

770593

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KATI FAZ FERMANTASYON TEKNİĞİ İLE  
MOTOLERAN *Bacillus coagulans*' TAN EKSTRASELÜLER  
LİPAZ ENZİMİ ÜRETİMİ**

Mehmet Hüseyin ALKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

( KİMYA ANABİLİM DALI )

DİYARBAKIR  
HAZİRAN-2005

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DIYARBAKIR

M. Hüseyin ALKAN tarafından yapılan bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı                      Adı Soyadı

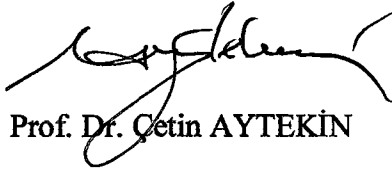
Başkan: Prof. Dr. Çetin AYTEKİN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL (Danışman)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fikret UYAR

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

29/06/2005



Prof. Dr. Çetin AYTEKİN

ENSTİTÜ MÜDÜR



## TEŞEKKÜR

Laboratuar çalışmalarında değerli fikirlerinden yararlandığım Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Çetin AYTEKİN' e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans çalışmamda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak ihtiyaç duyduğum her konuda yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalar aşamasında yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Fikret UYAR ve Dr. Mehmet DOĞRU' ya göstermiş oldukları yakın ilgi ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler DÜAPK-03-FF-67 nolu proje ile karşılanmıştır. Bu vesile ile Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Koordinatörlüğü' ne teşekkür etmek isterim.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
AMAÇ.....	v
ÖZET .....	vi
SUMMARY .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Enzimler .....	4
1.2. Hidrolazlar .....	5
1.3. Lipazlar .....	5
1.4. Lipazların Katalizlediği Tepkimeler .....	7
1.4.1. Hidroliz .....	7
1.4.2. Esterleşme .....	7
1.4.3. Transesterleşme.....	7
1.5. Lipazların Reaksiyon Mekanizması.....	8
1.6. Lipazların Kullanım Alanları .....	9
1.6.1. Şiral Bileşiklerin sentezi .....	9
1.6.2. Karbohidrat Ester Sentezi .....	10
1.6.3. Poli Doymamış Yağ Asitlerin Elde Edilmesi .....	10
1.6.4. Biyolojik Aktif Bileşiklerin Sentezi.....	11
1.6.5. Parfümlerin ve Tatlandırıcı Esterlerin Üretimi .....	11
1.6.6. Yapısal Lipitlerin Sentezi.....	11
1.6.7. Organik Karbonatların Sentezi.....	12
1.6.8. Deterjanlar.....	12
1.7. Ekstraselüler Enzimler .....	12
1.8. Fermantasyonun Genel Prensipleri .....	14
1.9. Katı-Faz Fermantasyonu (Solid State Fermentation; SSF).....	14
1.9.1. SSF' in Genel Özellikleri.....	15
1.9.2. SSF' in SmF' e Göre Avantajları.....	15
1.9.3. SSF' in Kullanım Alanları .....	18
1.9.4. SSF' te Dikkat Edilecek Hususlar.....	19
1.9.4.1. Mikroorganizma Seçimi.....	20
1.9.4.2. Substrat Seçimi .....	20

1.9.4.3. Substratın Parça Büyüklüğü.....	20
1.9.4.4. Nem miktarı .....	21
1.9.4.5. İnkübasyon Süresi .....	21
1.9.4.6. Sıcaklık ve pH' nın Etkisi .....	21
1.9.4.7. Ekim Miktarı .....	22
1.9.4.8. Substratın Otoklavlanma Süresi.....	22
1.9.4.9. Fermentörün Çalkalama-Karıştırılma ve Havalandırılması .....	22
1.9.4.10. Katı Besiyerine Katılan Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi.....	23
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	24
3. MATERYAL ve METOD .....	28
3.1. Kullanılan Kimyasallar .....	28
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	28
3.3. Besiyerleri .....	28
3.3.1. Katı Besiyeri .....	28
3.3.2. Sıvı Besiyeri.....	29
3.3.3. SSF Besiyeri.....	29
3.4. Çözeltiler .....	29
3.4.1. Tampon Çözeltiler.....	29
3.4.2. Alkali Çözeltisi .....	29
3.4.3. Folin Reaktifi .....	29
3.5. Mikroorganizma.....	29
3.6. SSF' te Enzim Üretimi.....	30
3.7. Enzim Ekstraksiyonu .....	30
3.8. Enzim Aktivite Tayini.....	30
3.9. Standart Eğrinin Hazırlanması .....	30
3.10. Protein Miktar Tayini.....	31
3.11. Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	31
3.12. Sıcaklığın Etkisi .....	31
3.13. pH' nın Etkisi .....	31
3.14. Uygun Yağ ve Uygun Yağ Derişimi Belirlenmesi .....	32
3.15. Azot Kaynakları Etkisi.....	32
3.16. Azot-Karbon Kaynakları Etkisi .....	32
3.17. Karbon Kaynakları Etkisi.....	32
3.18. Sürfaktant Etkisi.....	32

3.19. Metal İyonların Etkisi .....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Farklı Substratlarla <i>Bacillus coagulans</i> ' tan Lipaz Aktivitesi .....	34
4.2. Lipaz Aktivitesinde İnkübasyon Süresi .....	34
4.3. Optimum pH .....	34
4.4. Optimum Sıcaklık .....	34
4.5. Lipaz Enzimi Üzerine Sürfaktantların Etkisi .....	34
4.6. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Yağların Etkisi .....	35
4.7. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Zeytin Yağı Konsantrasyonların Etkisi.....	35
4.8. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi.....	35
4.9. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Azot-Karbon Kaynakları Etkisi .....	35
4.10. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Karbon Kaynakları Etkisi .....	35
4.11. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Metal İyonların Etkisi .....	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	37
6. TABLOLAR, ŞEKİLLER ve RESİMLER.....	40
7. EKLER.....	48
Ek.1. Tampon Hazırlanması.....	48
Ek.2. Alkali Çözeltisinin Hazırlanması.....	48
Ek.3. Folin Reaktifinin Hazırlanması .....	49
8. KAYNAKLAR .....	50
9. TABLO LİSTESİ.....	59
10. ŞEKİL LİSTESİ.....	60
11. RESİM LİSTESİ .....	61
12. ÖZGEÇMİŞ .....	62

## AMAÇ

Son yıllarda diğer tekniklere nazaran daha fazla ürün elde edilmesinden ötürü, Katı-Faz Fermantasyon Tekniği (SSF) endüstriyel alanlarda gittikçe büyük bir önem arz etmektedir.

Çalışmada deterjan, ilaç, organik biyosentez, kozmetik vb. sanayi alanlarında önemli bir yer tutan lipaz enziminin ucuza ve yüksek verimde üretilmesi hedeflendi. Bu amaç doğrultusunda uygun bitkisel atıklardan yararlanarak; ekonomik olması, az yoğun iş gücü gerçekleştirilmesi ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı SSF tekniği kullanıldı.

Enzim üretim kaynağı olarak Çermik Belkıs Hatun Termal Kaplıcaları'ndan izole edilmiş olan *Bacillus coagulans* seçilerek lipaz enziminin üretilmesi ve bu enzim için optimum koşulların belirlenmesi amaçlandı.



## ÖZET

Biyoteknolojide enzimlerin kullanımı günümüzde giderek önem kazanmaktadır. Bu enzim gruplarından biri de lipazlardır. Bu enzimler yağların modifikasyonunda geniş bir kullanım alanına sahiptirler. İlaç sanayinde (sindirim enzimleri, gliseridleri hidrolizleyen enzimler) ve temizleyicilerde (deterjan katkı maddesi) sık sık kullanılmaktadırlar.

Lipazların SSF tekniği ile üretilmeleri son yıllarda büyük bir ticari önem taşımaktadır. Bu amaçla SSF tekniği ile lipaz enzimi üretiminin incelendiği bu çalışmada *Bacillus coagulans* biyolojik materyal olarak kullanılmıştır.

Hangi substrat ortamında daha iyi lipaz üretildiğini tespit etmek için kavun, karpuz, pirinç, muz, mercimek kabuğu ve buğday kepeği substrat olarak kullanıldı. Enzim üretimi açısından kavun kabuğu en iyi substrat olarak seçildi ( $78.100 \text{ Ug}^{-1}$ ). Enzim karakterizasyonuna yönelik daha sonraki çalışmalarda da substrat olarak kullanıldı.

Enzim için uygun inkübasyon süresini, optimum pH ve optimum sıcaklığı belirlemek için yapılan deneylerde uygun inkübasyon süresi 24. saat, optimum pH: 7.0, optimum sıcaklık  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  olarak bulundu.

Lipaz enzimi üretimi üzerine farklı yağların etkisini incelemek için zeytinyağı, mısıryağı, ayçiçekyağı, soya yağı ve tribütirin içeren kepekli ortamda bakteri üretildi. En iyi aktivitenin % 1 zeytinyağı içeren kepekli ortam ile elde edildiği görüldü. Enzim aktivitesi üzerine uygun zeytin yağı derişimini belirlemek için farklı yağ derişimlerinde (% 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7) hazırlanan besi yerinde bakteri üretildi. En iyi zeytin yağı derişiminin % 2 olduğu tespit edildi. Daha sonraki aşamalarda bu derişim kullanılarak enzim üretimi üzerine sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton X-100, gum arabik, polietilenglikol gibi surfaktantların ve farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisi incelendi. Yapılan deneyler sonucu sırasıyla SDS, nişasta, maltoz ve  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ile maksimum aktivite elde edildi.

Metal iyonlarının enzim üretimi üzerine etkisi incelendiğinde,  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının enzimi %105 aktive,  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$ , nin ise enzimi sırasıyla % 32 ve % 26 düzeyinde inhibe ettiği belirlendi.

Anahtar kelime: *Bacillus coagulans*, SSF, lipaz üretimi



## SUMMARY

Use of enzymes has been attracted considerable interested in biotechnological areas. One of these group of enzymes is lipases. These type of enzymes are widely used in fat modifications, drug industry (digest enzymes), clinical areas (hydrolyzing the glycerides) and as cleaner (detergent additives).

Lipase production with SSF technique is the subject of recent extensive investigation since this technique is become a commercially important process. For this reason, our project aims to produce lipase with SSF technique by using *Bacillus coagulans* as a biological material.

Melon, water melon and banane waste, rice and lentil husk and wheat bran were used as substrate to determine the best substrate. Melon waste was found to be the best substrate for the production of enzyme ( $78.100 \text{ Ug}^{-1}$ ) and therefore, used as a substrate for further studies.

Appropriate incubation time, optimum temperature and optimum pH were found 24 h,  $37^\circ\text{C}$  and pH: 7.0 respectively, for the enzyme.

To investigate the effect of various oils on lipase production, bacteria was produced in growth medium which obtained from olive oil, sunflower oil, corn oil, soya oil and tributyrin. Olive oil (1 %) gave the best result. Bacteria was produced in growth medium which containing different olive oil concentrations (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 %) for the effect of olive oil concetration on enzyme activity. Appropriate olive oil concentration was found to be 2 %. The effect of different surfactants such as sodium dodecyl sulphate, Triton X-100, gum arabic and polyethylene glycol (PEG) and different carbon, nitrogen and carbon-nitrogen containing compounds were examined by using above concentration of olive oil. Obtained results indicated that maximum activity was observed in the following order; SDS, starch, maltose and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Finally, the effect of metal ions on enzyme production was tested and it was found that enzyme was activated 105 % by  $\text{Ca}^{2+}$  ion but inhibited 32 % and 26 % by  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ , respectively.

**Keywords:** *Bacillus coagulans*, SSF, lipase production

## 1. GİRİŞ

Mikroskop yardımıyla görülebilen çoğunlukla tek hücreli basit yapıdaki organizmalara mikroorganizma denir. Önemli mikroorganizma grupları bakteriler, mantarlar, algler, protozonlar ve belirli şartlarda canlılık özelliği gösteren virüslerdir.

Mikroorganizmalar, insan sağlığı ve günlük hayatımızla doğrudan ilgili canlılardır. Bunların bazıları faydalı, bazıları ise zararlıdır (1).

Bugün dünyanın hemen hemen her yerinde insan yaşam kalitesini artırmak ve yaşamı kolaylaştırmak amacıyla mikroorganizmaların bazı faaliyetlerinden yararlanılmaktadır. Mikroorganizmalar metabolizmaları sonucu bazı bileşikler salgılar. Bazı organizmaların salgıladığı bileşikler bugün tıp, besin endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Nitekim mikrobiyal son ürün olan organik asitler, amino asitler, nükleik asitler ve onlarla ilişkili bileşikler, vitaminler, enzimler, steroid hormonlar ve antibiyotiklerin çok çeşitli alanlarda kullanıldıkları bilinen bir gerçektir. Bu önemli bileşikler özel bazı mikroorganizmalar, özel bazı ortamlarda geliştirilerek elde edilirler. Bu ortamların hazırlanmasında maliyetin ucuz olması için organizmanın en çok gereksinim duyduğu karbon kaynağının ekonomik değeri düşük maddelerden sağlanması gerekir.

Bir mikrobiyal ürünün üretilmesi için;

- 1) Organizmaya
- 2) Organizmanın istediği ortamın hazırlanmasına gereksinim vardır.

Endüstriyel mikrobiyolojik işlemlerde, özellikle fermantasyonlarda kullanılacak organizmaların insanlarda herhangi bir hastalığa neden olmaması, verim gücünün yüksek olması, sahip oldukları özellikleri kaybetmemesi ve üretim ortamında hızlı çoğalması gerekir. Diğer taraftan organizmanın ortamına koyacağımız ve üreteceği ürünün esas ham maddesini oluşturacak organik maddenin, kolayca, bol miktarda ve ucuza bulunabilen bir madde olması gerekir.

Endüstriyel mikrobiyolojide bazı ürünleri üretmek için daha çok mantarlar ve bakterilerden yararlanılmaktadır (2).

Kısa zincirli alkollerin ve asitlerin esterleşme ürünleri gıda, içki, kozmetik ve farmasötik sanayinde tat ve aroma bileşeni olarak kullanılmaktadırlar. Uzun zincirli asitlerin kısa zincirli alkollerle esterleşme ürünleri gıda, deterjan, kozmetik ve farmasötik endüstrisinde katkı maddesi (emülsifier) olarak önemlidirler. Uzun zincirli yağ

asitlerinin metil ve etil esterleri dizel yakıt olarak kullanılabilen değerli oleokimyasal bileşenlerdir. Uzun zincirli yağ asitlerinin yağ alkollerini ile esterleşme ürünü olan yüksek molekül ağırlıklı esterleri, mumlar (vaks esterleri) ise, kozmetikte yumuşatıcı, gıda ve farmasötik sanayinde katkı maddesi ve yüksek hızda çalışan basınç sistemlerde yağlayıcı olarak endüstriyel kullanımları son yıllarda büyük bir artış göstermektedir. (3, 4, 5).

