmalarda en uygun karbon kaynağını fruktoz olarak saptamışlardır [95]. Bir diğer benzer çalışma ise mikroorganizma kaynağı olarak *Candida albicans* kullanılmıştır, lipaz üretimi amacıyla besiyerlerine % 3.4 oranında glukoz ilave edildiğinde optimal lipaz aktivitesini belirlemişlerdir [96]. Lima ve arkadaşlarının., (2003), *Penicillium aurantiogriseum* ile lipaz üretimi deneylerinde karbon kaynağı olarak glukoz kullanmışlardır, elde ettikleri sonuçlara göre mikroorganizma glukoz varlığında yeterli aktiviteyi gösterememiş ve lipaz enzim üretmek için başka karbon kaynağı kullanılmalıdır [97].



Şekil 4.15. Farklı Karbon Kaynağı Olarak Şekerlerin Lipaz Aktivitesine Etkisi.



Şekil 4.16. Farklı Karbon Kaynaklarına (Şekerler) Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızını Değişimi.

Farklı karbon kaynağı çalışmalarında son aşama olarak şeker ve zeytin yağını aynı lipaz üretim ortamına ilave ederek lipaz aktivite etkisi ve mikroorganizma üremesi incelenmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek belirlendi. Daha sonra örnekler Whatman no:1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler çizelge ve grafik haline getirildi.

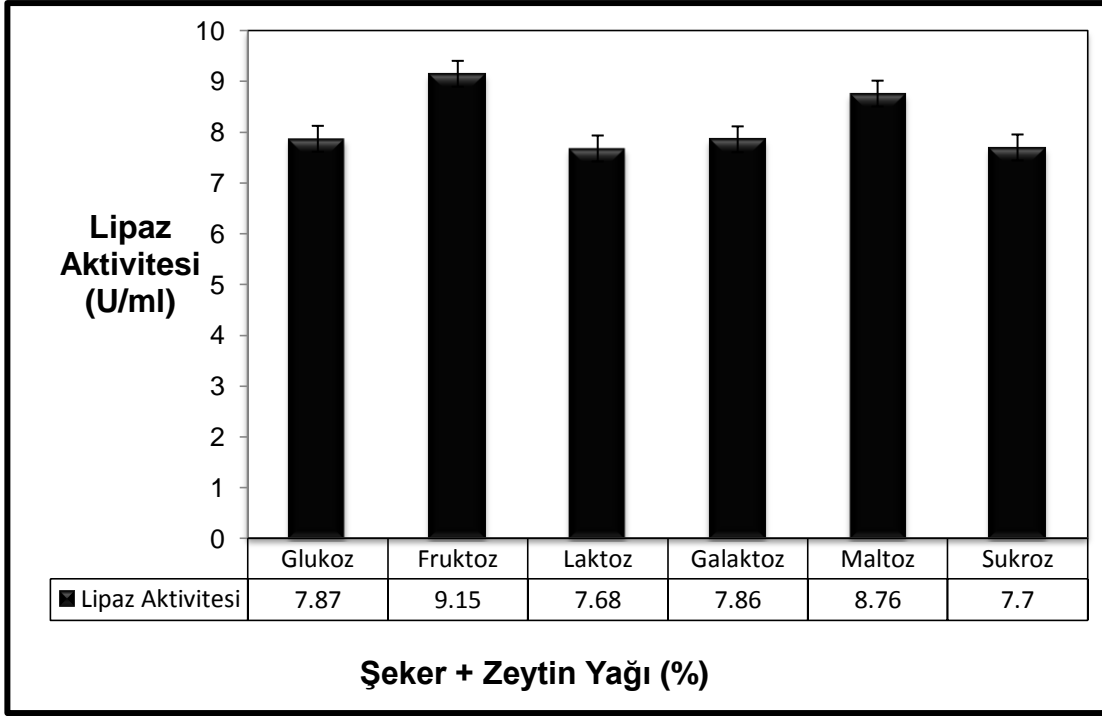
Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde şeker kaynağı olarak fruktoz ve ona ilave %1 oranında zeytin yağı üretim ortamında en yüksek lipaz aktivitesi belirlenirken diğer şeker kaynaklarının oranları incelendiğinde ise ilave edilen zeytin yağının lipaz aktivitesini arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.17.), en yoğun ürettiği karbon kaynağı fruktoz ile zeytin yağı karışım üretim ortamında tespit edildi, optimum differansiyel sentez hızı galaktoz olarak saptandı ve grafiklendi (Şekil 4.18.).

Şekil 4.17. da da görüldüğü üzere üretim ortamlarına karbon kaynağı olarak trigliseridler (yağlar) ilave edildiğinde enzim sentezi artmaktadır. Bu lipaz enziminin indüklenebilir enzim olmasından kaynaklanmaktadır. Karbon kaynağı olarak yağların arasında zeytin yağı en iyi kaynak olarak saptandı. Lipaz üretim ortamlarında karbon kaynağı olarak farklı şekerlerin yanı sıra %1 oranında zeytin yağının ilave edilmesi ile birlikte mikroorganizmanın üremesinde de yükselme görüldü.

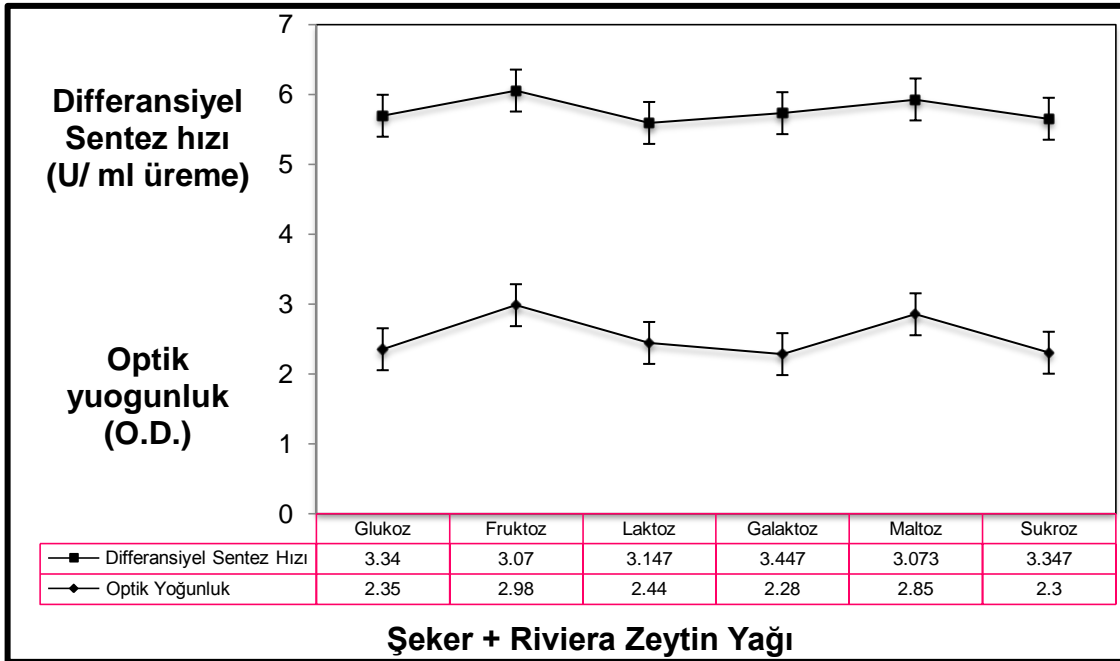
Farklı araştırmacılar, farklı karbon kaynaklarını üretim ortamına ilave ederek lipaz üretimini artırmaya yönelik çalışmalar yapmışlardır. Teng ve Xu, (2008), yeni izole ettikleri *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 suşunun lipaz üretim ortamına karbon kaynağı olarak zeytin yağının yanı sıra maltoz da ilave ederek en yüksek lipaz aktivitesini 13.875 U/ml olarak tespit etmişlerdir [84].

Bir diğer çalışmada, *Yarrowia lipolytica* 681 suşunda glukoz, mısır ve zeytin yağının lipaz üretimini ve biyokütleyi artırdığını bildirmişlerdir [79]. *Yarrowia lipolytica*'nın bir

başka tr ile yapılan bir diğer araştırmada, 8 farklı karbon kaynağı içerisinden glukoz ve gliserol içeren ortamlarda lipaz rtimi açısından en uygun ortamlar oldukları belirlenmiştir [98]. Kaushik ve arkadaşları, (2006), tarafından yapılan *Aspergillus carneus'dan* lipaz retimi çalışmaları sonucunda, en yksek lipaz aktivitesi ayçiçek yağı ve glukoz içeren ortamlarda 12.7 U/ml olarak tespit edilmiştir [85].



Şekil 4.17. Farklı Şeker Kaynaklarına İlave Olarak %1 Oranında Zeytin Yağının Lipaz Aktivitesine Etkisi.