Organik bileşiklerin en önemli sınıfını oluşturan esterler, açıl gruplarının

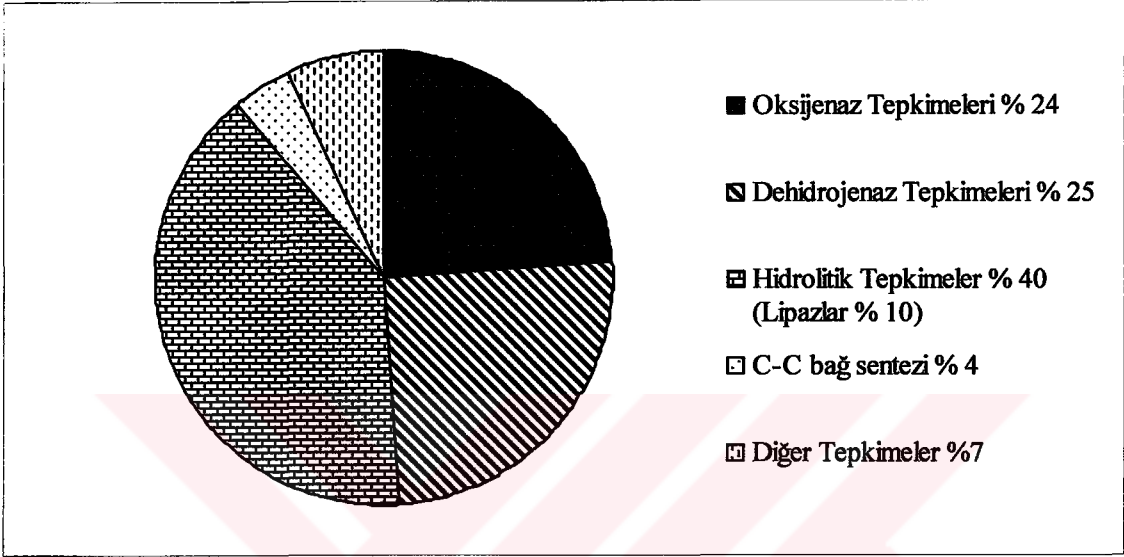
- 1) alkoller ve karboksilik asitler arasında (esterleşme),
- 2) esterler ve asitler arasında (asidoliziz),
- 3) esterler ve alkoller arasında (alkoliziz),
- 4) ester ve gliserol arasında (gliseroliziz) ve
- 5) iki ester arasındaki (transesterleşme) değişimi ile üretilebilirler.

Günümüzde esterlerin çoğu ya kimyasal yöntemlerle sentezlenirler ya da bitkilerden ekstrakte edilirler (4). Bitkilerden ekstraksiyon düşük miktarlarda gerçekleşir, elde edilen ürün pahalıdır ve endüstriyel kullanım için kimyasal olarak üretilirler (6). Yüksek molekül ağırlıklı esterlerin kimyasal üretimi genellikle,  $ZnCl_2$ ,  $SnCl_2$  ve  $FeCl_3$  gibi orta derecede asitliğe sahip katalizör varlığında, yüksek sıcaklıkta ve çok sayıda basamak üzerinden gerçekleşir. Tepkime sonunda çok miktarda yan ürün oluştuğu için ürün oluşumu azdır, katalizörün ortamdaki ayrılması güçtür, istenen ürün metal kirliliği içerir (7, 8). Kimyasal olarak üretilen ürün, bitkilerden ekstrakte edilen ürüne kıyasla daha ucuzdur, ancak doğal değildir. Bu ürünlerin kimyasal yapılarının istenen kalite ve saflıkta olması için gerekli olan ek ayırma işlemleri de maliyeti arttırmaktadır. Bu nedenle, proses çevre açısından da uygun olmamaktadır. Doğal ya da doğala özdeş esterlere olan talebin sürekli olarak artması bu ürünlerin biyoteknolojik proseslerle üretilmelerini gündeme getirmiştir (9). Bu nedenle bu esterlerin üretiminde katalizör olarak enzimlerin kullanılması, hızlı bir gelişme göstermektedir (5, 10, 11, 12).

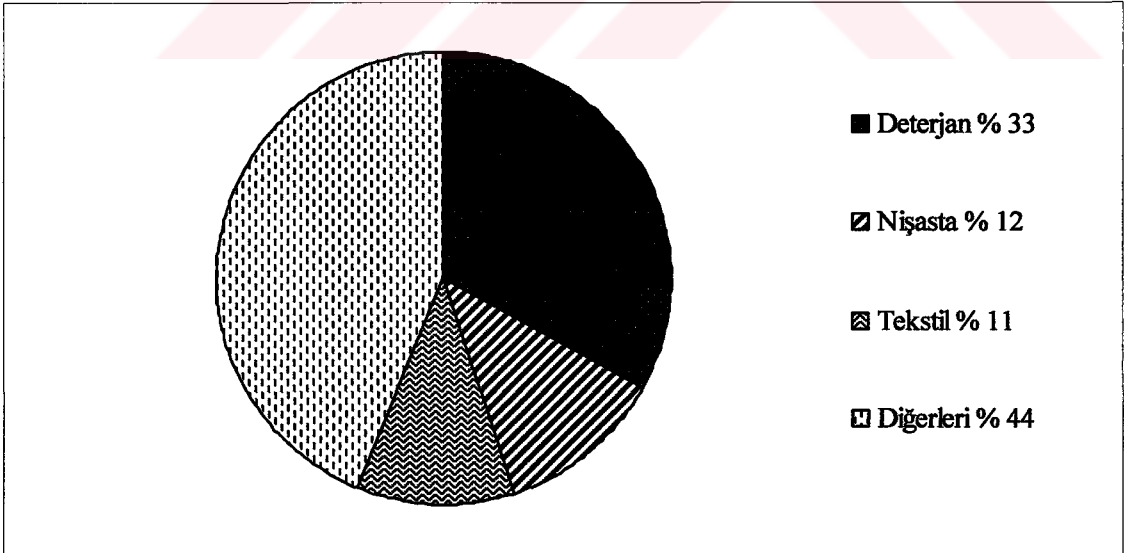
Doğada var olan farklı enzim sayısı 25.000 olduğu tahmin edilmektedir (11, 13, 14). Günümüzde bunlardan sadece 4.000 tanesi tanımlanmıştır (11). Deterjan ve gıda endüstrilerinde ise yaklaşık olarak 50 enzim kullanılmaktadır (14). Hidrolazlar, endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin % 80' ini oluşturmaktadırlar (11). 1993 yılında 1 milyar dolar olan dünya enzim pazar değeri, 2001 yılında 1.63 milyar dolar'a yükselmiştir (14). Enzimlerin sentetik organik kimyada kullanımları Şekil 1.1.'de verilmiştir. % 40' lik pay ile hidrolitik tepkimeler birinci sırayı almaktadır. Hidrolitik tepkimeleri katalizleyen

hidrolazlar grubu arasında yer alan lipazlar, enzim pazarının % 10' unu oluşturmaktadır ve bu pay giderek artış göstermektedir (15).

Enzimlerin endüstride kullanımları incelendiğinde (Şekil 1.2), 1.63 Milyar dolar olan dünya enzim pazarında % 33 ile deterjan endüstrisi birinci sırada yer almakta, bunu nişasta % 12 ve tekstil sanayi % 11 izlemektedir.



Şekil 1.1. Enzimlerin sentetik organik kimyada kullanım payı



Şekil 1.2. Enzimlerin dünya pazarındaki payları

Enzimler arasında yaygın kullanım alanına sahip olan lipazlar, sulu ortamlarda hidroliz tepkimelerini katalizlerler; susuz ortamlarda ise tepkimeyi terse döndürerek

esterleşme ya da transesterleşme tepkimelerini katalizlerler. Lipazlar, çok sayıda esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamlarda kararlı ve ucuz olmaları, ester bağına spesifik olmaları, yüksek substrat seçimlilikleri ve yan ürün oluşumunu önlemeleri nedeniyle kimyasal katalizörlerin alternatifidirler (4, 16, 17, 18). Ayrıca bu enzimler toksik olmamaları ve biyolojik olarak bozunabilmeleri nedeniyle çevre dostudur. Bununla birlikte, her bir sentez spesifik bir problemdir, uygun lipaz seçimi ve deney koşullarının optimizasyonu, yüksek verim elde etmek için önemlidir.

### 1.1. Enzimler

Enzimler protein yapısında olan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar; hücre içindeki reaksiyonları ve hücre dışında hem doğal hem de doğal olmayan substratlar ile ilgili tepkimeleri katalizlerler. Katalizör olarak enzimler aşağıdaki özellikleri gösterirler;

- Dar sıcaklık (genellikle 20-40 °C) ve pH aralıklarında ılımlı koşullar altında kullanılırlar,
- Seçimlilikleri az ya da çok olarak değişebilmesine karşın, katalizlenen tepkimelerde stereoseçimli, substrat için yüksek seçimli olabilirler,
- Katalitik aktiviteleri, var olan substratlar, ürünler ve diğer bileşenlerin derişimleri ile önemli ölçüde etkilenebilir,

Üretim süresinin uzaması, kararsız olmaları, yüksek fiyat, substrat seçimlilikleri, enzimlerin sentetik kimyada katalizör olarak kullanılmalarında en önemli sorunlardır. Bununla birlikte, yeni endüstriyel gereksinimler, kimya ve biyolojideki yeni gelişmeler ile bu anlayış değişmektedir. Bunun farklı nedenleri vardır:

- ✓ Çeşitli enzimatik tepkimeler, doğal ya da doğal olmayan substratların stereoseçimli olarak ürünlere dönüştüğünü göstermektedir.
- ✓ Hem enzim tutuklanması ve kararlılığı için hem de proseslerin ölçek büyütmesi için yeni teknikler geliştirilmektedir.
- ✓ Rekombinant DNA teknolojisi, enzimlerin düşük maliyetle üretilmesi ve istenen özelliklere sahip enzim üretimine olanak sağlamaktadır.

Enzimlerin kullanılmasıyla çok sayıda organik reaksiyon, örneğin, şıral ara ürünlerin, şekerlerin, nükleotidlerin ve ilgili bileşenlerin dönüşümü; amino asitler,

şekerler ve şeker fosfatları gibi fizyolojik aktif bileşenlerin sentezi; peptidlerin ve proteinlerin dönüşümü; ve içinde klasik kimyasal yöntemlerin de kullanılmak zorunda kalındığı diğer dönüşümler gerçekleştirilebilir. Sentetik organik kimyada enzimlerin kullanımına yönelik yapılan araştırmalar, bütün kayıtlı olan uygulamaların % 65' inin hidrolitik (% 40) ve dehidrojenaz (% 25) tepkimeleri olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte dehidrojenaz uygulamaları çoğunlukla mikroorganizmaların, az sayıda izole enzimlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimlerin kullanıldığı bir diğer önemli tepkime, oksijenazların kullanıldığı tepkimelerdir (% 24), enzimatik karbon-karbon sentezi ile ilgili az sayıda kayıt vardır (% 4). Enzim katalizli bütün diğer tepkimeler toplamın % 7' sini oluşturur (14).

Günümüzde var olduğu tahmin edilen 25.000 enzimden yaklaşık olarak 4.000 tanesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (TUBMB) tarafından sınıflandırılmıştır. Çoğunluğu hidrolazlar, transferazlar ve oksidoredüktazlar olmak üzere yaklaşık 400 tanesi araştırmalar için ticari olarak elde edilmektedir (13, 14).

Enzimler arasında hidrolazlar, endüstriyel biyotransformasyonlarda en çok kullanılan enzimlerdir (19).

## 1.2. Hidrolazlar

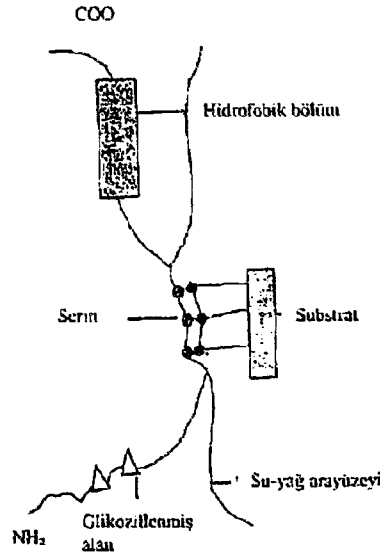
Hidrolazlar (E.C.3), C-O, C-N, C-C ve fosfatlarda P-O bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalizlerler. Yağ asitlerinin esterleşmesi ve polisakkaritlerin, nitrillerin, proteinlerin, lipidlerin hidrolizini gerçekleştirir. Bu enzimlerin çoğu deterjan endüstrisinde ve gıda endüstrisinde, proteinleri, karbonhidratları ve yağları parçalamak için tepkimelerde kullanılır (19).

## 1.3. Lipazlar

Lipazlar açıl gliserollerin yağ asitlerine, diaçil gliserol, mono açıl gliserol ve gliseridlere hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Aynı zamanda transesterifikasyonla esterlerin sentezini de katalizlerler. Bu enzimler bakteriler, mayalar ve mantarlar tarafından salgılanmaktadır ( 20, 21, 22, 23).

Lipazlar, özellikle su-yağ ara fazı arasındaki iç yüzeyde substrata karşı katalitik etki göstererek trigliseritleri digliserit, monogliserit, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlemektedirler. Aynı zamanda su ile karışmayan organik çözücülerde lipit

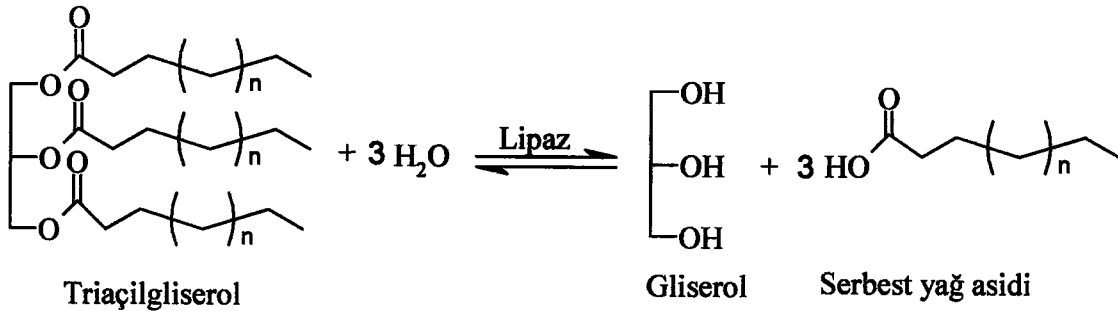
substratların esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını katalizlemektedirler (24).