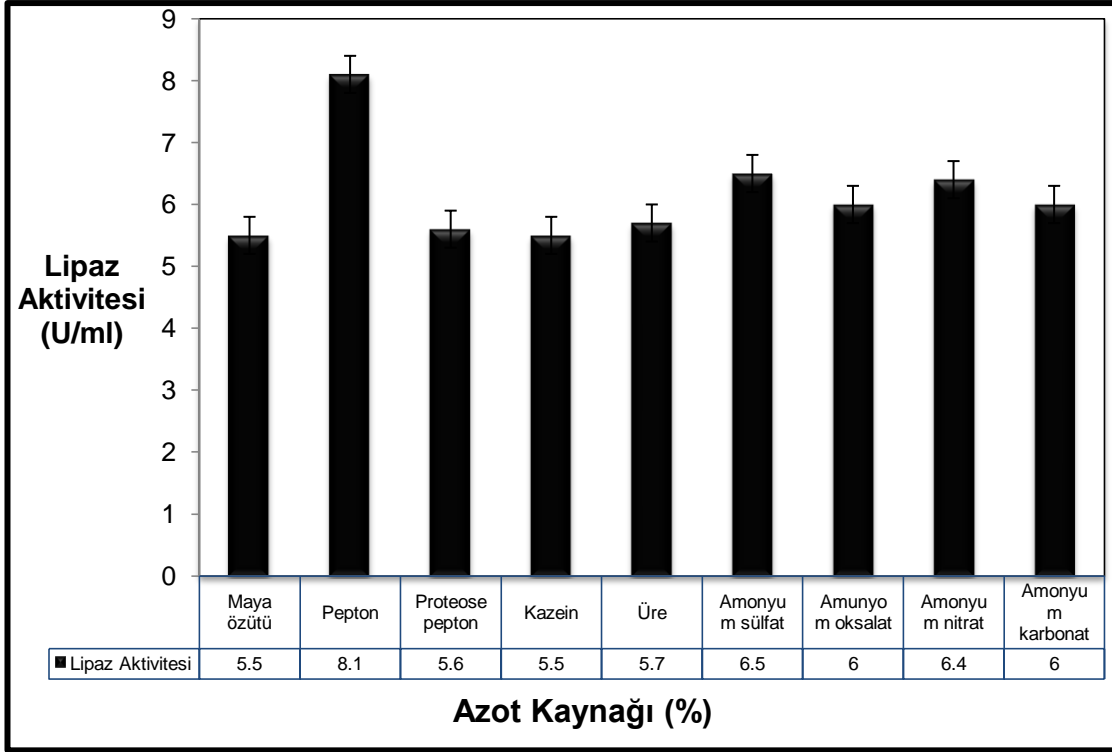
Şekil 4.18. Farklı Karbon Kaynaklarına (Şekerler + Zeytin Yağı) Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı ve Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.

4.6.2. Üreme Ortamina İlave edilen Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine etkisi

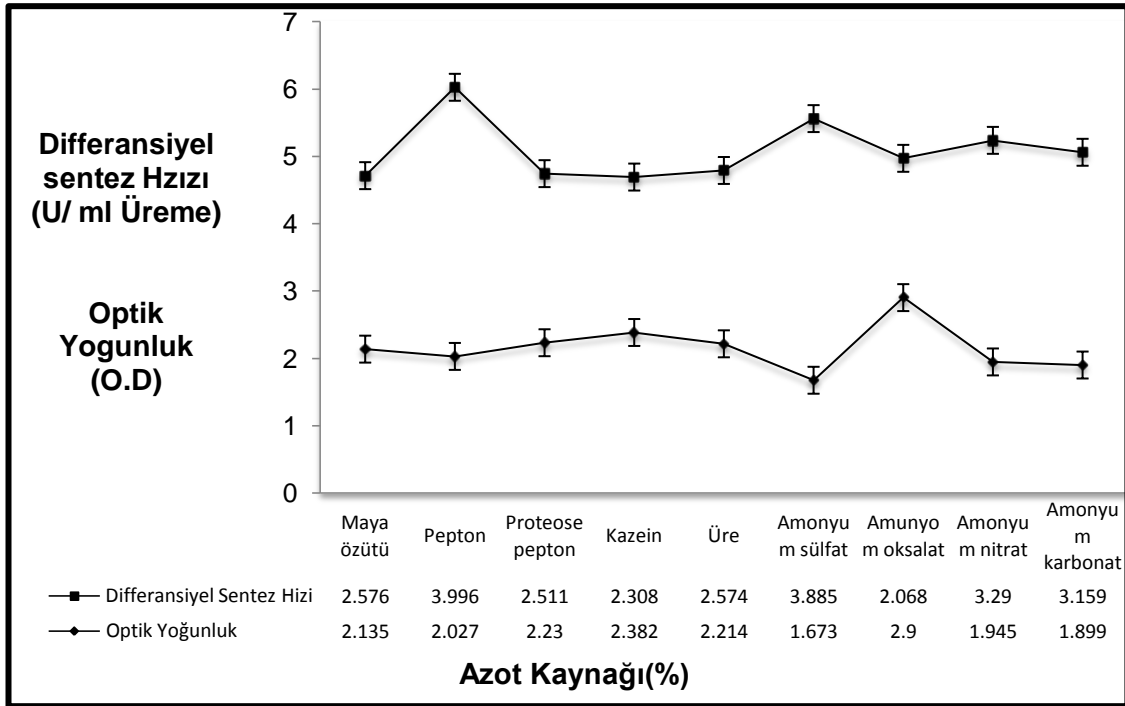
Farklı azot kaynaklarının lipaz aktivitesine ve mikrobiyal üremeye etkisini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada lipaz üretim ortamlarına ayrı ayrı %1 oranında pepton, amonyum sülfat, üre, maya özütü, kazein, amonyum oksalat, amonyum karbonat ve proteose pepton ilave edildi ve ekim gerçekleştirilerek üretim için 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek belirlendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler izelge ve grafik haline getirildi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde en yüksek lipaz aktivitesi pepton içeren üretim ortamında ve en düşük aktivite ise maya özütü olarak belirlenirken diğer azot kaynakları içeren ortamlarda ise lipaz aktivite değerlerinin birbirine yakın olduğu görüldü (şekil 4.19.), en yoğun ürediği azot kaynağı amonyum oksalat içeren ortamında ve en düşük üreme ise amonyum karbonat ortamında belirlendi diğer azot kaynakları içeren ortamlarda ise maya suşunun üreme değerlerinin birbirine yakın olduğu tespit edilirken, optimum differansiyel sentez hızının amonyum sülfat ve pepton içeren ortamlarda olduğu saptanarak grafiklendi (şekil 4.20.).

Üretim ortamında bulunan azot kaynağı da lipaz üretimini etkilemektedir [72]. Mikroorganizmalar arasında lipaz üretimi için bazıları azot kaynağı olarak organik formları tercih ederken, bazıları inorganik formları tercih ettikleri bildirilmiştir [99].



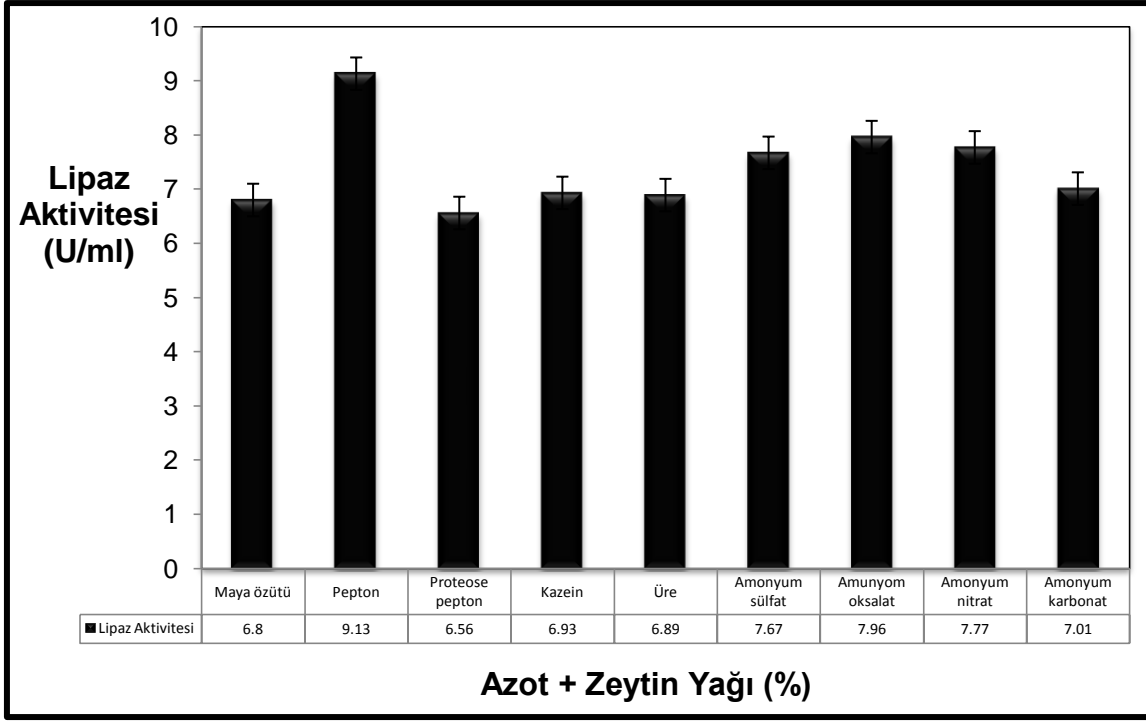
Şekil 4.19. Farklı Azot Kaynaklarının Lipaz Aktivitesine Etkisi



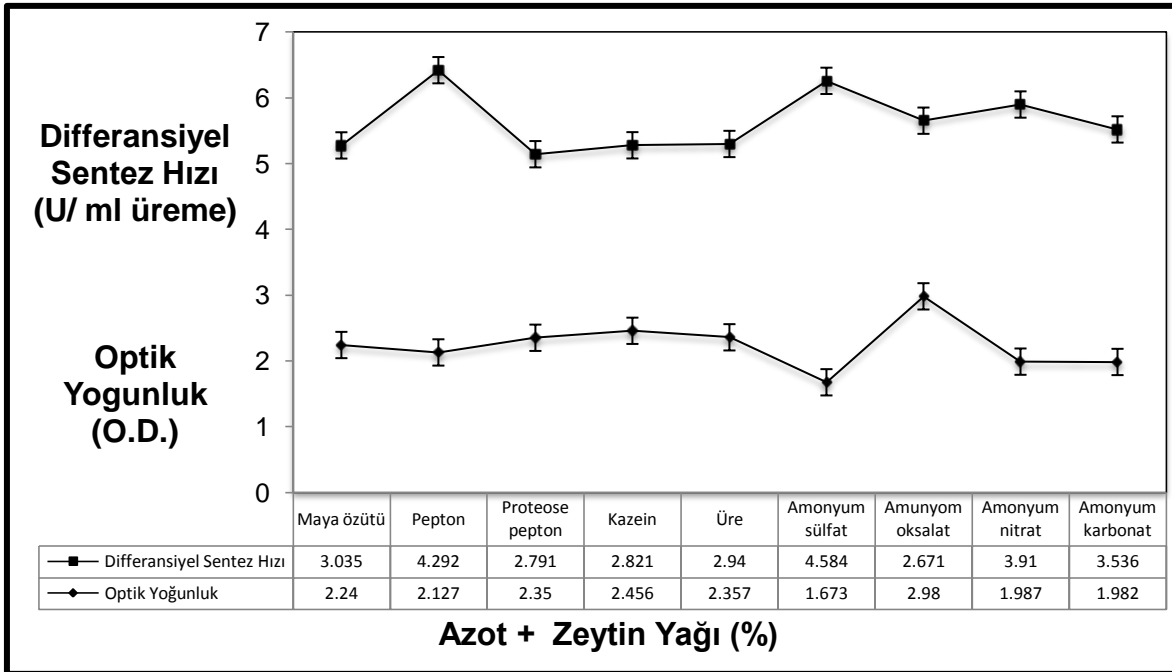
Şekil 4.20. Farklı Azot Kaynaklarına Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.

Genellikle pepton, yeast ekstrakt, tripton gibi organik azot kaynakları lipaz üretimi için tercih edilmektedir [100, 101, 102]. Bazı mikroorganizmalarda, NH_4Cl ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ gibi inorganik azot kaynaklarının lipaz aktivitesinde etkili olduğu rapor edilmiştir [103, 104, 105]. Dongming Lan ve arkadaşları, 2011, *Candida albicans* suşunda en iyi lipaz aktivitesini %1.32 oranında maya özütü içeren ortamda belirlemişlerdir [106]. *Rhodotorula glutinis* ile yapılan bir başka çalışmada, lipaz üretimi için amonyum fosfat içeren ortamlarda en yüksek lipaz aktivitesi tespit edilmiştir [107]. Salleh ve arkadaşları, (1993), *R. oryzae* ile hücre dışı lipaz enzimi üretiminde karbon kaynağı olarak pepton içeren ortamlarda maksimum aktivite saptamışlardır [108]. Bir diğer benzer araştırmada, *R. arrhizus* suşunda lipaz üretiminde karbon kaynağı pepton ve maya özütü içeren ortamlarda en yüksek aktivite tespit edilmiştir [109].

Farklı azot kaynakları çalışmalarında son aşama olarak azot kaynaklarını içeren üretim ortamlarına %1 oranında zeytin yağını ilave ederek lipaz aktivite etkisi ve mikroorganizma üremesi incelendi. İnkübasyon sonrasında her bir kültürün üreme O.D.'leri ölçülerek belirlendi. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler çizelge ve grafik haline getirildi.



Şekil 4.21. Farklı Azot Kaynaklarına İlave Olarak %1 Oranında Zeytin Yağını Lipaz Aktivitesine Etkisi.



Şekil 4.22. Farklı azot Kaynaklarına (Azot + Zeytin Yağı) Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde en yüksek lipaz aktivitesi pepton içeren üretim ortamında ve en düşük aktivite ise proteose pepton olarak elde edildi. Diğer azot kaynakları içeren ortamlarda ise lipaz aktivite değerlerinin birbirine yakın olduğu tespit edildi (Şekil 4.21.), en yoğun üreme amonyum oksalat içeren ortamda ve en düşük üreme ise amonyum karbonat olarak belirlenirken, optimum differansiyel sentez hızı pepton içeren ortamlarda saptanarak grafiklendi (Şekil 4.22.).

Farklı araştırmacılar, farklı azot kaynaklarının yanı sıra üretim ortamına farklı karbon kaynakları (yağlar) ilave ederek lipaz üretimini artırmaya yönelik çalışmalar yapmışlardır. Teng ve Xu, (2008), yeni izole ettikleri *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021suşunun lipaz üretim ortamına karbon kaynağı olarak zeytin yağının yanı sıra pepton da ilave ederek en yüksek lipaz aktivitesini 13.875 U/ml olarak tespit etmişlerdir [84]. Kaushik ve arkadaşları, (2006), tarafından *Aspergillus carneus*'dan lipaz üretimi çalışmaları sonucunda, en yüksek lipaz aktivitesine ayçiçek yağı ve pepton olan ortamlarda 12.7 U/ml olarak tespit etmişlerdir [85]. *Candida* sp. 99-125 suşları ile yapılan lipaz üretimi çalışmalarında, karbon kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KHPO_4 , KHPO_4 ve MgSO_4 kullanılmıştır ve en yüksek aktivite soya yağı ve KHPO_4 içeren ortamda tespit edilmiştir [83].

Genel olarak, magnezyum tuzu adenozin trifosfat metabolizması ve nükleik asit sentezinde bazı fonksiyonlarında düzenleyici etkisi olduğundan dolayı çoğu mikroorganizmalar bu inorganik maddeye ihtiyaç duyarlar [110]. Maya suşlarının mikrobiyal büyümeleri için potasyum gereklidir, bunun yanı sıra söz konusu madde kendisi ozmotik düzenlemenin gerçekleşmesi için temel koşullardan biridir. Ayrıca demir sitokrom sentezinde kullanılan temel bileşiklerdendir [111]. *Acinetobacter* sp. suşunda lipaz enziminin aktivitesini arttırmak için en üretim ortamına kalsiyumun ilave edilmesini belirtmişlerdir [112].

3.8. Reaksiyon Ortamında Uygun Fizyolojik Koşulların Saptanması

Reaksiyon ortamında enzim aktivitesini etkileyen fizyolojik faktörlerin inkübasyon süresi, sıcaklığı ve substrat konsantrasyonu yapılan deneyler sonucunda ölçülerek belirlendi. Bunun için 30 °C'de 150 r.p.m döngüsel çalkalama hızında 6 gün inkübasyona bırakıldı. Daha sonra örnekler Whatman no: 1 kağıdından süzülerek lipaz aktivitesi titrasyon yöntemi ile saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi.

3.8.1. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla tüm koşullar sabit tutularak 30 - 90 °C aralığında değişen farklı sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra ortamlarda aktivite tespit edilerek grafikle edildi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi incelendiğinde optimum aktivite 60 °C'de saptandı, 70 – 90 °C aralığında ise enzim aktivitesinde az miktarda düşüş görüldüğü saptanarak sonuçlar grafikle edildi (Şekil 4.23.).

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi enzim katalizli reaksiyonlar da sıcaklığa bağlıdır ve reaksiyon hızı sıcaklıkla artar. Sıcaklığın her 10 °C artışı enzim reaksiyonunun hızını 1.2 – 4.0 kat artırmaktadır. Fakat bu artış sürekli olmayıp 40 °C'nin üzerinde inkübasyon süresine bağlı olarak önce bir duraklama daha sonra da gerileme şeklinde kendini göstermektedir. Belirli çalışma koşullarında değişik sıcaklıklarda enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık optimum sıcaklık olarak

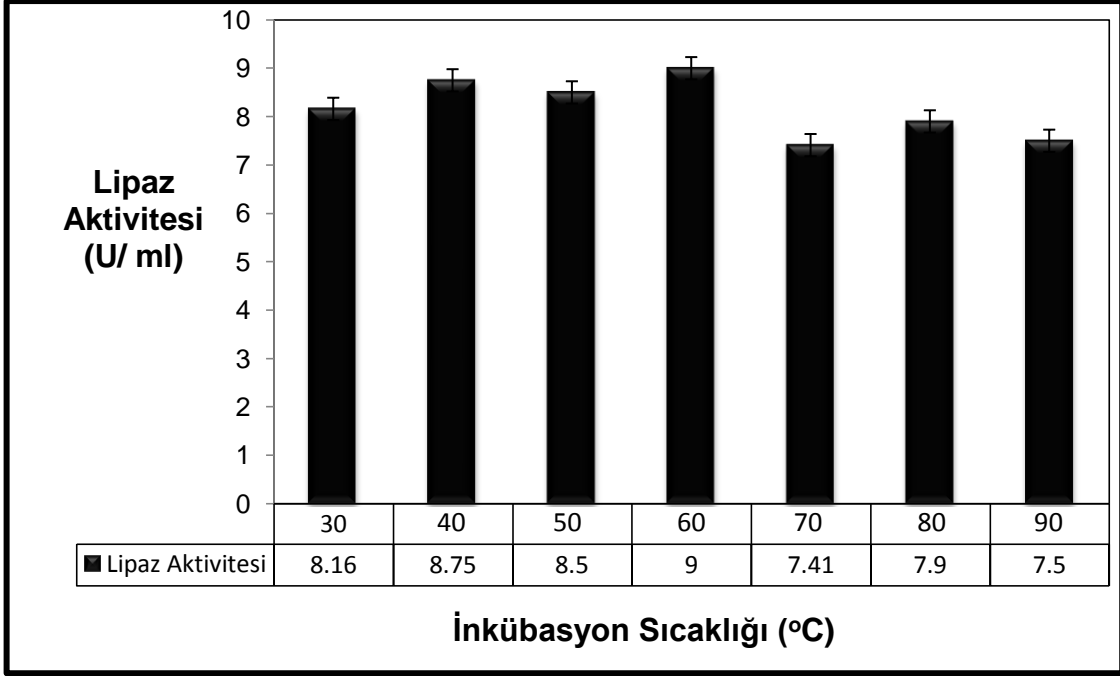
tanımlanmaktadır. Mikrobiyal enzimler, mikroorganizmanın büyüme ortamına bağlı olarak ortam sıcaklığına adapte olmakta ve hatta optimum sıcaklık 100 °C civarında olabilmektedir [113]. Her ne kadar enzimler 100 °C sıcaklıkta işlev gösterse de bunların yarılanma ömrünün kısa olduğu bildirilmiştir [114]. *Aspergillus niger* NCIM 1207 ile yapılan çalışmada lipazın optimum sıcaklığını 50 °C ve enzim kararlılığını 60 °C'de 5 saat koruduğunu saptamışlardır [115].