Şekil 1.3. Lipaz molekülü (25)

Lipazlar; esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamlarda kararlı ve aktif olmaları, kofaktör gerektirmemeleri, yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, seçimli olarak spesifik yağ asidi değiştirmeleri, ester bağına spesifik olmaları, substrat seçimlilikleri ve yan ürün oluşumunu önlemeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar (4, 5, 16).

Lipazlar basitçe uzun zincirli açıl gliserollerin hidrolizini katalizleyen karboksil esterazlar olarak da tanımlanırlar.



Şekil 1.4. Lipazların katalitik hareketi (26)

Mikrobiyal lipazların biyoteknolojide kullanılmasının başlıca nedenleri;

- 1) Organik çözücülerde kararlı olmaları

- 2) Kofaktöre ihtiyaç duymamaları
- 3) Geniş bir substrat spesifikliğine sahip olmaları
- 4) Yüksek enantioselektiflik göstermeleridir (24,26).

Lipazlar indükleyicilerin varlığında sentezlenirler. Bunlar arasında buğday kabuğu, pirinç, zeytinyağı, dekstrinler, şeker pancarı sayılabilir (27).

#### 1.4. Lipazların Katalizlediği Tepkimeler

Lipazlar hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizlerler. Transesterleşme tepkimeleri, esterdeki açıl grup değişimi, bir asit ile yapılıyorsa asidoliziz, bir alkol kullanılıyorsa alkoliziz, bir başka ester durumunda interesterleşme ve bir amin kullanılıyorsa aminoliziz adını alır. (28).

##### 1.4.1. Hidroliz

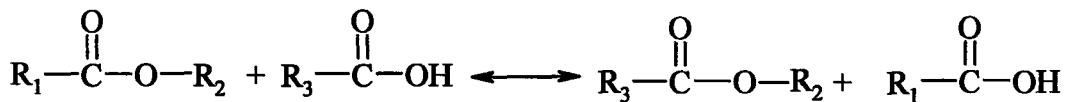


##### 1.4.2. Esterleşme

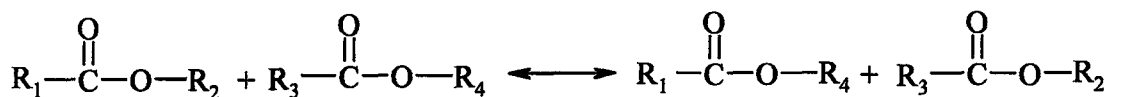


##### 1.4.3. Transesterleşme

###### 1.4.3.1. Asidoliziz

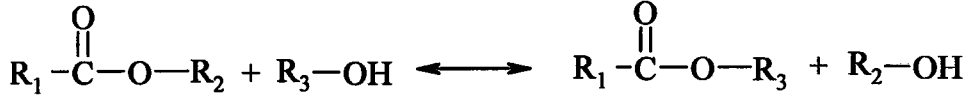


###### 1.4.3.2. İnteresterleşme

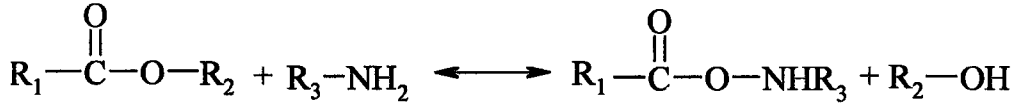




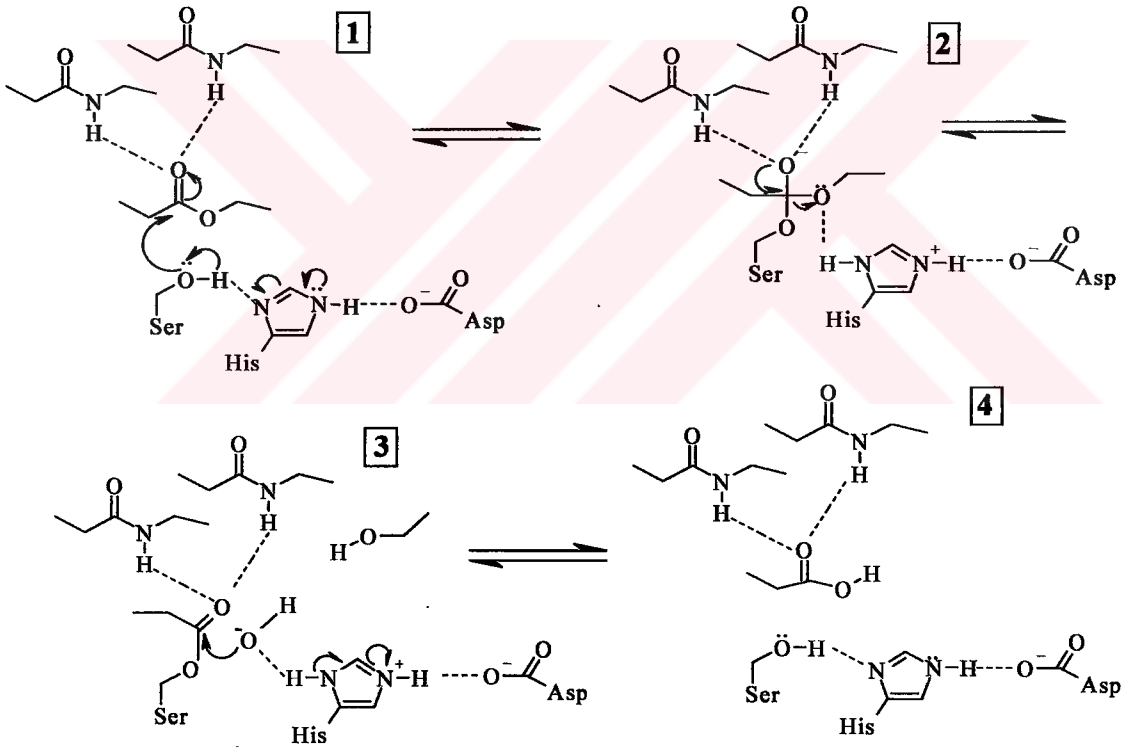
### 1.4.3.3. Alkoliziz



### 1.4.3.4. Aminoliziz



## 1.5. Lipazların Reaksiyon Mekanizması



Şekil 1.6. Lipazın reaksiyon mekanizması (20)

[1] Lipidin bağlanması; nükleofilik serin artığının hidroksil grubundaki oksijen atomu lipid ester bağının karbonil karbon atomuna atak yapar. [2] Tetrahedral bir geçiş ürünü oluşur. Bu oluşan ara ürün peptitte bulunan N-H gruplarının etkisi ile stabilize edilir. Histidin substratın ayrılan alkol bileşenine bir proton verir. [3] Oluşan açıl enzim

(kovalent ara ürün) serin artığıyla esterleşir. Ortamda bulunan su molekülü komşu histidin artığıyla aktivite edilir ve kovalent ara ürünün karbonil karbon atomuna nükleofilik atak olur. [4] Histidin artığı aktif serin artığına bir proton verir. Serin ve açıl arasındaki ester bağı kırılır ve açıl ürün serbest kalır (20).

## 1.6. Lipazların Kullanım Alanları

Lipazların kullanım alanları, şıral bileşenlerin sentezi, ester sentezi, poli doymamış yağ asitlerinin elde edilmesi, biyolojik aktif bileşenlerin sentezi, parfümlerin ve tatlandırıcı esterlerinin üretimi, yapısal lipidlerin sentezi ve organik karbonatların sentezi olarak sınıflandırılabilir (29). Lipazların endüstrideki uygulama alanları Tablo 1.1.'de verilmiştir.

**Tablo1.1.** Lipazların endüstride uygulama alanları (28)

Endüstri	Kullanımı
Süt ürünleri endüstrisi	Peynir lezzetini artırmak Peynir oluşumunu hızlandırmak Tereyağı ve krema lipolizi
Serbest yağ asitleri üretimi	Sabun üretimi Yüksek değerlikli poli doymamış yağ asitleri üretimi
Yapısal lipid üretimi	Ucuz girdi ile kakao yağı üretimi Değerli terapötik ve besinsel özellikte lipidlerin üretimi
Yağ asidi esterleri	Gıda endüstrisi Vaks esterleri üretimi (özel yağlama yağı ve kozmetik)
Pahalı kimyasal ve farmasötik endüstrileri	Optik olarak saf madde üretimi

### 1.6.1. Şıral Bileşiklerin sentezi

Enzimler stereoseçimlilikleri nedeniyle optikçe aktif bileşik sentezinde büyük potansiyele sahiptirler. Lipazlar ile gerçekleştirilen optik ayırma prosesleri tipik olarak, ya bir esterın rasemik karışımının enantiyoseçimli hidrolizi (örneğin iki izomerden sadece bir tanesinin hidrolizinin tercih edilmesi) ya da bir asit/ester rasemik enantiyoseçimli esterleşmesi/transesterleşmesi ile esterden asidin ayrılması şeklinde gerçekleşir. Bu tür çeşitli lipaz katalizli şıral sentez yöntemleri endüstride kullanılır (19).

### 1.6.2. Karbohidrat Ester Sentezi

Düşük toksiklik ve biyolojik olarak bozunabilen yüzey aktif maddeler (surfaktantlar) olan karbohidrat monoesterleri, deterjanlarda ve gıda ürünlerinde (gıda emülsifiye edici olarak) uygulamalara sahiptir. Şekerlerin bölgesel seçimli monoaçıllasyonu, kimyasal olarak gerçekleştirilirse, çeşitli korunma ve korunmama basamaklarını içerir. Oysa lipaz katalizli esterleşme tek bir basamakta bölgesel seçimli monoaçıllasyonu verir. Örneğin, etil glukozidin 6- konumunun lipaz katalizli seçimli açılışını deterjan uygulamalarında kullanılan bir ürün verir. Şekerlerin monosüstitüe akrilik asit türevleri (şeker akrilatları) lipazlar ve proteazlar kullanılarak, şekerler ve akrilik asit arasındaki transesterleşme tepkimeleri ile hazırlanırlar. Bunlar hem hidrojellerin hem de yüksek hidrofilik lineer polimerlerin sentezi için kullanılmaktadırlar. Bu polimerler, hem enzim tutuklama hem de materyallerin kontrollü salınımı, biyomateryaller, süper absorplayıcı polimerleri içeren çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptirler. Şekerlerin disüstitüe akrilik asit türevleri de hazırlanabilir; bunlar hidrojeller için çapraz bağlama maddesi olarak kullanılırlar. Şekerlerin hidrofilik yapısı nedeniyle, çapraz bağlama maddeleri hidrojeller ile uyumludur. Ayrıca, şeker diakrilatları hem kimyasal hem de biyolojik olarak bozunabilmeleri nedeniyle, elde edilen hidrojeller de kimyasal ve biyolojik yolla bozunurlar.

Lipaz katalizli şeker ester sentezi üzerine yapılan araştırmalarda, şekerlerin karboksilik asit ile esterleşen alkol bileşeni gibi görev yaptıkları belirlenmiştir. Bununla birlikte şeker asitlerinin alkollerle esterleşmeleri de mümkündür. Örneğin, glukuronik asit ve askorbik asitten (C vitamini) *Candida antarctica* lipazı ile ester üretilmektedir (19).

### 1.6.3. Poli Doymamış Yağ Asitlerin Elde Edilmesi

Eikosepentaenoik asit, dokosaheksanoik asit ve gama-linolenik asit gibi poli doymamış yağ asitleri (PUFA), temel diyet bileşenleri olarak bilinirler. PUFA' lar, çuhaçiçeği, hodan ve borage, *Borago officinalis*), balık vb gibi yağlarda diğer yağ asitleri ile birlikte bulunurlar. Temel yağ asitlerinin medikal uygulamalarda ve gıda katkılarında kullanılmaları için bu kaynaklardan seçimli olarak ayrılması /zenginleştirilmeleri gerekir. Substrat seçimli lipazlar kullanılarak biyolojik kaynaklarından PUFA' ların saflaştırılması için prosesler geliştirilmektedir. Tipik bir

proses, ya yağın seçimli lipaz katalizli hidrolizini ya da sabunlaştırmanın yağdan yağ asitleri karışımının seçimli esterleşmesini kapsar (19).

#### **1.6.4. Biyolojik Aktif Bileşiklerin Sentezi**

Alkoloidler, terpenoidler, antibiyotikler vb. gibi farklı biyolojik aktif bileşenlerin lipazlar ile sentezlendikleri belirtilmektedir. Örneğin, mezo-konfigürasyonlu siklopentandiol türevleri, lipaz katalizli hidroliz ile ya da esterleşme ile farklı ürünleri üretmek üzere asimetrize olabilirler. Bu enantiyomerik monoasetatların her ikisi de prostaglandinlerin sentezinde kullanılabilirler. (19).

#### **1.6.5. Parfümlerin ve Tatlandırıcı Esterlerin Üretimi**

Tatlandırıcılar için dünya pazarındaki payı, toplam gıda katkıları pazarının 1/4' ünü oluşturur. Doğal kaynaklarından tatlandırıcıların ekstraksiyonunun pahalı ve güç olması nedeniyle, tatlandırıcı lipaz katalizli sentezi giderek önem kazanmaktadır (9,14). Lipazlar kullanılarak sentezlenen kısa zincirli yağ asitlerinin esterleri meyve tatları oluşturmada kullanılırlar. 2-fenil asetat, etil kaproat ve izoamil asetat gibi parfüm esterlerinin susuz ortamda lipaz katalizli sentezi yüksek verimlilikle gerçekleştirilmektedir (19).

#### **1.6.6. Yapısal Lipitlerin Sentezi**

Yapısal lipidler, ya kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) ya da orta zincirli yağ asitlerinin (MCFA) veya bunların her ikisinin uzun zincirli yağ asitleri (LCFA) ile karışımını içeren triaçilgliserollerdir; ve aynı gliserol molekülü üzerinde esterleştirilmeleri tercih edilir. Yapısal lipidler, metabolik koşullar ve hedeflenen spesifik hastalıklar için titizlikle hazırlanabilmeleri nedeniyle insan beslenmesinde büyük bir potansiyel oluştururlar. SCFA' ların MCFA' ya ya da LCFA' lardan birim ağırlık başına daha az kalori sağlamaları nedeniyle, düşük ya da az kalorili yağlar olarak tanımlanabilirler. SCFA ve LCFA' nın kombinasyonu, düşük kalorili bir yağ olan Salatrim' in kimyasal sentezi Nabisco Foods Group (East Hanover, NJ) tarafından yapılmıştır. Salatrim, propiyonik asit, bütirik asit ve stearik asitten oluşur ve gıda endüstrilerinde kullanılır. Yapısal lipidlerin lipaz

katalizli sentezi, trigliserid molekülüne spesifik yağ asitlerinin saklanması uygulamalarında hızlı gelişmeler yaşanmaktadır (19).