Ticari öneme sahip olan lipazlarda istenilen özellikler arasında, alkali ortama toleranslı ve termostabil olmaları esastır [116]. Endüstriyel alanda lipazların, 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda fonksiyonel olarak kullanıldıkları bildirilmiştir. Bu nedenle 50 °C civarında optimum sıcaklığa ihtiyaç duyulmaktadır [117].

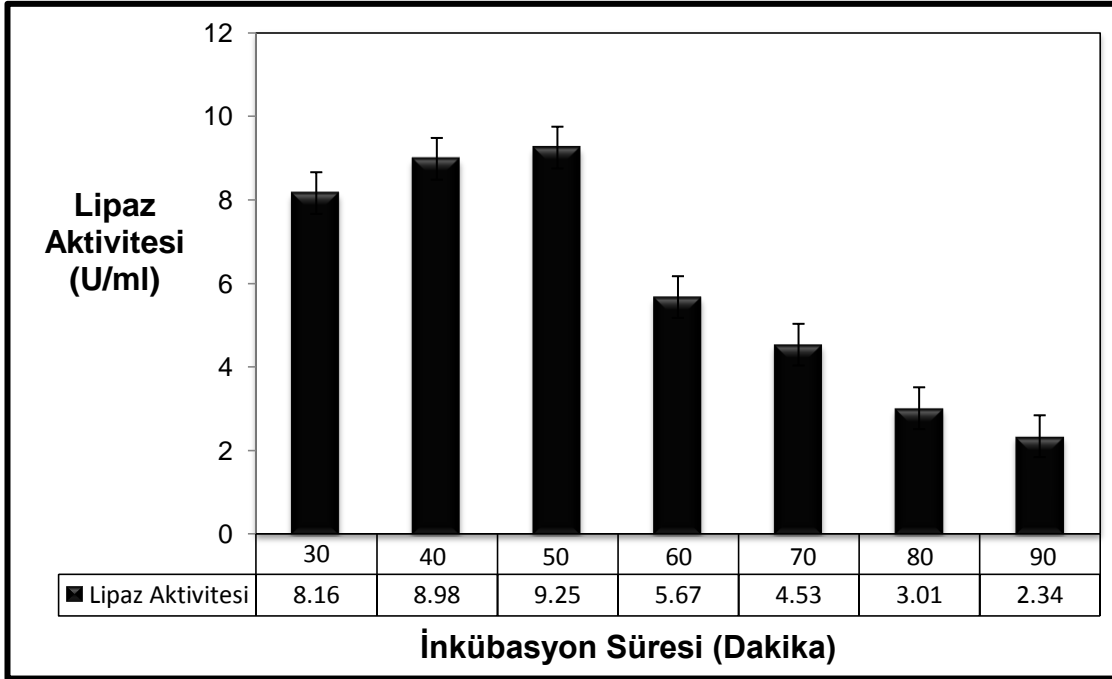
3.8.2. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Süresinin Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

Enzim substrat karışım olan reaksiyon ortamındaki inkübasyon süresinin lipaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla, 10 dakika aralıklarla 30 °C'de inkübe edildikten sonra ortamlardaki aktivite saptanarak grafiklendi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi incelendiğinde optimum aktivite 30. – 50. dakikalar aralığında saptandı. 60. – 90. dakikalar aralığında ise aktivitenin düştüğü tespit edildi. Lipaz aktivitesinin en yüksek olduğu inkübasyon süresinin ise 50. dakika olduğu saptanarak sonuçlar grafiklendi (Şekil 4.24.).



Şekil 4.23. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Sıcaklığının Lipaz Aktivitesine Etkisi.



Şekil 4.24. Reaksiyon Ortamı İnkübasyon Süresinin Lipaz Aktivitesine Etkisi.

3.8.3. Reaksiyon Ortamı Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisinin Saptanması

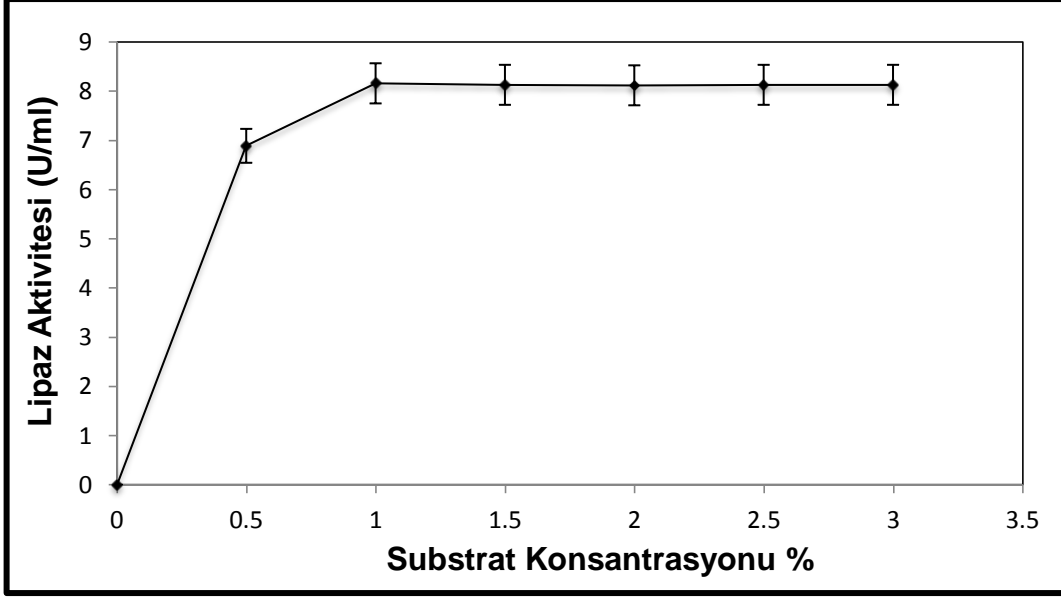
Enzim substrat karışım olan reaksiyon ortamındaki substrat konsantrasyonunun lipaz aktivitesine etkisini incelemek amacıyla, substrat olarak kullanılan zeytin yağı'nın % 0 - 3.0 arasında değişen oranları enzim kaynağı ile 30 °C'de inkübe edildikten sonra ortamlardaki aktivite saptanarak grafiklendi.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak substrat konsantrasyonu % 1 oranında zeytin yağı olarak saptandı ve elde edilen veriler grafik haline getirildi (Şekil 4.25.).

3.9. Belirlenen Optimum Koşullarda Lipaz Üretimi ve Aktivitesinin Saptanması

Rhodotorula mucilaginosa'dan lipaz üretimi için en iyi koşullar belirlendikten sonra, bu koşullarda (pH=5.0, Sıcaklık=30 °C, karbon kaynağı: %1 zeytinyağı yağı, azot kaynağı: %1 pepton) 250 ml'lik erlenmeyerlere 100 ml üretim ortamı hazırlanarak dağıtıldı ve 200 r.p.m'de üretim gerçekleştirildi. Daha sonra üretim ortamından alınan örneklerin spektrofotometrik ve titrimetrik yöntemle lipaz aktiviteleri saptandı.

Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşu belirlenen optimum koşullarda en uygun üreme göstererek maksimum lipaz aktivitesini 11.65 U/ml olarak saptandı (Çizelge 4.1.).



Şekil 4.25. Reaksiyon Ortamı Substrat Konsantrasyonunun Lipaz Aktivitesine Etkisi.

Çizelge 4.1. Belirlenen Optimum Koşullarda Ayarlanmış Üretim Ortamlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Lipaz Aktivitesi, Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.

Optimum koşullarda lipaz üretimi ve aktivite tayini	Lipaz Aktivitesi (U/ml)	Üreme (O.D.)	Differansiyel Sentez Hızı (U/ml)
pH= 5.0 Sıcaklık=30 °C Karbon kaynağı:%1 zeytinyağı yağı azot kaynağı: %1 pepton Döngüsel çalkalama hızı 200 r.p.m	11.65	2.95	3.94

4.10. Atık ve Artık Değerlendirme alışmaları

4.10.1. Melasın *Rhodotorula mucilaginosa* Suşunun Üreme ve Lipaz Sentezine Etkisi

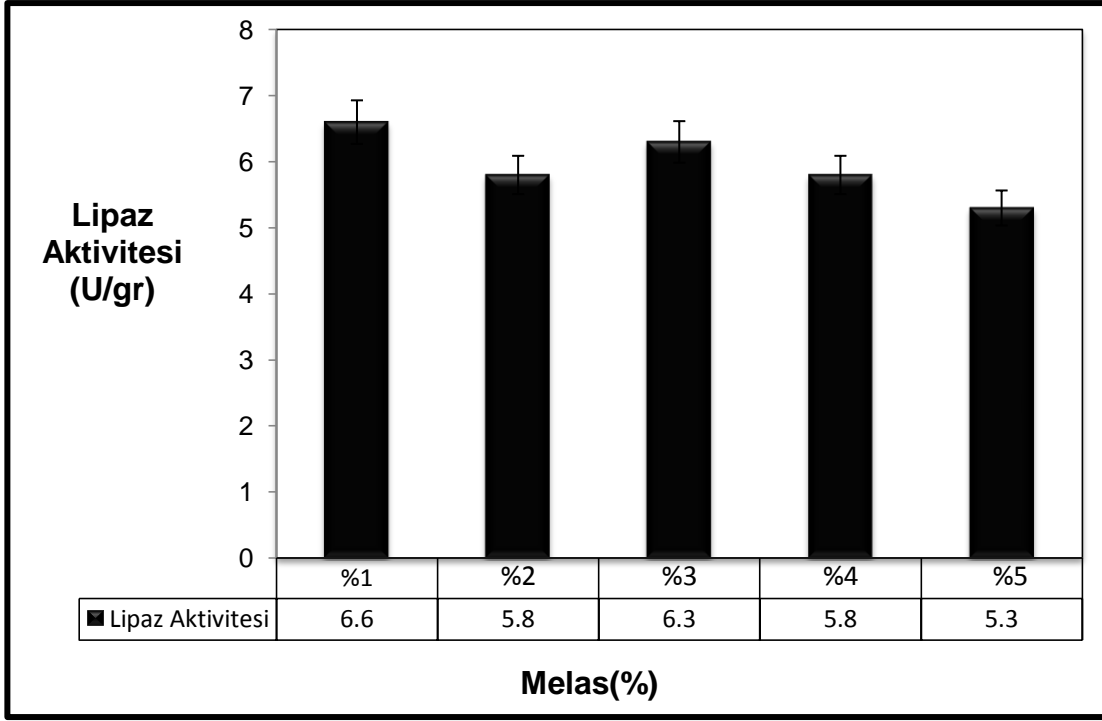
Bu çalışmada şeker endüstrisi atığı olan melasın, besi ortamlarında karbon kaynağı olarak kullanılabilirliği ve bu atığın zeytin yağlı ve zeytin yağsız ortamlarda lipaz verimi araştırıldı.

Bu deneyde hiç bir katkı maddesi eklenmeden sadece değişik oranlarda sulandırılarak melas içerecek şekilde hazırlanan melaslı besiyerleri kullanıldı.

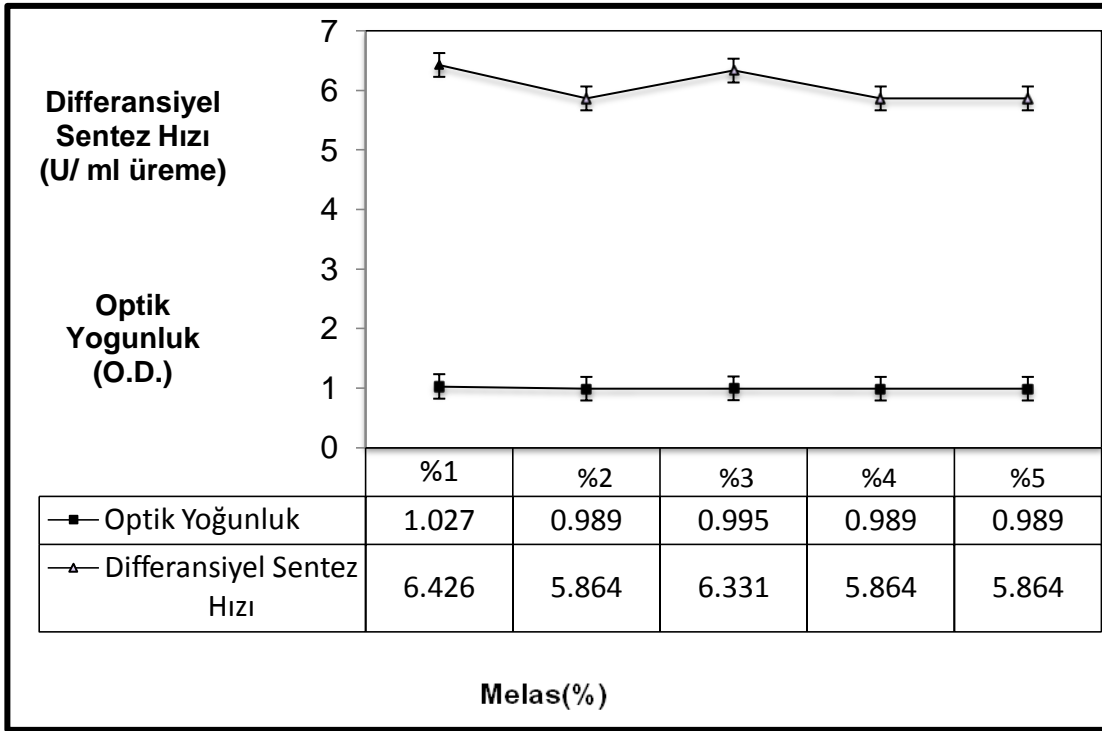
Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde maksimum lipaz aktivitesi % 1 oranında melas içeren üretim ortamında saptanırken diğer oranlarda ise az düşüş görüldü (Şekil 4.26.) En yoğun üreme %1 oranında melas içeren ortamında, optimum differansiyel sentez hızı %1 oranında melas içeren ortamlarda saptanarak grafiklendi (Şekil 4.27.).

Bir diğer çalışmada melaslı besiyerine %1 oranında zeytin yağı ilave edildi ve lipaz verimi araştırıldı.

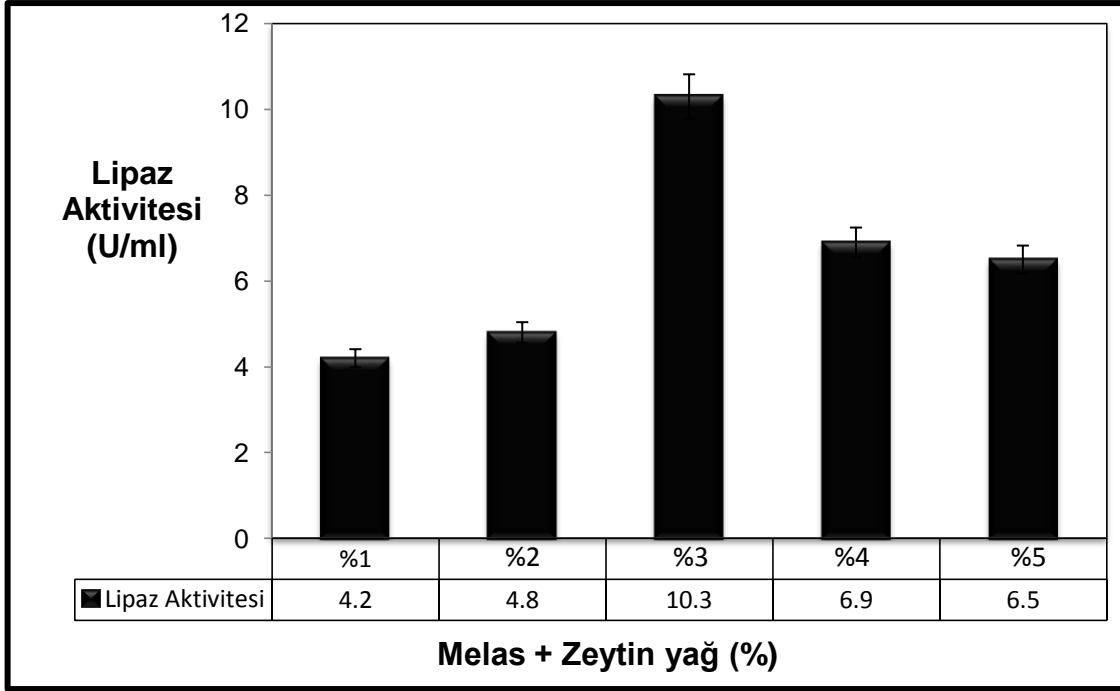
Yapılan üç çalışmanın ortalaması alınarak *Rhodotorula mucilaginosa* suşunda 6. günde maksimum lipaz aktivitesi %3 oranında melas içeren üretim ortamında saptanırken diğer oranlarda ise düşüş görüldü (Şekil 4.28.). En yoğun üreme %5 oranında melas içeren ortamında, optimum differansiyel sentez hızı %3 oranında melas içeren ortamlarda saptanarak grafiklendi (Şekil 4.29.).