### 1.6.7. Organik Karbonatların Sentezi

Organik karbonatlar ( $R_1OC(O)OR_2$ ), suyun çok az olduğu ortamlarda karbonatlar ve alkollerden lipaz katalizli transesterleşme ile sentezlenebilirler. Esterlerin tepkimelerine benzer olarak karbonatların kullanıldığı transesterleşme tepkimelerinin yüksek stereoseçimli oldukları bildirilmektedir (19).

### 1.6.8. Deterjanlar

Hidrolitik lipazların ticari anlamda en önemli kullanım alanlarından biri deterjanlardır. Ev ve endüstride çamaşır ve bulaşık yıkamada kullanılır. Enzimlerin yaklaşık % 30' u deterjan sanayisinde kullanılmaktadır (26).

## 1.7. Ekstraselüler Enzimler

Bakteri kaynaklı enzimler ilaç üretimi, mayalama, yiyeceklerin saklanması gibi biyoteknoloji alanlarında gittikçe önem kazanmaktadır (30).

Bir bakterinin özgül özellikleri (bir karbohidratı kullanma, amino asitleri sentezleyebilme, vb. ) belirli bir enzim ya da enzimleri sentezleme yeteneğine sahip olmasına bağlıdır. Bir bakteri türünü diğer bir türden farklı kılan neden belirli enzimleri sentezleme yeteneklerindeki farktan kaynaklanır. Birçok bakterinin ürettiği ortama salgıladıkları enzimlerin temel fonksiyonları; mikroorganizmaya kullanılabilir besin sağlamak ve enfeksiyon işlemlerinde saldırgan mekanizma olarak iş görmektir (31).

Basiller, kolay üremeleri ve korunmalarının zor olmaması nedeniyle enzim üretiminde kullanılan en uygun bakteri türlerindedir (30).

Bir mikrobiyal ürünün üretilmesinde ürün ve kullanılacak mikroorganizmalarda aranan özellikler Tablo 1.2' de belirtilmiştir (2).

**Tablo.1.2.** Mikrobiyal ürün üretiminde ürün ve kullanılacak mikroorganizmalarda aranan özellikler

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Ürün</b>
Kolay hazırlanabilen basit kültür	Son ürünün toksik olmayışı
Mikroorganizmanın geniş substrat özelliğine sahip olması, başka bir ifadeyle farklı karbon kaynaklarından kolayca faydalanabilmesi	İyi lezzetli oluşu
Kontaminasyon içermemesi	Yüksek oranda sindirilebilmesi
Üremenin süspansiyon şeklinde oluşu	Besin değerinin yüksek olması (amino asit ve yağ kompozisyonu iyi olan biyomas vermesi)
Fermentasyon ortamından kolay ayrılması	Protein ve yağ içeriğinin yüksek kalitede olması
Atılabilir atıklar oluşturması	
Enerji kaynaklarının etkili kullanımı	
Genetik değişime elverişli oluşu	
Yüksek miktarda protein ve yağ içermesi	
Yüksek karbon-biyomass dönüşümü sağlayabilmesi	
İnorganik azot tuzlarını azot kaynağı olarak kullanabilmesi ve bunları hızlı bir şekilde organik azota dönüştürebilmesi	
Derin kültür yöntemiyle üretiminin yapılabilmesi	
Geniş pH aralığında üreyebilmesi	

## 1.8. Fermantasyonun Genel Prensipleri

### 1.9. Katı-Faz Fermantasyonu (Solid State Fermentation; SSF)

SSF mikroorganizmaların susuz veya suyun az bulunduğu katı ortamlarda fermantasyon yapmasıdır. Bununla beraber substrat mikroorganizmaların metabolizması ve büyümesi için yeterli neme sahip olmalıdır. Bu yöntemde özellikle ekonomik önemi olmayan tarımsal sanayi atıkları substrat olarak kullanılarak ekonomik önemi yüksek olan yem, besin, ilaç ve tarıma dayalı endüstriyel ürünlerin üretilmesi düşük maliyetle ve hızlı bir şekilde sağlanabilir (32,33).

Fermantasyon tekniğinin tarihine kısaca bir göz atacak olursak, değişik zamanlarda bazı bileşiklere olan gereksinimin son derece artması, bazı bileşiklerin biyosentez yolu ile üretilmesini zorunlu kılmıştır. Özellikle II. Dünya Savaşı sırasında çok sayıda yaralının enfeksiyondan ölmesi sebebiyle A. FLEMING' in 1928' de keşfettiği penisilinin geniş çapta üretimini zorlamış ve savaş sırasında sakin bir şehir olan Peorial' daki (US) zirai araştırma laboratuvarında toplanan bazı bilim adamlarının büyük gayretleri ile penisilin, *P.chrysogenum* denilen mantar kullanılarak geniş çapta üretilmeye başlanmıştır. Penisilin üretimi SmF(Submerged Fermentation) yöntemiyle geliştirildiği için ve dünya savaşı süresince penisilinin çok önemli olmasından dolayı SmF fermantasyonla bileşik oluşturmada model teknoloji oldu. Araştırmacılar zamanlarını ve dikkatlerini SmF üzerine yoğunlaştırdıkları için muhtemelen bilinmeyen SSF ihmal edildi. Yine de 1950-1960 yıllarında SSF sistemleri üzerine küçük çapta araştırmalar başladı. Steroid dönüşümü mantar kültürleri kullanılarak açıklandığında yavaş ta olsa SSF' e eğilim artarak devam etti. SSF için bir diğer kilometre taşı 1960-1970 yıllarında bu yöntemle mikotoksinlerin üretimi oldu. Tarımsal sanayi atıklarından proteince zenginleştirilmiş büyükbaş hayvan yemi üretimi büyük bir faaliyet olarak açıklanmaktadır. Böylece düşük maliyetli atıkların değerlendirilmesi için SSF tek yol olarak önerildiğinden birçok araştırmacı bu yöntem ile ilgilenmeye başladı (32,34).

Son 15-20 yılda SSF ile ilgili çalışmalar yeniden hız kazanmıştır. Nişastalı maddelerden protein bakımından zenginleştirilmiş hayvan yemi üretimi, orman ve tarımsal atıklardan tek hücre proteini üretimi, manyok kökü ve şekerpancarından etanol üretimi bu çalışmalara örnek olarak verilebilir (35).

### 1.9.1. SSF' in Genel Özellikleri

SSF tekniğinde SmF tekniğinden farklı olarak fazla miktarda sıvı bulunmaz. Fermantasyon ortamı; kullanışsız katı substratı, mikrobik hücreleri, sporları ve fermantasyon süresince ortaya çıkmış bir takım metabolitleri içerir (35).

Teorik olarak su etkinliği baz alındığında SSF için en uygun organizmaların maya ve mantarlar olduğunu söyleyebiliriz. Özellikle mantarlar, ürettikleri enzimlerin ekstraselüler olması ve bu nedenle fermantasyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmelerinin yanında enzim üretme amacıyla mantar kullanımı GRAS (Generally Regarded As Safe) özelliğinden dolayı daha güvenlidir (36, 37).

Bakteri kültürlerinin yüksek miktarda suya ihtiyaç duymaları, bunların SSF için uygun olamayacaklarını düşündürür. Ancak bu durumun aksine yapılan çalışmalar, bakteri kültürleriyle de SSF yöntemlerinden başarılı sonuçlar çıkarılabileceğini kanıtlamıştır (38).

### 1.9.2. SSF' in SmF' e Göre Avantajları

SSF tekniği SmF tekniğine göre birçok avantaja sahiptir. Bunlar:

- ✓ Kompleks makinalar, ekipmanlar ve kontrol sistemleri gerektirmemesi
- ✓ Elde edilen ürün düşük hacim içerisinde dağılmış olduğundan saflaştırılmasının daha kolay ve masrafsız olması
- ✓ Fermantasyon ortamının az suya ihtiyaç duyması
- ✓ Fermantasyon ortamının kolay havalandırılması
- ✓ Bakteriyel kontaminasyon riskinin düşük olması
- ✓ Fermantasyon için az alan gerektirmesi
- ✓ Fermantasyon ortamının kolay hazırlanması
- ✓ Düşük maliyetle yinelenebilir olması
- ✓ Doğrudan sporların kullanılabilmesi
- ✓ Az miktarda atık su oluşumu
- ✓ Çok miktarda ürün eldesi
- ✓ Düşük enerji ihtiyacı olarak sıralanabilir (32,39,40).

SSF' te katabolit represyon minimize edildiğinden, SmF' te çok önemli olan katabolit represyon SSF' te pek önem taşımamaktadır. Mantarlar da ksilanaz üretimi katabolit represyon tarafından düzenlenir. SmF tekniğinde ksiloz, glukoz gibi



indirgenmiş şekerlerin fermantasyon ortamında birikmesinin ksilanaz üretimi üzerinde olumsuz etki yaptığı belirtilmiştir. Bu nedenle SSF yöntemiyle, ksilanaz enzimin de içinde bulunduğu farklı hidrolitik enzimlerin bazı mikroorganizmalar tarafından yüksek miktarlarda üretildiği tanımlanmıştır (41).

SSF tekniği enzim üretiminde harika bir potansiyele sahiptir. Bu teknikte özellikle ilgi çeken nokta ham substratların doğrudan enzim kaynağı olarak kullanılabilmesidir. SmF tekniğiyle enzim üretiminin maliyeti yüksek olduğundan SSF tekniği çok daha cazip bir metod olarak düşünülür (42).

Aynı mikroorganizma kullanılarak SSF ve SmF tekniğiyle enzim üretiminin karşılaştırılması Tablo 1.3' te gösterilmiştir (43).

**Tablo 1.3.** SSF ve SmF' in ürün veriminin karşılaştırılması

Ürün	Mikroorganizma	Karşılaştırılan Parametre	SSF	SmF
Alfa - amilaz	<i>Streptomyces megasporus</i>	Verimlilik (U min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	206	643-804
Selülaz	<i>Bacillus subtilis</i>	Toplam enzim üretimi	12	1
Selülaz	<i>Trichoderma sp.</i>	Maliyet (US \$/ks)	0.2	20
Ligninaz	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aktivite	6	1
Mangan peroksidaz	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aktivite	10	1
Mangan peroksidaz	<i>Panus tigrinus</i>	Toplam enzim aktivitesi	7	1
Poligalakturonaz	<i>Bacillus sp MG - cp-2</i>	Üretim U/g vs U/ml	23.706	360
Tannaz	<i>Rhizopus oryzae</i>	Aktivite (U/l)	32.76	23.86
Ksilinaz	<i>Streptomyces sp. QG-11-3</i>		203	81
Ksilinaz	<i>Penicillium canescens 10 -10c</i>	Katabolik represyon	Yok	Var

Genellikle SmF kıyaslandığında SSF' te ürün veriminin daha yüksek olduğu söylenebilir. Bunun nedeni mikroorganizmanın SSF' te doğal ortamına daha yakın olması ve buna bağlı olarak daha etkin aktivite gösterebilmesidir (32). SSF' te maksimum verime ulaşabilmek için, kullanılan mikroorganizmanın çevre

koşullarını bilmek çok önemlidir (35). SSF yöntemlerinde daha yüksek miktarda ürün elde etmenin yanı sıra, az miktarda yan ürünün oluşması ve ekstre edilen enzimin yüksek kararlılık göstermesi bu tekniğin diğer, önemli avantajlarıdır (44).

Steril edilmiş ve soğumaya bırakılmış katı besin ile ekim materyalini oluşturan besi yeri (SSF) çok özen gösterilmese dahi, kontaminasyon nadiren gerçekleşir. Bu durum sistemin düşük su içeriğinden dolayı mikroorganizmaların gelişmesine imkan vermemesiyle ilgili olabilir. Bunun yanında SSF sistemlerinde yüksek oranlarda ekim yapmak da kontaminasyon problemini çözmede etkilidir.

Bazı SSF yöntemlerinde fermente edilmiş biyolojik materyalin çalkalama ortamına bırakılması, hücrelerin katı substrat yüzeyine yapışmalarına engel olduğundan üretilen enzim miktarında düşüşe neden olur. Bu duruma özellikle *Aspergillus niger* ve bazı *Rhizopus* türlerinde rastlanır. Ancak bakteriyel SSF yöntemlerinde ilk gelişme fazı süresince salgılanan ekzopolisakkaritler yardımıyla bakterilerin katı parçacıklara yapışmaları geri dönüşümsüz olarak gerçekleşir (38).

SSF yöntemlerinin bir başka önemli avantajı fermente edilmiş katı substratın enzim içeriğiyle birlikte kurutulmasına imkan tanınmasıdır. Kuru, fermente edilmiş substrat kurutma öncesi % 5-10' lık etanol ile muamele edilip hücrelerin inaktif olması sağlanırsa enzim aktivitesinde ciddi bir kayıp gözlenmeksizin bir yıl kadar korunup, saklanabilir (38).

SSF' te yaygın olarak kullanılan ve birçok araştırmacı tarafından uygun olarak belirlenen substratların başında pirinç ve buğday kabuğu, darı, mısır, soya fasulyesi, muz kabuğu, manyok, kahve samanı ve patates artıkları gibi tarımsal ürünler gelir (45, 46). SSF' te kullanılan çeşitli substratlar, ürün ve mikroorganizmalar Tablo 1.4' te belirtilmiştir (43).

SSF tekniğini geliştirmeye yönelik değişik parametrelerle yapılan çalışmalarda, her bir parametrenin toplam enzim üretimi üzerinde etkili olduğu gibi organizmanın enzim sentezleyebilme yeteneğini de etkilediği bildirilmiştir (39, 45).