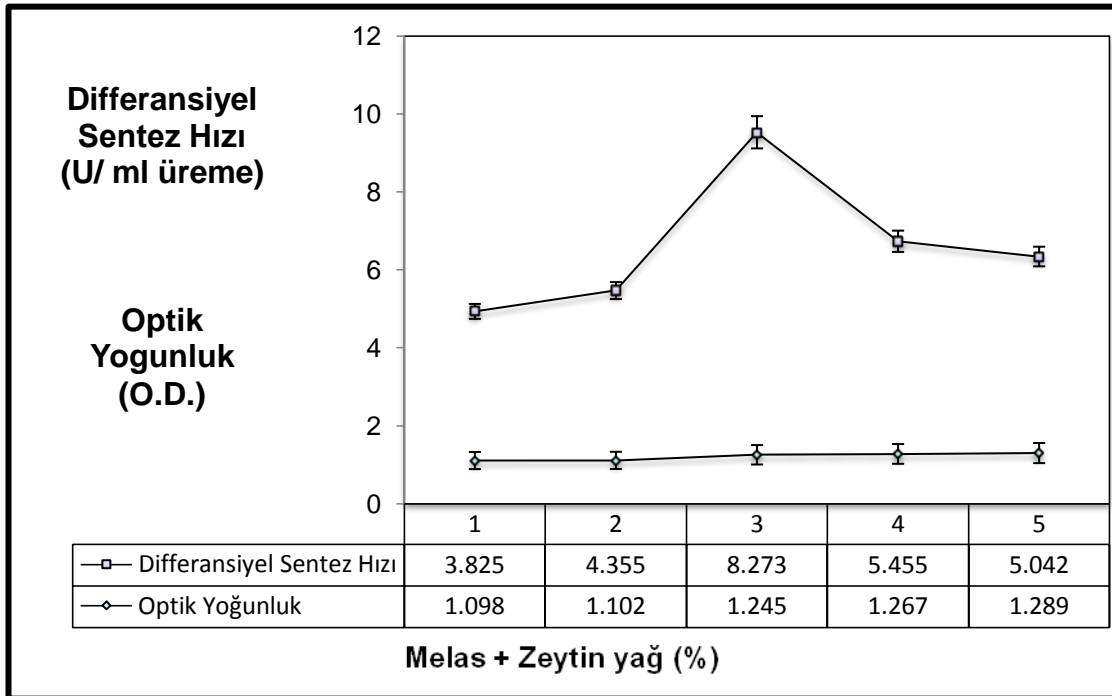
Şekil 4.26. Değişik Melas Konsantrasyonlarında *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Lipaz Verimi.



Şekil 4.27. Değişik Melas Konsantrasyonlarında *Rhodotorula mucilaginosa* Suşunun Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi.



Şekil 4.28. Değişik Melas Konsantrasyonlarında ve %1 Oranında Zeytin Yağı İçeren Ortamlarda *Rhodotorula mucilaginosa*'nın Lipaz Verimi.



Şekil 4.29. Değişik Melas Konsantrasyonlarında ve %1 Oranında Zeytin Yağı İçeren Ortamlarda *Rhodotorula mucilaginosa* Suşunun Üreme Miktarı Differansiyel Sentez Hızının Değişimi

Potumarthi ve ark., 2008, yeni izole ettikleri *Rhodotorula mucilaginosa* ile melas atığını kullanarak lipaz üretmişlerdir ve maksimum lipaz aktivitesini %1 oranında melas içeren ortamlarda elde etmişlerdir [118]. Gutarra ve ark., 2005, *Penicillium simplicissimum* ile yaptıkları lipaz deneyleri sonucunda bu mikroorganizmanın melas içeren ortamlarda diğer ortamlara göre daha yüksek aktivite gösterdiği belirtmişlerdir [119]. *Williopsis saturnus* suşu ile gerçekleştirilen lipaz çalışmasında melaslı besiyerlerine 1%, 2% ve 3% fosil yağı ilave edildiğinde lipaz aktivitesinin 118'den 354 mg/L ye saptanmıştır [120]. Besi ortamında melas konsantrasyonunun artışına bağlı olarak viskozite artmaktadır ve bu lipaz aktivitesinde düşüşe neden olduğu belirtilmektedir [118].

Özetle:

Gerçekleştirilmiş olduğumuz deneyler sonucunda:

- ✓ *Rhodotorula mucilaginosa* suşu ile lipaz üretiminde, maksimum lipaz üretimi 30 °C sıcaklıkta, pH 5'de, 6 gün inkübasyon süresi sonunda karbon kaynağı olarak zeytin yağı ve azot kaynağı olarak pepton içeren mineral besiyerinde 200 r.p.m döngüsel çalkalama hızında gerçekleştirildi.
- ✓ Reaksiyon ortamı koşulları incelendiğinde lipaz aktivitesinin en yüksek olduğu inkübasyon süresi 50 dakika, inkübasyon sıcaklığı 60° C ve substrat konsantrasyonu ise % 1 oranında zeytin yağı olarak saptandı.
- ✓ Atık ve Artık Değerlendirme Çalışmalarında şeker fabrikası attığı olan melas, karbon kaynağı olarak kullanıldı. Paralel olarak gerçekleştirilen çalışmada 1.grupta sadece melaslı besiyortamı, 2.grupta ise melaslı besiyortamına ilaveten zeytin yağı kullanıldı. Sonuç olarak %1 oranında melas ve zeytin yağı içeren ortamlarda lipaz aktivitesi 10.3 U/ml olarak saptandı.

Öneriler:

- Çalışmada *Rhodotorula mucilaginosa* suşu Eskişehir ili Hasanbey Köyünden izole edilerek lipaz üretiminde kullanıldı.
- Enzim üretiminin en önemli basamaklarından biri üretim ortamı ya da fermentasyon ortamının belirlenmesi ve optimizasyonudur. Çalışmada lipaz üretim ortamı olarak Hatzinikolau ve arkadaşları, 1996 tarafından önerilen besiyeri kullanıldı. Söz konusu besiyeri dışında lipaz aktivitesinin kalitatif olarak belirlenmesinde % 0.001 oranında rodamin içeren Rhodamine B Agar kullanılabilir. Belirlenen üretim ortamının optimizasyonunu için ortamın fiziksel ve kimyasal bileşenler koşulları değişik parametrelerde araştırıldı. İncelenen parametrelerin yanı sıra farklı parametrelerde araştırmaya dahil edilebilir.
- Lipaz aktivitesi ölçümünde farklı birçok yöntem bulunmasına rağmen çalışmada titrimetrik yöntem kullanıldı. Ayrıca spektrofotometrik yöntem de çok hassas olduğundan dolayı aktivite ölçümünün gerçekleşmesi için önerilebilir.
- Reaksiyon ortamındaki fizyolojik koşullar enzim aktivitesini etkilediğinden dolayı bu ortamın optimize edilmesi önem taşımaktadır. Çalışmada reaksiyon ortamı inkübasyon süresi, sıcaklığı ve substrat konsantrasyonu araştırıldı. Bu koşulların yanı sıra reaksiyon ortamı inkübasyon pH ve diğer koşullarında etkisi incelenebilmesi önerilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Telefoncu, A., *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çesme, İzmir-Türkiye, 326p. **1986**.
- [2] Jaeger, K-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 29- 63. **1994**.
- [3] Jaeger, K-E., Dijkstra, B. W. and Reetz, M.T., Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315- 351. **1999**.
- [4] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, U. T., The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29: 119-131. **1999**.
- [5] Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 763-781. **2004**.
- [6] Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). *KSÜ Fenve Mühendislik Dergisi* 5(1), **2002**.
- [7] Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter. W. H. FREEMAN, Fourth Edition, 2004*.
- [8] Casid, EL, *İndüstriyal Mikrobiyoloji*, John Wiley and Sons Ins, NewYork, P 460, **1968**.
- [9] Wiseman, A., *Handbook of Enzymes Biotechnolog Second Edition*. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274- 373. **1987**.
- [10] Demain, A.L., and Solomon, N.A., In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. *Scientific American*, Freeman & Comp., San Francisco. **1981**.
- [11] Pekin, B. Enzimler (Alınmıştır, Endüstriyel Mikrobiyoloji Düzenliyen, Cetin ET.) J.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı – PAY- DA Yayın No: 2 Fatih Gençlik Vakfı Matbası, İstanbul, s 145-160 **1983**.
- [12] Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Industrial Application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 711-729. **1999**.

- [13] Zeikus, J.G., *Enzyme Microb. Technol.* 1,243. **1979.**
- [14] Kindle, K.L., Characterization and Production of thermostable α - Amylase. *Appl. Biochem Biotechnol.* 8,153. **1983.**
- [15] John, W., and Sons, I., *Industrial Enzymes and Their Applications.* United States of Amerika. 454p. **1998.**
- [16] Madsen, G.B., Norman, B.E., and Slott, S., A New Heat-Stable Bacterial Amylase and its Use In High - Temperature Liquefaction .*Starke* 25, 304.**1973.**
- [17] Klibanov, M.A. *Enzymes: Nature's Chemical Mechanism, Technol rev.,* 86, (6). 40-50. **1983.**
- [18] Sheppard, G. The Production and Uses of Microbial Enzymes in food Processing (In, *Progress in Industrial Microbiology* Ed, by Adams, M.R.) Vol 23. Elsevier Sci. Pub. Com. Inc Amsterdam p, 237 – 283.**1986.**
- [19] Zeman, N.W. and Mccrea, J.M., Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World.* 30(1) : 777-780. **1985.**
- [20] Açikel, Y.Ş., Çelebi, B., *R. delemar* ile Lipaz Üretimi. TÜBİTAK Projesi MİSAG-282. **2006.**
- [21] Gessesse, A., Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Enviromental Microbiology.* p. 3533-3535. **1998.**
- [22] Chen, L., Danial, R.M., Coolbear, T., Detection and Impact of Protease Lipase Activities in Milk Powders. *International Dairy Jurnal,* 13(4), 255–275. **2003.**
- [23] Dutta, S., Ray, L., Production and Characterization of An Alkaline Thermostable Curde Lipase from an İsolated Strain of *Bacillus cereus* C7. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 159, 142 – 154. **2009.**
- [24] Balcao, V.M., Paiva, A.L., Malcata, F.X., Bioreactors with Immobilized Lipases: State of the art. *Enzymes and Microbial Techology,* 18, 392 – 416. **1996.**
- [25] Messaoudi, A., Belguith, H., Gram, I., Hamid J.B, Classification of EC3. 2.2.3 Bacterial true lipase using phylogenetic analysis. *African Journal of Biotechnology,* 9(48), 8243 – 8247. **2010.**