**Tablo 1.4.** SSF' te sıklıkla kullanılan bazı substratlar

Substratlar	Ürün	Mikroorganizma
Badem gevreği	Lipazlar	<i>Rhizopus oligosporus</i>
Elma artıkları ve arpa kabuğu	Boya parçalayıcı	White - rot fungi
Muz kabuğu	Ligninolitik enzimler	<i>Pleurotus sp.</i>
Kakao peltesi	Endopoligalakturonaz	<i>Peacilonyces clavispomis</i>
Manyok ve soya artıkları	Aroma	<i>Rhizopus</i>
Hindistan cevizi kabuğu	Lipazlar	<i>Candida rugosa</i>
Kahve artıkları	Yemelik mantar	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Mısır püskülleri	Selülotik enzimler	<i>Fusarium oxysporum</i>
Linyit	Çözünür özellikte kömür	<i>Trichoderma atroviride</i>
Portakal kabuğu	Pektinaz	<i>Thermoascus aurantiacus</i>
Bazı meyve artıkları	Sitrik asit	<i>Aspergillus niger</i>
Soya hamuru	Proteazlar	<i>Penicillium sp.</i>
Tahiti ihlamuru	Pektinazlar	<i>Aspergillus sp.</i>
Ahududu tohumu karıştırılmış buğday	Neomisin	<i>Streptomyces marinensis</i>

### 1.9.3. SSF' in Kullanım Alanları

SSF, birçok alanda kullanılmaktadır. Tarımsal sanayi atıklarının biyolojik olarak detoksifikasyonu, ekin veya ekin artıklarının besinsel olarak zenginleştirilmesinin biyodönüşümü, biyo-iyileştiricilerin üretimi, bakteriler tarafından ayrıştırılabilen zehirli bileşiklerin ortadan kaldırılması, antibiyotikler, alkaloidler, bitki büyüme faktörleri, enzimler, organik asitler, biyopestisitler ve aroma bileşiklerinin üretilmesi gibi işlemlerin SSF ile yapılması bu yöntemin gelişmesine olanak vermiştir (32).

SSF sadece etanol, tek hücre proteini, mantarlar, aminoasitler gibi ürünlerin üretilmesinde, tarımsal sanayi atıklarının alternatif substratlar olarak kullanılmasında değil aynı zamanda çevre kirliliğini önlemek için iyi bir yöntemdir (46).

SSF yöntemi ile elde edilen bazı mikrobiyal ürünler ve kullanılan mikroorganizmalar Tablo 1.5' te verilmiştir (47).

**Tablo 1.5.** SSF yöntemi ile elde edilen bazı mikrobiyal ürünler

Ürün	Mikroorganizma	Substrat	İşlev
Aflatoxin	<i>A-oryzae, A.panasitus</i>	Buğday, yulaf, pirinç, mısır	Mycotoxin
Bakteriyal Endotoksin	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Hindistan cevizi artığı	İnsektisit
Giberellin	<i>Giberella fujikuori</i>	Buğday kepeği, manyok mısır koçanı	Bitki büyüme hormonu
Penicillin	<i>Penicillium</i>	Şeker kamışı artığı	Antibiyotik
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	Soya fasulyesi artığı	Antibiyotik
Klavulanik asit	<i>S.clavulingerus</i>	Ayçiçeği artığı	$\beta$ -Laktamaz inhibitörü
Proteaz	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Rhizobus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Trichoderma sp.</i>	Buğday kepeği Ayçiçeği artığı Kahve kabuk ve yaprağı Mısır, pirinç, patates artıkları	
Amilaz	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Rhizobus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Saccharomyces sp.</i>	Buğday kepeği, mısır, pirinç Hindistan cevizi artığı Çay artığı	
İnülinaz	<i>Staphylococcus sp.</i>	Hindiba kökü	
Esteraz	<i>Penicillium pinophilum</i>	Buğday samanı	
Glutaminaz	<i>Vibrio costiicola</i>	Buğday kepeği, mısır	

#### 1.9.4. SSF' te Dikkat Edilecek Hususlar

SSF yönteminde dikkat edilmesi gereken birkaç önemli nokta vardır. Bunlar; uygun mikroorganizmanın ve substratın seçimi, yöntem için bazı parametrelerin optimizasyonu, ürünün izolasyonu ve saflaştırılmasıdır. Yöntem için uygun parametreler substratın parçacık büyüklüğü, ortamın nem miktarı, pH, substratın ön işleme, inkübasyon sıcaklığı, çalkalama ve havalandırma, ekim miktarı ve zamanı, N ve P gibi elementlerin ve karbon kaynaklarının eklenmesi olarak sıralanabilir (32,48).

### 1.9.4.1. Mikroorganizma Seçimi

Katı substrat ortamında iyi gelişen çok sayıda mantar türü olduğu bilinmektedir. Mantarların katı substratlar üzerinde iyi geliştiği bilinirken çoğu bakteri türü bu ortamlarda büyüyemez. Bunun sonucu olarak çoğunlukla SSF' in mantarlarla çalışılmalara uygun olduğu düşünülmüştür. Bununla beraber enzim üretiminde bakteri ırklarının (*Bacillus* ırkları) başarıyla kullanıldığını belirten çok sayıda rapor vardır (49).

Maksimum ürün elde etmek için mikroorganizmaların çevresel koşullarını bilmek çok önemlidir. Mikroorganizmalar büyüme ve metabolik aktiviteleri için çeşitli substratlardan besin kaynağı olarak yararlanır. SSF' te mikroorganizmalar ortamdaki mevcut substratları besin maddesi olarak kullanabilmek için gerekli enzimleri salgılar (39,50).

### 1.9.4.2. Substrat Seçimi

SSF' te katı substrat sadece mikrobiyal büyüme için besin kaynağı değil aynı zamanda hücreler için bir tutunma yüzeyini oluşturur (47).

Mikrobiyal ürün elde etmek için iyi bir substrattan beklenenler şunlardır; substratın ekonomik değeri çok düşük olmalıdır veya hiç olmamalıdır, üretim hacmi yüksek olmalı ve devamlılık göstermelidir, kolay elde edilebilmelidir, taşınma ve saklanması kolay yollardan olmalıdır, kullanılacak mikroorganizmaların gereksinimlerine uygun olmalıdır, elde edilecek ürün kolay ve ucuza saflaştırılabilmelidir (34).

### 1.9.4.3. Substratın Parça Büyüklüğü

SSF' te substratın parçacık büyüklüğü kritik bir faktördür. Küçük parçacıklar büyüme için daha fazla yüzey alanı sağlar fakat parçacıklar arası boşluk ve gözenekler azdır. Büyük parçacıklarda gözenekler fazladır ancak büyüme için doymuş yüzey alanı daha azdır. Birbirine zıt bu iki faktör; yüzey alanının azalması-porların artması karşılıklı olarak optimum büyüme ve enzim üretimini belirler (45).

Küçük parçacıklar mikrobiyal solunumu engellediği için büyüme yavaş olur. Parçacıkların büyük olması durumunda mikroorganizmaların substrat yüzeyine bağlanmaları sınırlı olur (47).

#### 1.9.4.4. Nem miktarı

SSF' te nem içeriği başarı için çok önemli bir faktördür. Ortamın nem miktarı katı substratın fiziksel niteliklerini yüksek oranda etkilemektedir. Fazla nem substratın por açıklığını azaltır, düşük oksijen transferine sebep olur ve parça büyüklüğünü değiştirir (40). Düşük nem katı substratın çözünürlüğünü azaltır ve şişmesini engeller (51).

Fermantasyon ortamına minimum oranda suyun eklenmesi sterilizasyon için gereklidir. Fazla oranda su eklenmesi ortamdaki ürünün hidrolizine sebep olur. Ancak yeni hücre meydana gelebilmesi için başlangıçtaki nem oranı önemli bir faktördür (51,52).

Ortamdaki nem miktarı % 12' nin altına düştüğünde bütün biyolojik aktiviteler durur. Bu nedenle SSF' in devam edebilmesi için ortamın nem miktarının bu seviyenin altına inmemesi gerekir. Mantarların düşük su ihtiyacı göstermesi nedeniyle bu yöntemde genellikle mantarlar kullanılır. SSF' de mantarlar kullanıldığında düşük nem içeriği bakteriyel kontaminasyonu minimum düzeye indirir. Bakterilerin yüksek oranda suya ihtiyaç duyması nedeniyle bakterilerin bu yöntem için uygun olmadığı düşünülür (37, 53).

#### 1.9.4.5. İnkübasyon Süresi

İnkübasyon süresi kullanılan kültürün özelliğine ve enzim üretme modeline göre değişir. Enzim aktivitesinin maksimum olarak tespit edildiği noktadan sonra aktivite zamana bağlı olarak gittikçe düşmektedir. Bunun sebebi enzimin fermantasyon ortamındaki diğer bileşiklerle etkileşimi sonucu denatürasyonu veya ayrışması olabilir. Özellikle hidrolitik aktivite gösteren enzimlerin ortama salgılanması bu sonucu doğurabilir. Substratın yapısının zamanla değişmesi de inkübasyon süresi üzerinde etkilidir (45, 54).

#### 1.9.4.6. Sıcaklık ve pH' nın Etkisi

Mikroorganizmaların üremesi ve son ürünün kararlılığı ancak belirli pH ve sıcaklık derecelerinde mümkün olmaktadır. Bu nedenle ortam pH ve sıcaklığının

mikroorganizmanın en iyi üreyebildiği noktalarda bulunacak şekilde ayarlanması gerekir (48).

SSF' te fermentasyon süresince çok miktarda ısı oluşur. Oluşan ısı mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri ile doğru orantılıdır. Katı substrat ısı iletkenliği bakımından zayıf olduğundan sıcaklığın yer değiştirmesi oldukça yavaş olur. Bazen fermentasyon ortamında yüksek ısı birikimi ürünün denatürasyonuna sebep olur. Fermentör içindeki ısı, havalandırma ile fermentör içinde dağıtılabilir veya dışarı atılabilir (32).

#### **1.9.4.7. Ekim Miktarı**

Ekim miktarının hacminin belirli bir seviyeye kadar artırılması genellikle organizmanın büyüme ve büyüme ile ilgili aktivitelerinin iyiye gitmesini sağlar. Ancak belirli bir seviyenin üstündeki ekim miktarı ortamdaki besin maddelerinin sınırlı olmasından dolayı mikrobiyal aktivitenin düşmesine sebep olur. Düşük hacimdeki ekim ise fermentasyon ortamındaki hücre sayısının az olmasına neden olur, bu da mikroorganizmaların büyüme, substrattan yararlanmak için optimum sayıya ulaşma ve dolayısıyla ürün eldesi için daha uzun zamana gereksinim göstermesine neden olur (55).

#### **1.9.4.8. Substratın Otoklavlanma Süresi**

Uzun süreli otoklavlama substratın fiziksel ve kimyasal yapısını bozduğundan ürün veriminin düşmesine neden olur.

Katı substratın 120 °C' de 60 dakikadan fazla otoklavlanması enzim üretimini düşürür. Uzun süreli otoklavlanma nişasta granüllerinin bozunmalarına, viskozitelerinin artmasına, sonuç olarak da büyümenin yavaşlamasına ve enzim üretiminin azalmasına neden olur (45).

#### **1.9.4.9. Fermentörün Çalkalama-Karıştırılma ve Havalandırılması**

SSF' te steril olarak ekim yapıldıktan sonra besiyeri ortamının yeterli derecede karıştırılması işlemi önemli bir faktördür. Karıştırma işlemi mikrobiyal hücre ve

sporların kümeleşmesini önleyerek homojenizasyonu sağlar. Ayrıca ısı ve gaz transferi sağlanır. Yeterli çalkalama biyomas konsantrasyonunun fermentörün bütün noktalarına yayılmasını sağlayarak fermentasyonun zamanla bazı bölgelerde durmamasını sağlar. Mantarlarda yüksek hızla çalkalama işlemi sıklıkla SSF ürün verimini veya sporlaşmayı azaltır. Hızlı çalkalama substrat parçacıklarının dağılmasına ve buna bağlı olarak oluşan misellerin erken fazda dağılarak zarar görmesine sebep olur (56).

Fujian ve ark. çalkalama ve karıştırmanın mantar misellerine ve substrat porlarına verdiği zararı ortadan kaldırmak için çalkalama yerine durağan bir fermentörde periyodik olarak hava değişimini sağlayan bir sistem geliştirmişlerdir. Bu sistemin sadece fermentöre yeterli oksijen sağlaması dışında aynı zamanda mantarların üremesi için uygun ortam oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu yolla sıcaklığın fermentörün her tarafına eşit şekilde dağılmasını sağlamışlardır (57).

#### **1.9.4.10. Katı Besiyerine Katılan Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi**

SSF yönteminde katı substratı desteklemek için ortama katılan azot ve karbon kaynakları ürün eldesinde önemli bir noktayı oluşturur. Bu yöntemde kullanılacak azot ve karbon kaynakları mikroorganizmanın faydalanabileceği formda olmalıdır (52).



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Iızumi ve arkadaşları *Pseudomonas sp.* KWI-56' dan termostabil lipaz enzimini SSF yöntemiyle saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 33 kD olarak tespit etmişlerdir. Çok yüksek termostabiliteye sahip olup 60 °C de 24 saat inkübasyonda % 96 aktivite, 70 °C 3 saat inkübasyonda % 76 aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Optimum sıcaklığının 60 °C olduğu tespit edilmiş, ve enzimi  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  gibi metal iyonlarının inhibe ettiği, izoelektrik noktasının ise 5.0 olduğunu saptamışlardır (58).

Wang ve arkadaşları Yellowstone Ulusal Park alanından elde ettikleri organizmanın büyümesi için optimum sıcaklığı 60-65 °C ve pH' nın 6-9 aralığında bulmuşlardır. Bakteri *Bacillus sp.* olarak karakterize edilmiş ve % 1 zeytinyağı-buğday kepeği büyüme substratı olarak kullanılmıştır. Kısmen saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığı 60 °C ve optimum pH: 9.5 olduğu tespit edilmiştir. 75 °C de 30 dakika inkübasyonda aktivitesinin % 100' ünü koruyan enzimin yarı ömrü 75 °C de 8 saat olarak tespit edilmiştir. 60 °C de 15 saat pH: 5-10.5 aralığında aktivitesinin % 90' nını korumuş olduğu belirtilmiştir. Enzim aktivitesinin hidrojen peroksit ve alkalın proteaz içeren endüstriyel deterjanlarda yüksek olduğu belirlenmiştir (59).

Lin ve arkadaşları *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111' den alkalın lipaz saflaştırıp kısmen karakterize etmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 32 kD ve izoelektrik noktasını 7.3 olarak saptamışlardır. Enzimin pH: 6.0-10.0 aralığında stabilite gösterdiğini saptamışlardır (60).

Kamini ve arkadaşları *Aspergillus niger*'den gingelly yağı kullanarak SSF yöntemi ile lipaz üretmişlerdir. Lipaz aktivitesini 72 saatlik inkübasyon süresi ve optimum şartlar altında  $363.6 \text{ Ug}^{-1}$  olarak elde etmişlerdir. Çeşitli azot kaynakları ve karbohidratların etkisini araştırmışlardır. Enzimin pH: 4.0-10.0 ve 4-50 °C arasında stabil olduğu saptanmıştır. Enzimin aynı zamanda deterjanların varlığında dikkate değer stabilite gösterdiği ve çamaşır yıkamada trigliserit kirlerinin çıkarılmasında etkili olabileceğini belirtmişlerdir (61).

Cordova ve arkadaşları termostabil mantar kültürleri *Rhizomucor pusillus* ve *Rhizopus rhizopodiformis*' le zeytinyağı atıklar ve şeker kamışı posası kullanarak lipaz üretimini çalışmışlardır. Şeker kamışı posası kullanılan ortamda *Rhizomucor pusillus*' un gösterdiği aktivite daha fazla olmasına karşın, % 50 şeker kamışı posası ve

zeytinyağı atıklar karışımında *Rhizopus rhizopodiformis*' le aktivitenin daha fazla olduğunu bulmuşlardır (62).

Essamri ve arkadaşları fungal *Rhizopus oryzae*' den intraseluler lipaz üreten lipaz aktivitesinin optimum şartlarını tanımlamışlardır. Lipazın optimum pH' sının 8.5 optimum sıcaklığının ise 30 °C olduğunu saptamışlardır (63).

Gombert ve arkadaşları *Penicillium restrictum* 'in SSF' te babassu yağını substrat olarak kullanarak lipaz üretimini çalışmışlardır. Nutrient broth, pepton, zeytinyağı, nişasta ve farklı karbon ve azot kaynaklarının etkilerini araştırmışlardır. En yüksek aktiviteyi (30.3 U<sub>g</sub><sup>-1</sup>) 24 saatlik inkübasyonda ve % 2' lik zeytinyağı ile elde etmişlerdir (64).

Oh ve arkadaşları *Staphylococcus haemolyticus* L62' den lipaz enzimini saflaştırıp molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 45 kDa olarak hesaplamışlardır. Optimum sıcaklığı 28 °C, optimum pH' sı 8.5 olarak saptanmış ve enzimin Ca<sup>+2</sup> iyonu varlığında 50 °C nin üzerinde ve pH: 5.0-11.0 aralığında stabil olduğu saptanmıştır. Tribütirin, tripropionin, trimiristin varlığında yüksek aktivite gözlenmiştir ( 65).

Jose ve Kurup *Bacillus pumilus* türünden lipaz üreten saflaştırmışlardır. Optimum pH: 7.0 ve optimum sıcaklığı 40 °C ve inkübasyon zamanı 72 saat olarak saptanmıştır. Glukoz, nişasta ve zeytinyağı gibi karbon kaynaklarının etkisini çalışmışlardır. Glukozu en iyi karbon kaynağı olarak tespit etmişlerdir (66).

Lee ve arkadaşları *Bacillus thermoleovorans* ID-1' den termofilik lipaz izole edip karakterize etmişler. Maksimum aktiviteye 70-75 ° C ve pH: 7' de ulaştığını göstermişlerdir (67).

Akpınar *Oncorhynchus mykiss* karaciğer lipazının bazı kinetik özelliklerini incelemiştir. Karaciğer lipazının pH: 8.0 ve 32 °C de optimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmada lipaz aktivitesi üzerine tek (NaCl, KCl) ve iki değerlikli (CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) metal iyonlarının aktive edici bir etki yaptıkları saptanmıştır. Na-taurodeoksikolat ve Na-deoksikolatın lipaz aktivitelerini inhibe ettiği belirlenmiş ve bir şelatlayıcı ajan olan EDTA' nın ise lipaz aktivitesini, 4 mM derişime kadar etkilemediği 5 mM da ise bir artış meydana getirdiği görülmüştür (24).

Ogino ve arkadaşları kültür ortamında organik çözücüye-toleranslı *Pseudomonas aeruginosa* ST-03' nin salgıladığı lipazı saflaştırmışlar. Lipazın molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 27.1 kDa ve jel filitrasyon ile 36 kDa olarak hesaplamışlardır. En yüksek aktivite triaçil griserollerde trikaproin (C6), serbest yağ asitli metil esterlerde metil oktanoat (C8) ve doğal yağlarda hindistan cevizi yağında elde edilmiştir (68).

Hiol ve arkadaşları hurma meyvesinden *Rhizopus oryzae* olarak isimlendirilen lipolitik özellik gösteren suşlar izole etmişlerdir. Lipolitik enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE ve jel filitrayonu ile 32 kDa olarak hesaplamışlardır. Lipaz aktivitesi için optimum pH' ı 7.5 bulmuşlardır. Lipazın pH: 4.5' ten pH: 7.5' e kadar stabil olduğunu saptamışlardır. Lipaz aktivitesi için optimum sıcaklık 35 °C ve 45 °C' de 30 dakikada aktivitesinin % 65' ini koruduğunu tespit etmişlerdir. Lipolitik enzimi Triton X-100, SDS ve Fe<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+2</sup> gibi metal iyonları inhibe ettiğini saptamışlardır (69).

Imamura ve Kitaura kısmen termofilik *Bacillus sp.* H-257'den monoaçil gliserol lipaz saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Molekül ağırlığını jel filtrasyonu ile 25 kDa, SDS-PAGE ile 24 kDa ve monomerik bir protein olduğunu saptamışlardır. Enzimin izoelektrik noktası 4.66 olarak bulunmuş, aktivite için optimum sıcaklığı 75 °C ve pH: 7.5, maksimum aktiviteyi pH: 6.0-8.0 aralığında saptamışlardır (70).

Sharma ve arkadaşları *Pseudomonas sp.* AG-8' den ekstraselüler lipazı izole etmişlerdir. Optimum aktiviteye 45 °C ve pH: 8.0-8.5' te ulaşıldığını saptamışlardır. Enzim 65 °C de bir saat aktivitesinin % 80' nini korumuştur. Enzimin 5 M NaCl ve 6 M üre de stabil olduğunu, Triton X-100' ün lipaz aktivitesini 2.4 kat kadar artırdığını göstermişlerdir. Ca<sup>+2</sup> iyonlarının enzimi aktive ettiğini Zn<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> aktiviteyi güçlü şekilde inhibe ettiğini ifade etmektedirler (71).

Haq ve arkadaşları SSF yöntemi uygulayarak *Rhizopus oligosporous*' tan lipaz üretmişlerdir. Maximum aktiviteyi badem içeren ortamda 48 Ug<sup>-1</sup> olarak tespit etmişler, optimum sıcaklığı 30 °C ve optimum pH' sını 6.0 olarak saptamışlardır (27).

Arabacı ayçiçeği tohumlarından lipaz enzimi izolasyonu, saflaştırması ve karakterizasyonunu incelemiştir. Lipaz enzimi fraksiyonlu amonyum sülfat çöktürmesi ve takiben diyaliz ile kısmen saflaştırılmıştır. En yüksek enzim aktivitesine sahip olan % 90' lık tuz çözeltisinde lipaz aktivitesi 118 U/mg-protein olarak belirlenmiştir. Proteinlerin molekül ağırlığı SDS-PAGE jel elektroforezi ile yaklaşık 12.5 kD olarak belirlenmiştir. Ayçiçeği lipazının hidrolitik karakterizasyon çalışmasında, substrat spesifitesi ayçiçek yağı, mısırözü yağı, zeytinyağı, tribütirin, triolein kullanılarak araştırılmıştır. Zeytinyağı spesifik substrat olarak belirlenmiş, optimum pH, sıcaklık ve reaksiyon zamanı araştırılmış ve pH: 8.0-9.0, sıcaklık 50-60 °C ve zaman 5 dakika olarak bulunmuştur (72).

Mahadik ve arkadaşları *Aspergillus niger*' den SSF yöntemi uygulayarak asidik lipaz üretmişlerdir. En yüksek aktiviteye SSF' te buğday kepeğini katı substrat ve zeytinyağını lipit substrat olarak kullanılan kombinasyonunda ulaşıldığını bulmuşlardır.

Optimum pH: 2.5 ve optimum sıcaklık 45 °C olarak saptanmıştır. Enzim aşırı asidik pH da (pH: 1.5) aktivitenin % 75' ini korumuştur. 24 saat oda sıcaklığında pH: 2.5' da inkübasyonda bekletilen enzim aktivitesinin % 63' ünü ve 5 saat 70 °C' de orjinal aktivitesinin % 63' ünü koruduğunu belirtmektedirler (73).

Bhushan ve arkadaşları *Candida* BG-55 mayasıyla, substrat olarak pirinç ve buğday kepeğiyle lipaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. 96 saat sonra (pirinç kepeği + % 10 pirinç kepeği yağı + mineral tuz) ortamında aktivitenin (buğday kepeği + % 10 pirinç kepeği yağı + mineral tuz) ortamına göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir (74).

Orhan *Rhizopus arrhizus*' dan katı faz fermantasyonu ile lipaz üretimi için gerekli şartları incelemiştir. Karbon kaynağı olarak sadece ticari önemi olmayan fakat besin değeri fazla olan buğday kabuğu kullanılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi % 5 kepek konsantrasyonu, 0.3 mm kepek boyutu ve pH 6.67' de 751.9  $\mu\text{molL.dak.}^{-1}$  olarak elde edilmiştir. Lipaz üretimine başlangıç mikroorganizma konsantrasyonunun, karıştırma hızının etkisini ve buğday kepeği ortamına çeşitli katkı maddelerinin (mısırözü yağı, glikoz, yeast ekstrakt,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ve  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) etkisi incelenmiştir (75).

Dalmau ve arkadaşları *Candida rugosa* ile lipaz üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemiştir (76).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

CaCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COONa, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na-K Tartarat, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, LiSO<sub>4</sub>, Br<sub>2</sub>, SDS, gum arabik, glukoz, galaktoz, maltoz, nişasta, yeast extract, tribütirin ve nutrient-broth Merck' ten, sukroz, polietilenglikol, p-nitrofenol, p-nitrofenilpalmitat, tris-hidroksimetilaminometan ve Triton X-100 Sigma' dan, üre Panreac' dan, casamino asit, pepton, beef extract, agar ve bacto liver Difco' dan, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ve HCl Riedel-de Haen' dan temin edildi.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre	Pharmacia LKB-Novaspec II
Santrifüj	Sigma Christ 2K 15
Çalkalamalı su banyosu	Julabo SW 23
Etüv	EN 400 Nuve
Sterilizatör	FN 400 Nuve
pH metre	Jenway 3040 Ion Analyser
Elektronik terazi	Sauter, Gec avery
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Mikropipet	Eppendorf
Magnetik karıştırıcı	Stuart
Deep-freze	Sanyo Medical Freezer
Blendir	Waring Commercial Laboratory Blender
Otoklav	

#### 3.3. Besiyerleri

##### 3.3.1. Katı Besiyeri

8 gr Nutrient Broth (NB), 16 gr agar 1000 mL saf suda çözünerek otoklavlandı.

### 3.3.2. Sıvı Besiyeri

8 gr Nutrient Broth (NB) 1000 mL saf suda çözünerek 100 mL'lik erlenlere 50'şer mL konarak otoklavlandı.

### 3.3.3. SSF Besiyeri

Kurutulmuş buğday kepeği, mercimek kabuğu, muz kabuğu, pirinç kabuğu, kavun kabuğu ve karpuz kabuğu blendırdan geçirildikten sonra dört farklı elek (500  $\mu\text{m}$ , 1000  $\mu\text{m}$ , 1500  $\mu\text{m}$ , 2000  $\mu\text{m}$  çaplı) yardımıyla elendi ve 100 °C' de 2 saat kurutuldu. % 30 olacak şekilde 3 gr, 1000  $\mu\text{m}$  parça büyüklüğünde substratlardan tartılarak 100 mL' lik erlenlere bırakıldı. Üzerlerine 10 mL 50 mM Tris-HCl (pH: 7) tamponu bırakılıp otoklavlandı.

## 3.4. Çözeltiler

### 3.4.1. Tampon Çözeltiler

pH: 4; 5; 6: 50 mM Asetat Tamponu

pH: 7; 8 : 50 mM Tris-HCl Tamponu

Tampon çözeltilerin hazırlanması Ek.1 kısmında verilmiştir.

### 3.4.2. Alkali Çözeltisi

Alkali çözeltisinin hazırlanması Ek.2 kısmında verilmiştir.

### 3.4.3. Folin Reaktifi

Folin reaktifinin hazırlanması Ek.3 kısmında verilmiştir.

## 3.5. Mikroorganizma

Çalışmada Çermik Belkıs Hatun termal kaplıcalarından izole edilmiş olan *Bacillus coagulans* biyolojik materyal olarak kullanıldı.

İnokülüm için NB katı besi yerinde 37 °C de 24 saat üretilen bakteriden bir öze dolusu alınarak % 1 zeytinyağı içeren NB sıvı besi yerine transfer edildi ve 37 °C' de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

### **3.6. SSF' te Enzim Üretimi**

SSF yöntemi için % 30 buğday kepeği, pirinç, muz, mercimek, kavun ve karpuz kabuğu katı substrat olarak kullanıldı. Substratlar 50 mM Tris-HCl (pH: 7) ve % 1 zeytinyağı karışımı ile nemlendirildikten sonra 121 °C de 15 dakika otoklavlandı. Soğutulduktan sonra % 15 inokülüm besin yerinden katılarak 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılarak enzim üretimi sağlandı.

### **3.7. Enzim Ekstraksiyonu**

Bakteriyel kültür ortamında bulunan enzimi ekstrakte etmek için besi yeri ortamı iki kez 10 mL 50 mM Tris-HCl (pH: 7) tamponu kullanılarak steril gazlı bezle süzüldü. Küçük substrat partikülleri, hücre ve sporları uzaklaştırmak için +4 °C 15 dakika 10000xg' de santrifüjlendi. Supernatant üzerinden enzim aktivite tayini yapıldı.

### **3.8. Enzim Aktivite Tayini**

Enzim aktivite tayini Imamura yöntemi modifiye edilerek yapıldı (70). 100 µL enzim çözeltilisine 150 µL substrat çözeltilisi (% 1 Triton X-100 içeren 1 mM p-nitrofenilpalmitat, etilalkol içinde) ve 350 µL H<sub>2</sub>O ilave edildikten sonra 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 1 mL % 2 SDS ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 420 nm' de absorbans ölçüldü.

Bir enzim ünitesi deney koşulları altında 1 µmol p-NP oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

### **3.9. Standart Eğrinin Hazırlanması**

Standart olarak p-nitrofenol (p-NP) kullanıldı. Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen (0.1 mg.mL<sup>-1</sup>) p-NP' den bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Enzim aktivite

tainindeki yöntem uygulandı. Okunan absorbans değerlerine karşılık standart eğri çizilerek numunelerin p-NP miktarları eğriden hesaplandı.