- [26] Arpigny, J.L., Jaeger, K. E., Bacterial Lipolytic Enzymes: Classification and Properties. *Journal of Biochemistry*, 343, 177 – 183. **1999.**
- [27] Eggert, T., Pouderoyen, G.V., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B.W., Jaeger, K.E., Biochemical Properties and Three – Dimensional Structures of Two Extracellular Lipolytic Enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26, 37 – 46. **2002.**
- [28] Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S., Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.*, 112: 598-603. **1992.**
- [29] Lee, S. Y., Rhee, J. S., Production and Partial Purification of a Lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 617-623. **1993.**
- [30] Telefoncu, A., *Besin Kimyası*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No: 149. İzmir, 172p. **1993.**
- [31] Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C., Production, Purification Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627-662. **2001.**
- [32] Anonim, *Enzyme Nomenclature*, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), California, **1992.**
- [33] Jensen, R. G., Detection and determination of Lipase (acylglycerol hydrolase) Activity from Various Sources. *Lipids*, 18: 650-657. **1983.**
- [34] Jensen, R. G., deJong, F. A., Clark, R. M., Determination of lipase specificity. *Lipids*, 18 (3): 239-252. **1983.**
- [35] Telefoncu, A., *Enzimoloji*. Lisansüstü Yaz Okulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın-Türkiye, 446p. **1997.**
- [36] Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. and Gulati, R. Microbial Lipases: Potential Biocatalysts for The Future Industry. *Current Science*, 77; 101-115. **1999.**
- [37] Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S. Microbial Lipases: Production and Applications. *Science progress*. 79, (2): 119-157. **1996.**
- [38] Balcão, V. M., Kennippen, A., Malcata, F. X., Kalo, P. J., Lipase Catalyzed Acidolysis of Butter Fat with Oleic Acid: Characterization of Process and Product. *Enzyme Microb. Technol.*, 33: 118-128. **1998.**

- [39] Jaeger, K-E., Eggert, T., Lipases for Biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 390-397. **2002.**
- [40] Godtfredsen, S., E., *Micobial Lipases*, Vol. 7, Nova Nordisk A/S, Denmark, 255- 273. **1990.**
- [41] Taweel, R. ve Sungur, S., Lipaz Enzimleri ile Yağların Modifikasyon Biyoteknolojisi, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara, 446 s. **1995.**
- [42] Stead, D., Microbial Lipases: their characteristic, role in food spoilage and industrial uses, *Journal of Dairy Research*, 53, 481-505. **1986.**
- [43] Saxena R.K., Sheoran A., Giri B., Davidson S.W., Purification Strategies Formicrobial Lipases, *Journal of Microbiological Methods*, 52, 1-18, **2003.**
- [44] Saxena R.K., Ghosh P.K., Gupta R., Davidson S.W., Bradoo S., Gulati R., Microbial lipases: Potential biocatalysts fort he future industry, *Current Science Online*, 95 (2), **2008.**
- [45] Hadeball W., Production of Lipase by *Yarrowia lipolytica* I. Lipases from yeasts (Review), *Acta Biotechnol.*, 11, 2, 159-167 p. **1991.**
- [46] Okumura, S., Iwai, M. ve Tsujisaka, Y., The Effect of Reverse Action on Triglyceride Hydrolysis by Lipase, *Agr. Biol. Chem.*, 45, 1,185-189. **1981.**
- [47] Kriger, N., Taipa, M. A., Barros, M. R., Melo, E. H. M., Filho, J. L. Ve Cabral, J. M. S., Purification of the *Penicillium citrinum* Lipase Using AOT Reversed. **1997.**
- [48] Primentel, M. C. B., Krieger, N., Coelho, L. C. C. B., Fantana, J. O., Melo, E. H. M., Ledingham, W. M. ve Fuho, L. J., Lipase from a Brazilian Strain of *Penicillitan citrinum*, *Appl. Biochemistry and Biotechnology*, 49, 59-74. **1994.**
- [49] Safari, M., Kermasha, S., Lambourson, L. ve Sheppard, J. D., Interesterification of Butterfat by Lipase from *Rhizopus niveus* in Reverse Micellar Systems, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 9, 1553-1557. **1994.**
- [50] Jacob, Z., Yeasts Lipid Biotechnology, *Advances in Applied Microbiology*, 39, 185- 212. **1994.**
- [51] Muderhwa, J. M., Ratomafaenina, R., Pina, M., Graille, J. ve Galzy, P., Purification and Properties of the Lipases from *Rhodotorula pilimanae*, *Appl. Microbial Biotechnol.*, 28, 348-354. **1986.**

- [52] Huang, S. Y., Chang, H. I. ve Goto, M., Preparation of Surfactant- Coated Lipase for the Esterification of Geraniol and Ecetic Acid in Organic Solvents, *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 552-557. **1988.**
- [53] Fox, P. F., *Food Enzymology*, Elsevier Applied Science, 378 s. **1991.**
- [54] Sutton, D. A., Fothergill, A.W. and Rinaldi, M.G. 1998. *Guide to Clinically Significant Fungi*, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- [55] Ayhan, K., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2. Baskı AÜ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaası, Ankara, 522s. 2000.*
- [56] LoureiroO, V., and Mafeito-Ferreira, M., Spoilage Yeasts in the Wine Industry. *International Journal of Food Microbiology* 86; 23– 50. **2003.**
- [57] Falih, A. M. 1998. Compatarive Toxcity of Heavy Metals to Some Yeast Isolated from Saudi Arabian soil. *Bioresource Technology*, 64; 193- 198.
- [58] Zambak C. Türkiye’de Makro Düzey Sanayi Atıkları Yönetim Sorunları ve Çözüm Yaklaşımları. Tübitak Vizyon 2023 Paneli-Katkı Dökümanı, 1-6. 2. Gıda Sanayi Atıkları. www.tuik.gov.tr (17.06.2007). **2002.**
- [59] Kim S, Dale BE. Global potential Bioethanol from Wasted Crops and Crop Residues. *Biomass and Bioenergy*, 26: 361-375. **2004.**
- [60] Hatzinikolau D., Macris J.B., Christakooulos P., Kekos D., Kolisis F.N and Fountoukidis G., Production and Partial Characterisation of Extracellular Lipase form *Aspergillus niger*. *Biyotechnology Letters*, 18, 547-552, **1996.**
- [61] Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y., Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp., *Journal of Biochemistry* 109,211-216,**1991.**
- [62] Lee S. Y. ve Rhee, J. S., Production and Partial Purification of a Lipase from *Pseudomonas putida* 3SK, *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 617-623. **1993.**
- [63] Litwack G., *Experimental Biochemistry, A Laboratory Manual*, John Wile & Sons Inc., 247- 253p. **1960.**
- [64] Rifaat H.M., El-Mahalawy A.A., El-Menofy H.A., and Donia S.A., Production, Optimization and Partial Purification of Lipase from *Fusarium oxysporium*, *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, V (N): 70-84p. **2010.**
- [65] Lowry O.h., Rosebrough N.J., Farr A.L. Randal R.J., Protein Mesurement with The Folin reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275p. **1951.**

- [66] Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sausa, J. M., Villa, T. G., Barros-Velazquez, J. Characterization of Biogenic Amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* Strains from White Muscle of Fresh and Frozen Albacore Tuna. *International Journal of Food Microbiology*, 57: 19-31. **2000.**
- [67] Braun, P., Balzer, G., Fehlhaber, K., Activity of Bacterial Lipases at Chilling Temperatures. *Food Microbiology*, 18: 211-215. **2001.**
- [68] Gao, X. G., Cao, S. G. ve Zhang, K. C., Production, Properties and Application Tononaqueous Enzymatic Catalysis of Lipase from a Newly Isolated *Pseudomonas* strain, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 74-82. **2000.**
- [69] Jaeger, K. ve Reetz, M. T., Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology, *TTPTECH*, 16, 396-403. **1998.**
- [70] Kauffmann, I., Schmidt-Dannert, C., Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* Lipase into an Efficient Phospholipase with Increase Activity Towards Long-chain Fatty Acyl Substrates by Directed Evolution and Rational Design. *Protein Engineering*, 14 (11): 919-928. **2001.**
- [71] Kanwar, L., Gogoi, B. K., Goswami, P., Production of a *Pseudomonas* Lipase in N-alkane Substrate and Its Isolation Using an Improved Ammonium sulphate Precipitation Technique. *Bioresource Technology*, 84: 207-211. **2002.**
- [72] Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S., Lipase Assay for Conventional and Molecular Screening: an Overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37: 63-71. **2003.**
- [73] Sztajer, H., Maliszewska, I. ve Wieczorek, J., Production of exogenous Lipases by Bacteria, Fungi and actinomycetes, *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 492-497. **1988.**
- [74] Rapp, P. ve Backhaus, S., Formation of Extracellular Lipases by Filamentous Fungi, Yeasts and Bacteria, *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 938-943.]. **1992.**
- [75] Kuo, T., *Lipid Biotechnology*. New York, 357p. **2002.**
- [76] Liu, W. H., Beppu, T. ve Arima, K., Effect of Various Inhibitors on Lipase Action of *Humicola lanuginosa* S-38, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2487-92. **1973.**
- [77] Aisaka, K. ve Terada, O., Purification and Properties of Lipase from *Rhizopus japonicus*, *J. Biochem.*, 89, 817-822. **1981.**