### **3.10. Protein Miktar Tayini**

Protein miktar tayini standart olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılarak Lowry yöntemine göre yapıldı (77).

Standart eğriyi çizmek için derişimi bilinen ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) Bovin Serum Albumin' den bir seri standart çözeltiler hazırlandı. Bütün tüpler saf su ile 500  $\mu\text{L}$  hacme tamamlandı. Daha sonra tüplere 5mL alkalın çözeltisi katılarak, 15 dakika 40 °C su banyosunda bırakıldı. Sonra üzerine Folin reaktifinden (1:1) 500  $\mu\text{L}$  katılarak 30 dakika sonra 660 nm'de absorbans değerleri okundu. Okunan değerlere karşılık standart eğri çizildi. Numunelerin protein içerikleri bu eğriden hesaplandı.

### **3.11. Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması**

% 1' lik zeytinyağı içeren NB sıvı besi yerinde 48 saat 37 °C de çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılan bakteri ortamından % 15 alınarak ekim yapıldı. Her 24 saatte bir beş gün süreyle (12; 24; 48; 72; 96; 120) örnek alınarak enzim aktivitesi kontrol edilerek uygun inkübasyon süresi belirlendi.

### **3.12. Sıcaklığın Etkisi**

Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 20; 30; 37; 40; 50 ve 60 °C' lik sıcaklık aralıklarında çalışıldı.

### **3.13. pH' nın Etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine pH etkisini incelemek için 50 mM konsantrasyonlarında asetat tamponu (pH: 4-6) ve Tris-HCl tamponu (pH: 7-8) kullanıldı.



### **3.14. Uygun Yağ ve Uygun Yağ Derişimi Belirlenmesi**

Bu amaçla ayçiçeği yağı, zeytinyağı, mısırözü yağı, soya yağı ve tribütirin kullanılarak uygun yağ, uygun yağın seçiminden sonra yağ oranları (% 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7) değiştirilerek enzim üretildi ve aktivite tayini yapıldı.

### **3.15. Azot Kaynakları Etkisi**

SSF katı besi yeri hazırlandıktan sonra, % 2 oranında hazırlanan azot kaynaklarından,  $NH_4Cl$ ,  $NH_4SO_4$ ,  $NH_4H_2PO_4$  ve  $NH_4NO_3$  besi yerine bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakılan örneklerin her birine, inkübasyon süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

### **3.16. Azot-Karbon Kaynakları Etkisi**

SSF katı besi yeri hazırlandıktan sonra, % 2 oranında hazırlanan azot-karbon kaynaklarından, üre, casamino asit, pepton, beef extract, yeast extract ve bacto liver besi yerine bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakılan örneklerin her birine, inkübasyon süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

### **3.17. Karbon Kaynakları Etkisi**

SSF katı besi yeri hazırlandıktan sonra, % 2 oranında hazırlanan karbon kaynaklarından, nişasta, glukoz, galaktoz, sukroz ve maltoz besi yerine bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakılan örneklerin her birine, inkübasyon süresi sonunda aktivite tayini yapıldı.

### **3.18. Sürfaktant Etkisi**

% 1'lik SDS, Triton X-100, gum arabik, polietilenglikol içeren kepekli ortamlarda bakteri üretildikten sonra üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı.

### 3.19. Metal İyonların Etkisi

Lipaz üretimi üzerine metal iyonları etkisini incelemek için % 0.1' lik  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  içeren kepekli ortamda bakteri üretildikten sonra üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Farklı Substratlarla *Bacillus coagulans*' tan Lipaz Aktivitesi

Buğday kepeği, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu, muz kabuğu, karpuz kabuğu ve kavun kabuğu katı substrat olarak kullanıldı. En yüksek aktivite kavun kabuğu substrat olarak kullanıldığında tespit edildi (Şekil 4.1.).

### 4.2. Lipaz Aktivitesinde İnkübasyon Süresi

Kavun kabuğu substrat olarak seçildikten sonra uygun inkübasyon süresinin tespiti yapıldı. 12; 24; 48; 72; 96 ve 120. saatlerde aktivite tayini yapıldı. En iyi aktivitenin 24. saatte olduğu saptandı (Şekil 4.2.).

### 4.3. Optimum pH

Enzim aktivitesi üzerine pH etkisini incelemek için 50 mM konsantrasyonlarında asetat tamponu (pH: 4-6) ve Tris-HCl tamponu (pH: 7-8) kullanıldı. En yüksek aktivitenin pH: 7' de olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.).

### 4.4. Optimum Sıcaklık

Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 20; 30; 37; 40; 50 ve 60 °C' lik sıcaklık aralıklarında çalışıldı. Yapılan aktivite tayinlerinde optimum sıcaklık için en uygun sıcaklığın 37 °C olduğu saptandı (Şekil 4.4.).

### 4.5. Lipaz Enzimi Üzerine Sürfaktantların Etkisi

% 1'lik SDS, Triton X-100, gum arabik, polietilenglikol içeren kepekli ortamlarda bakteri üretildikten sonra üst sıvıdan aktivite tayini yapıldı. Yapılan çalışmalarda SDS' nin lipaz üretimini arttırdığını ve Triton X-100, gum arabik ve polietilenglikol' un lipaz üretimini azaltmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.5.).

#### **4.6. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Yağların Etkisi**

Lipaz aktivitesi üzerine yağların etkisi için zeytinyağı, mısırözü yağı, soya yağı, ayçiçeği yağı ve tribütirin kullanıldı. En yüksek aktivite zeytin yağı ile  $78.100 \text{ Ug}^{-1}$  olarak tespit edildi (Tablo 4.1.).

#### **4.7. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Zeytin Yağı Konsantrasyonların Etkisi**

Lipaz aktivitesi üzerine % 1; 2; 3; 4; 5; 6 ve 7 olacak şekilde zeytinyağı konsantrasyonları ilave edildi. En yüksek aktivite % 2'lik zeytinyağı konsantrasyonu ile elde edildi ( $140.500 \text{ Ug}^{-1}$ ) ( Tablo 4.2.).

#### **4.8. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi**

SSF besi yerlerine % 2 oranında azot kaynağı olarak  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ve  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ilave edildi.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ' ün enzim aktivitesini arttırdığı görüldü (Tablo 4.3.).

#### **4.9. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Azot-Karbon Kaynakları Etkisi**

SSF besi yerlerine % 2 oranında azot-karbon kaynağı olarak üre, casoamino asit, pepton, beef extract, yeast extract ve bacto liver ilave edildi. Kullanılan azot-karbon kaynaklarının lipaz aktivitesini düşürdüğü görüldü. (Tablo 4.4.).

#### **4.10. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Karbon Kaynakları Etkisi**

SSF besi yerlerine % 2 oranında karbon kaynakları olarak nişasta, glukoz, galaktoz, sukroz ve maltoz ilave edildi. Nişasta ve maltozun enzim aktivitesini arttırdığı belirlendi (Tablo 4.5.).

#### 4.11. Lipaz Aktivitesi Üzerine Farklı Metal İyonların Etkisi

Lipaz üretimi üzerine metal iyonları etkisini incelemek için % 0.1' lik  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  ve  $\text{FeSO}_4$  SSF ortamına ilave edildi.  $\text{Ca}^{+2}$ , nin aktiviteyi % 105 arttırdığı  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$ , nin enzimi sırasıyla % 32 ve % 26 inhibe ettiği tespit edildi (Tablo 4.6.).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

*Bacillus* türü bakteriler iyi lipaz ürettiklerinden dolayı besin endüstrisinde sıkça kullanılmaktadırlar. Patojen olmamaları da bunların seçiminde bir avantaj oluşturmaktadır (66).

Çalışmada *Bacillus coagulans*' tan lipaz üretimi için en uygun substratı belirlemek amacıyla buğday kepeği, muz kabuğu, pirinç kabuğu, mercimek kabuğu, kavun kabuğu ve karpuz kabuğu kullanıldı. Test edilen substratlar içinde elde edilen verilere göre kavun kabuğu en iyi substrat olarak bulundu (Şekil 4.1.).

SSF yöntemi ile, kavun kabuğu kullanılarak lipaz üretimi için yapılan bu çalışma aynı zamanda ilktir. Sonraki çalışmalarda kavun kabuğunu kullanarak SSF' te lipaz üretimi amaçlanmıştır.

*Bacillus coagulans*' tan lipaz enzimi üretilmesi için uygun inkübasyon süresinin bulunması ile ilgili sonuçlar Şekil 4.2.'de görülmektedir. 24. saatte maksimum üretim  $78.100 \text{ Ug}^{-1}$  olarak bulunmuştur. 24. saatin altındaki ve üstündeki sürelerde enzim üretiminde azalma meydana gelmiştir. Bu sonuç fermantasyon ortamında bulunan diğer bileşenlerle enzimin etkileşiminin sonucu olarak lipazın konformasyonel değişikliği ile açıklanabilir. Aynı zamanda ortama salgılanan diğer hidrolitik enzimlerin etkisi sonucu enzim üretiminde azalma görülebilir.

Lipaz üretimi pH, sıcaklık ve ortamın yapısından etkilenir. Enzimlerin protein yapısında olmasından dolayı, enzimin primer ve sekonder yapısını oluşturan amino asitlerin iyonlaşması pH' dan etkilenir. Bu durum enzim aktivitesine de etki eder. pH' da meydana gelen herhangi bir değişiklik proteinin yapısında anlamlı değişikliklere yol açar (71).

Lipaz enzimi pH: 6.0-8.0 arasında aktivite gösterdi. Enzimin optimum pH' sı ise pH: 7 olarak belirlendi (Şekil 4.3.). *Bacillus* türlerinin alkalın koşullar altında lipolitik enzimler ürettiği bulunmuştur (78). Bunlardan *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* daha ilginç özellikler taşımaktadır. Çünkü bu bakteriler daha ekstrem alkalın pH' larda (pH > 9.5) aktivite göstermektedirler ve kararlıdırlar (79). Bu enzimler aynı zamanda termostabildirler.

Sharma ve arkadaşları *Bacillus* sp. RSJ-12' den ürettikler lipaz için maksimum aktiviteyi pH: 8.0-9.0 arasında bulmuşlardır (80). Bu sonuçlar çalışmada kullandığımız, termotoleran bir bakteri olan *Bacillus coagulans*' tan üretilen lipaz enzimi için elde

ettiğimiz sonuçlara terstir. Ancak başka çalışmalarda *B. thermoacetunulatus* ve *B. thermoleovorans*' dan elde edilen sonuçlara benzer olduğunu görüldü ( 67, 81).

Standart deney koşulları altında optimum sıcaklığı belirlemek için lipaz aktivitesi farklı sıcaklıklarda tayin edildi. Enzim için maksimum aktivite 37 °C olarak tayin edildi(Şekil 4.4.). Bu sıcaklığın altında ve üstünde aktivite düştü.

*Bacillus coagulans*' ın SSF kültürleri bazı lipidik bileşikleri içeren besi yeri ortamı kullanılarak çalışıldı. Bunlar; zeytin yağı, ayçiçeği yağı, mısır yağı, soya yağı ve tribütirindir. Bu materyallerin etkileri farklı ve bundan dolayı genelleştirmeleri zor olmasına rağmen bazı mikroorganizmalar tarafından lipaz üretimini artırdığı belirtilmiştir (82, 83, 84, 85). Test edilen yağlar içerisinde enzim üretiminin zeytin yağı içeren SSF ortamında daha fazla olduğu görüldü (Tablo 4.1.). Bu amaçla, kullanılan yağ derişiminin enzim üretimi üzerine bir etkisinin olup olmadığını anlamak için bir sonraki aşamalarda uygun zeytin yağı derişiminin tespitine gidildi. Çalışılan derişimlerde, % 2' lik zeytin yağının enzim aktivitesini anlamlı derecede arttırdığı görüldü (140.500 Ug<sup>-1</sup>). Sonuçlar Tablo 4.2.' de görülmektedir. Bu konsantrasyonun üzerindeki derişimlerde enzim üretiminin, ortamın daha viskoz olmasından dolayı azalabileceği sonucuna varıldı. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında da % 2' lik zeytin yağı içeren SSF ortamı kullanıldı.

Kültür ortamına bazı surfaktantların ilavesi bazı mikroorganizmaların lipolitik enzim sekresyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Bu durum hücre duvarının geçirgenliğinde meydana gelebilecek herhangi bir değişiklikten ya da SDS' nin hücreye bağlı enzimler üzerine etkisi ile açıklanmaktadır. Lipaz/ esteraz gibi enzimlerin üretiminde Tween-80 surfaktant olarak yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen bazı bileşikler de çalışılmıştır (Triton, SDS ve PEG) (83, 86, 87, 88).

Bundan dolayı lipolitik enzim üretimi üzerine surfaktantların etkisini incelemek için kültür ortamına SDS, Triton X-100, PEG ve gum arabik gibi surfaktantlar ilave edildi. Elde edilen veriler sonucu SDS' nin dışında diğer surfaktantlar ile anlamlı bir artış gözlenmedi (Şekil 4.5.).

Organik ve inorganik azot içeren azot kaynakları enzim sentezinde önemli bir rol oynamaktadır. Organik ve inorganik azot kaynaklarının enzim üzerine etkisi Tablo 4.3.' de gösterilmektedir. Kullanılan inorganik azot kaynakları arasında NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>' ün enzim üretimini arttırdığı buna karşı organik azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine bir etkisi olmadığı tespit edildi.

*Aspergillus niger*' den lipaz üretimi üzerine yapılan çalışmalarda farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının SSF ortamına katılmasının lipaz üretimi üzerine bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Ancak kullanılan substratla birlikte ortama beef ekstraktın ilave edilmesinin lipaz üretimini artırdığı tespit edilmiş (61). Verkata' nın yaptığı çalışmada ise *Candida rugosa* kullanılmış ve pirinç kepeği içeren ortama ürenin ilavesi ile lipaz üretiminin arttığı belirtilmiştir (89).

Metal iyonları ve tuzların enzim aktivitesi üzerine önemli bir rolü vardır. Enzimlerin bir kısmı kararlılıklarını ve aktif yapılarını korumak için kalsiyum iyonları gibi metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Bu iyonlar enzim molekülünün üzerinde spesifik bağlanma bölgelerine kuvvetlice bağlanır. Bağlanma bölgesi genellikle aspartil ve glutamil artıklarının negatif yüklü karboksilat yan gruplarından meydana gelir.