- [78] Yadav, R. P., Saxena, R. K., Gupta, R. ve Davidson, S., Purification and Characterization of a Regiospecific Lipase from *Aspergillus terreus*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28, 243-249. **1998**.
- [79] Corzo G., and revah S., Production and Characteristics of the Lipase from *Yarrowia lipolytica*, *Bioresource Technology* 70, 173 – 18 p. **1999**,
- [80] Kebabcı Ö., Farklı Maya Kültürlerinden Lipaz Üretimi ve Verim Artırımı, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi **2010**.
- [81] Hou T.C., Industrial Uses of Lipase, *Lipid Biotechnology*, Edited by Tsung Min kou and Harold W. Gardner. Marcel Dekker Inc., 390-400p. **2002**.
- [82] M. N. Hosseinpour, G. D. Najafpour, H. Younesi, M. Khorrami, Z. Vaseghi., Lipase Production in Solid State Fermentation Using *Aspergillus niger*. Response Surface Methodology, *IJE TRANSACTIONS B: Applications* Vol. 25, No. 3, 151 159p. **2012**.
- [83] He Y, Tan T .Use of Response Surface Methodology to Optimize Culture Medium for Production of Lipase with *Candida* sp. 99-125. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43:9-14. **2006**.
- [84] Teng Y, Xu Y. Culture Condition Improvement for Whole-cell Lipase Production in Submerged Fermentation by *Rhizopus chinensis* Using Statistical Method. *Bioresour. Technol.* 99:3900-3907. **2008**.
- [85] Kaushik R, Saran S, Isar J, Saxena RK. Statistical Optimization of Medium Components and Growth Conditions by Response Surface Methodology to Enhance Lipase Production by *Aspergillus carneus*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* (40):121-126. **2006**.
- [86] Potumarthi R, Subhakar C, Vanajakshi J, Jetty A. Effect of Aeration and Agitation Regimes on Lipase Production by Newly Isolated *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC 8737 in Stirred Tank Reactor Using Molasses as Sole Production Medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151:700-710. **2008**.
- [87] Alonso FOM, Oliveira EBL, Dellamora-Ortiz GM, Pereira-Meirelles FV. Improvement of Lipase Production at Different Stirring Speeds and Oxygen Levels. *Braz. J. Chem. Eng.* 22(1):9-18. **2005**.
- [88] Gao, Y., Breuil, C., Extracellular Lipase Production by a Sapwood- Staining Fungus *Ophiostoma piceae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 638-642. **1995**.

- [89] Essamri, M., Valerie, D., Louis, C., Optimization of Lipase Production by *Rhizopus oryzae* and Study on the Stability of Lipase Activity in Organic Solvents. *J. Biotechnol.*, 60: 97-103. **1998**.
- [90] Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C., Deng, L., Screening of High Lipase Producing *Candida* sp. and Production of Lipase by Fermentation. *Process Biochemistry*, 39 (4): 459-465. **2003**.
- [91] Tan, T., Zhang, M., Xu, J., Zhang, J., Optimization of Culture Conditions and Properties of Lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochemistry*, 39 (11): 1495-1502. **2004**.
- [92] Benjamin S, Pandey A. Optimization of Liquid Media for Lipase Production by *Candida rugosa*. *Bioresour. Technol.* 55:167-170. **1996**.
- [93] Cihangir N., ve Sarıkaya E., Aspergillus Sp.'den Lipaz Enzimi Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, TÜBİTAK, MİSAG- 16 numaralı proje, 13,20s. **2003**.
- [94] Smaniotto A, Skovronski A, Rigo E, Tsai SM, Durrer A, Foltran LL, 'Synthetic Lipase' Production from Newly Isolated Sporidiobolus Pararoseus Strain Bysubmerged Fermentation, *Braz J Microbiol.* ; 43(4):1490-8. **2012**.
- [95] Park SY, Kim JY, Bae JH, Hou CT, Kim HR. Optimization of Culture Conditions for Production of a Novel Cold-active Lipase from *Pichia lynchii* NRRL Y-7723, *J Agric Food Chem.* 30; 61(4):882-6. **2013**.
- [96] Lan D, Hou S, Yang N, Whiteley C, Yang B, Wang Y Optimal Production and Biochemical Properties of Lipase from *Candida albicans*, *Int J Mol Sci.* 7216-37. **2011**.
- [97] Lima VMG, Krieger N, Sarquis MIM, Mitchell DA, Ramos LP, Fontana JD. Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol. Biotechnol.*41 (2):105-110. **2003**.
- [98] Geon-Ho L., Bae J-H., Suh M-J., kim I-H., Hou C-T., and Kim H-R ., New Finding and Optimal Production of a Novel Extracellular Alkaline Lipase from *Yarrowia lipolytic* NRRL Y-2178, *J. Microbial.Biotechnol.*, 17(6), 1054-1057p. **2007**.
- [99] Nahas, E., Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* Under Various Growth Conditions. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 227-233.**1988**.
- [100] Wang, Y., Srivastava, K. C., Shen, G. J., Wang, H.Y., Thermostable Alkaline Lipase from a Newly Isolated Thermophilic Bacillus Strain, A30-1 (ATCC 53841). **1995**.

- [101] Pabai, F., Kermasha, S., Morin, A., Use of Continuous Culture to Screen for Lipase Producing Microorganisms and Interesterification of Butterfat by Lipase Isolates. *Can. J. Microbiol.*, 42: 446-452. **1996.**
- [102] Lanser, A. C., Manthey, L. K., Hou, C. T., Regioselectivity of New Bacterial Lipases Determinated by Hydrolysis of Triolein. *Curr Microbiol.*, 44: 336-340. **2002.**
- [103] Gilbert, E. J., Drozd, J. W., Jones, C. W., Physiological Regulation and Optimization of Lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2215-2221. **1991.**
- [104] Bradoo, S., Saxena, R. K., Gupta, R., Two Acidothermotolerant Lipases from New Variants of *Bacillus* spp., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15: 87-91. **1999.**
- [105] Dong, H., Gao, S., Han, S., Cao, S., Purification and Characterization of a *Pseudomonas* sp. Lipase and Properties in Non-aqueous Media. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30: 251-256. **1999.**
- [106] Lan D, Hou S, Yang N, Whiteley C, Yang B, Wang Y. Optimal Production and Biochemical Properties of a Lipase from *Candida albicans*, *Int J Mol Sci.* 7216-37. **2011.**
- [107] Papaparaskevas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. Optimizing Production of Extracellular Lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.* 14:397-402. **1992.**
- [108] Salleh AB, Musani R, Razak CNA. Extra and Intracellular Lipases from a Thermophilic *Rhizopus Oryzae* and Factors Affecting Their Production. *Can. J. Microbiol.* 39:978-981. **1993.**
- [109] Rajendran A, Thangavelu V. Optimization and Modeling of Process Parameters for Lipase Production by *Bacillus Brevis*. *Food Bioprocess Technol.* DOI 10.1007/s11947-010-0387-4. **2010.**
- [110] Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, Ananthanarayan L Optimization of *Aspergillus niger* Fermentation for the Production of Glucose Oxidase. *Food Bioprocess Technol.* 2:344–352. **2009.**
- [111] Venkateshwar M, Chaitanya K, Altaf M, Mahammad EJ, Bee H, Reddy G. Influence of Micronutrients on Yeast Growth and β -Dfructofuranosidase Production. *Indian J. Microbiol.* 50:325-331. Doi: 10.1007/s12088-010-0005-1. **2010.**

- [112] Snellman EA, Colwell RR. *Acinetobacter* Lipases: Molecular Biology, Biochemical Properties and Biotechnological Potential. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31:391-400. **2004.**
- [113] Telefoncu, A., *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. Çesme, İzmir-Türkiye, 326p. **1986.**
- [114] Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R. K., Gupta, R., A Hyper- Thermostable, Alkaline from *Pseudomonas* sp. with the Property of Thermal Activation. *Biotechnology Letters*, 22: 495-498. **2000.**
- [115] Mahadik N.D., Puntambekar U.S., Bastawde K.B., Khire J.M., Gokhale D.v., Productiin of Acidic Lipase by *Aspergillus niger* in solid State Fermantation, *Process Biochemistry*, 38, 715-721p. **2002.**
- [116] Kulkarni, N., Gadre, R. V., A Novel Alkaline, Thermostable, Protease-free Lipase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters*, 21: 897-899. **1999.**
- [117] Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L., Gupta, J., Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Lipase from a New Thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Proc. Biochem.*, 37: 1075-1084. **2002.**
- [118] Potumarthi R, Subhakar C, Vanajakshi J, Jetty A. Effect of Aeration and Agitation Regimes on Lipase Production by Newly Isolated *Rhodotorula mucilaginosa*-MTCC 8737 in Stirred Tank Reactor Using Molasses as Sole Production Medium. *Appl Biochem Biotechnol.* 151(2-3):700-10. **2008.**
- [119] Gutarra ML, Cavalcanti ED, Castilho LR, Freire DM, Sant'Anna GL Lipase Production by Solid-State Fermentation: Cultivation Conditions and Operation of Tray and Packed-Bed Bioreactors. *Appl Biochem Biotechnol.* 121-124:105-16. **2005.**
- [120] Murat Yilmaztekin, Huseyin Erten, Turgut Cabaroglu. Enhanced Production of Isoamyl Acetate from Beet Molasses with Addition of Fusel Oil by *Williopsis saturnus* var. *Saturnus* *Food Chemistry* 112. 290–294. **2009.**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Hamideh HAMMAMCHİ

Doğum Yeri: Tebriz

Medeni Hali: BEKÂR

E-posta: hi_haman@yahoo.com

Adresi: İncesu 87/2 , kolej, Çankaya / ANKARA

Eğitim

Lise: Shahid Mahdiye Salek

Lisans: İslamik Azad Üniversitesi

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce.

İş Deneyimi

-

Deneyim alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