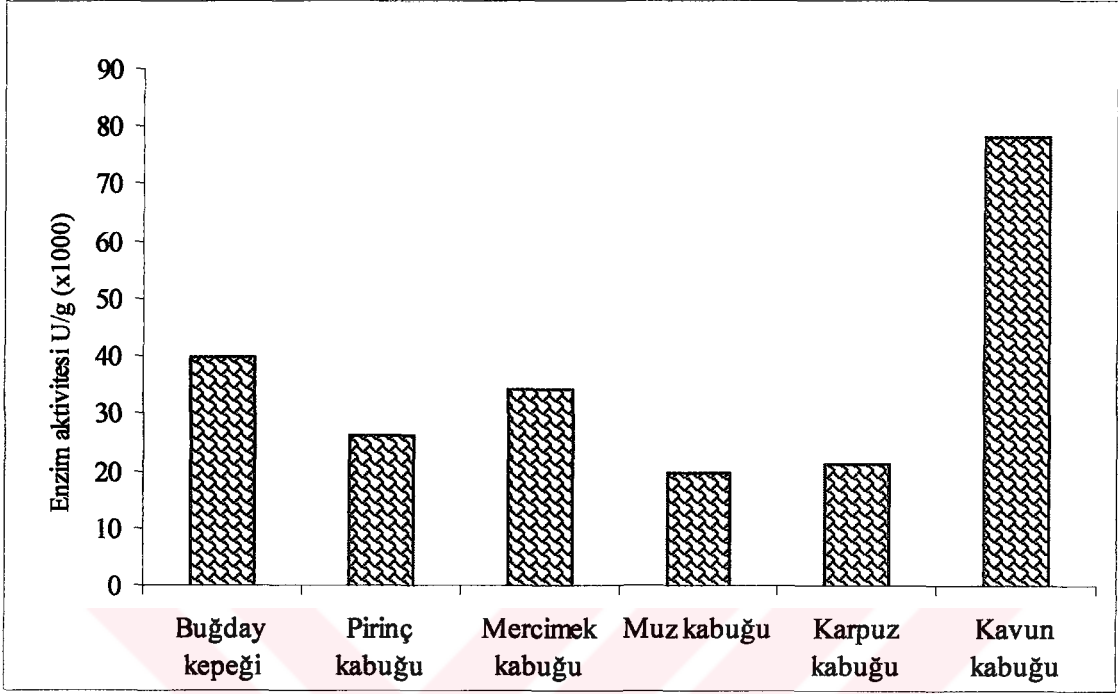
$E + Ca^{+2} \leftrightarrow E-Ca^{+2}$  durumunda bağlanma için ayrışma sabiti düşüktür ( $10^{-3}-10^{-6}$  M). Aynı zamanda güçlü bir bağlanmanın düşük kalsiyum iyonları derişimlerinde gerçekleşebileceği belirtilmektedir. Polipeptit zinciri metal iyonları ile karşılıklı bağlıdır ve bundan dolayı kalsiyum iyonu, kompleksi daha rijit ve daha kararlı kılar. (71, 90). Metal iyonu ile bu şekilde bağlanma disülfit oluşumuna benzetilebilir. Ters bir durumda yani kalsiyum iyonlarının yokluğunda, bağlanma bölgesi oldukça negatif yüklü olacaktır. Bu durumda yüklerin birbirini itmesi, katlanmış proteinin kararlı olmasına engel olacaktır.

Çalışmada metal iyonu olarak ortama % 0.1' lik  $CaCl_2$  katıldığında enzim aktivitesinin % 105 oranında arttığı görüldü.  $Mn^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  iyonlarının ise enzimi sırasıyla % 32 ve % 26 inhibe ettiği tespit edildi (Tablo 4.5.).

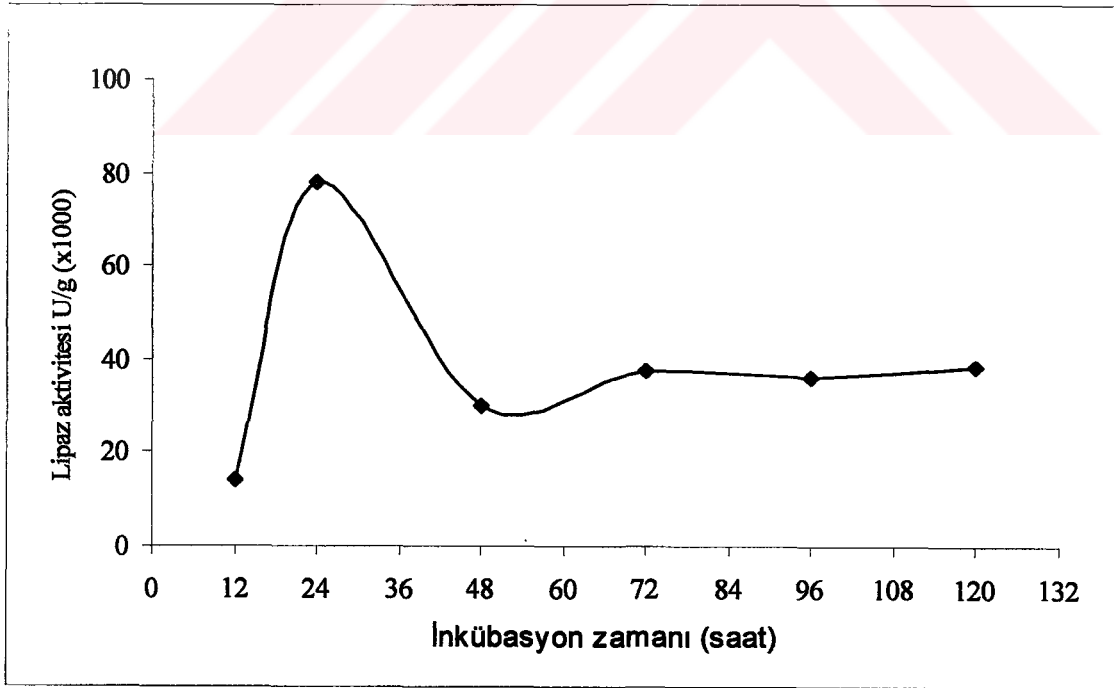
Yapılan çalışmaya göre *Bacillus coagulans*' in kullanılan suşunun kavun kabuğu substrat olarak kullanıldığında SSF ortamından daha fazla lipaz enzimi ürettiği tespit edildi. Hem kısa fermantasyon süresinde (24 saat) hem de kolay bulunabilen ve değerlendirilmeyen atıkların bu şekilde değerlendirilerek lipaz yada başka enzimlerin üretiminde yararlı olabileceğini ümit ediyoruz.



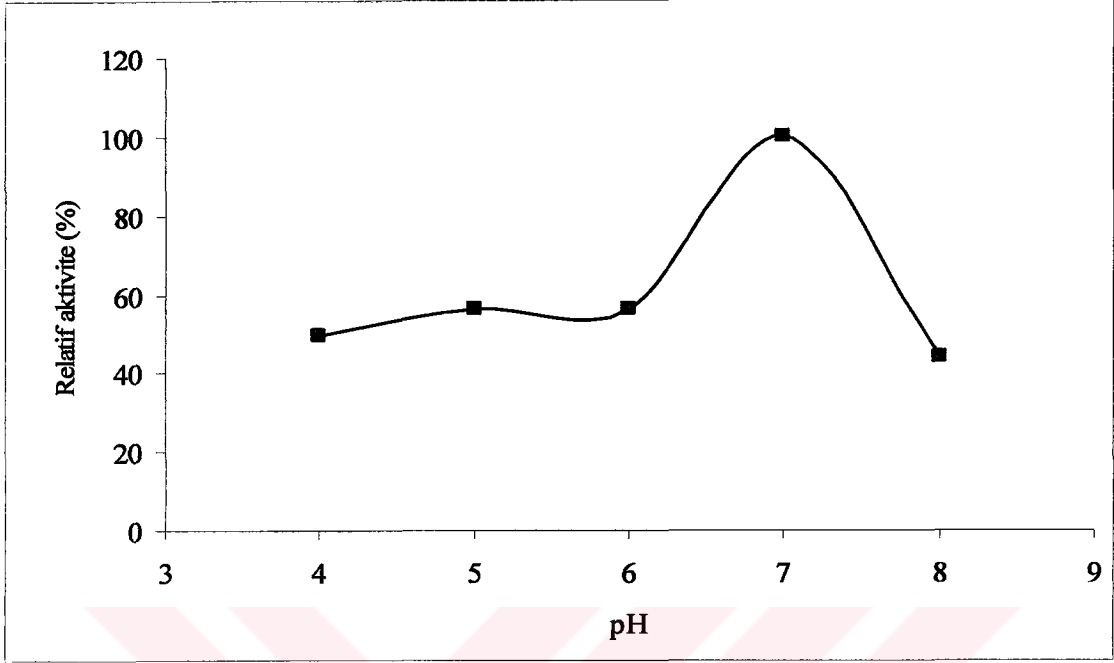
## 6. TABLOLAR, ŞEKİLLER ve RESİMLER



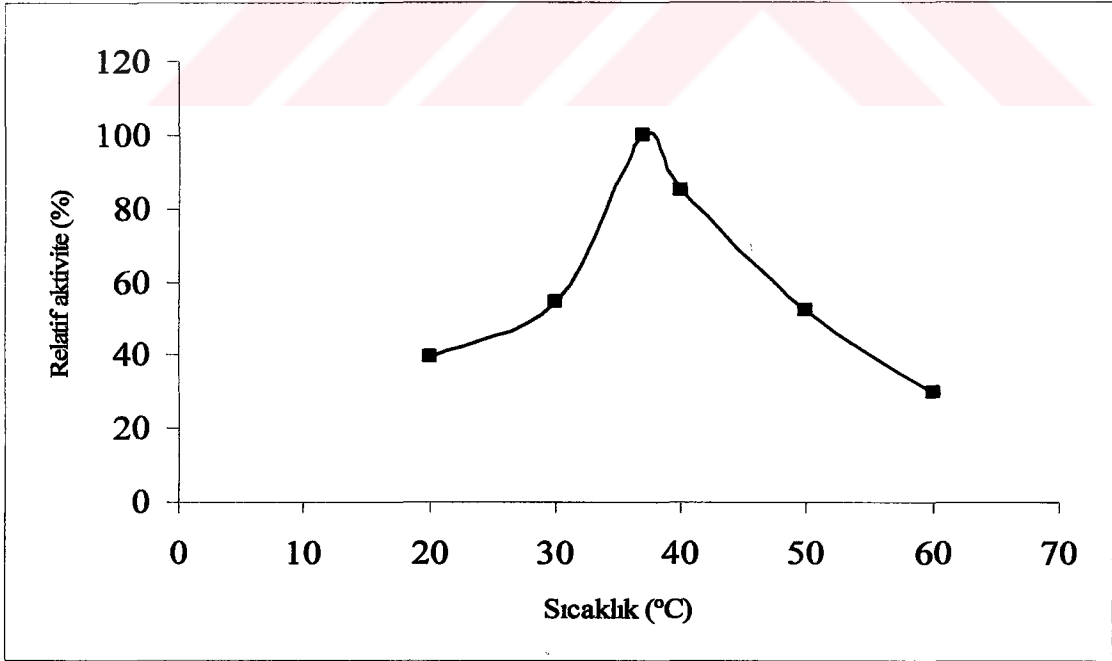
Şekil 4.1. Farklı substratların *Bacillus coagulans* lipaz aktivitesi üzerine etkisi



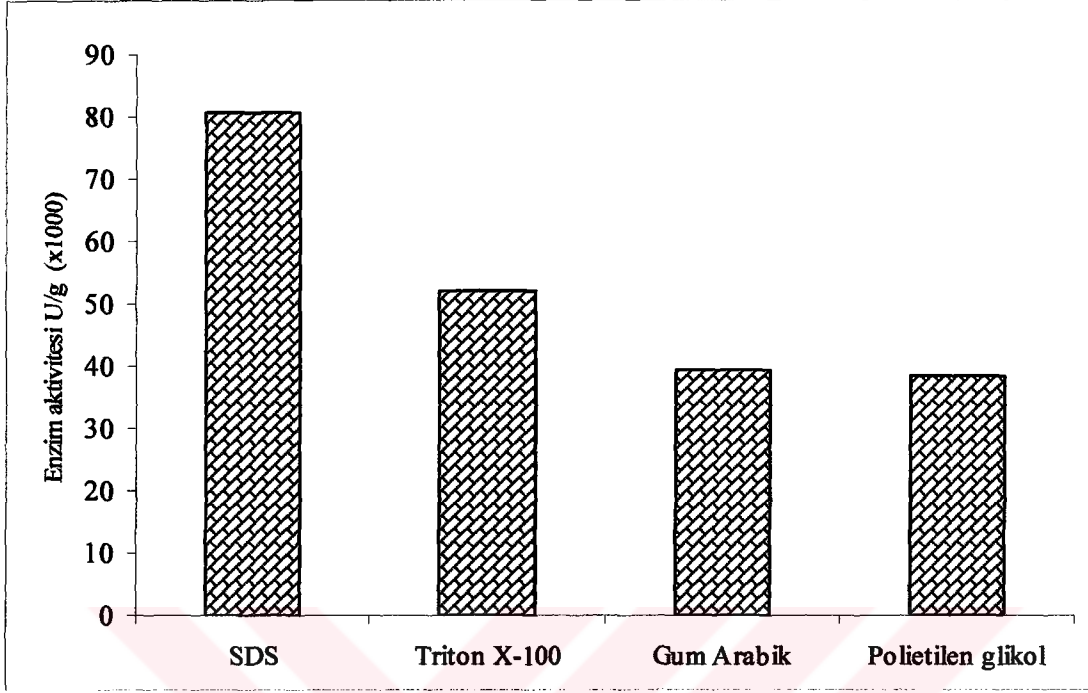
Şekil 4.2. SSF' te uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi



Şekil 4.3. Lipaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi



Şekil 4.4. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



**Şekil 4.5.** Lipaz aktivitesi üzerine surfaktantların etkisi

**Tablo 4.1.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı yağların etkisi

Yağlar (1%)	Lipaz aktivitesi (U/g)
Zeytinyağı	78.100
Soya yağı	45.500
Ayçiçek yağı	52.500
Mısır yağı	19.500
Tribütirin	52.500

**Tablo 4.2.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı zeytin yağı konsantrasyonunun etkisi

Zeytin yağı konsantrasyonu (%)	Lipaz aktivitesi (U/g)
1.0	78.100
2.0	140.500
3.0	97.500
4.0	49.200
5.0	39.500
6.0	33.100
7.0	19.500

**Tablo 4.3.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynakları (%2)	Lipaz aktivitesi (U/g)
NH <sub>4</sub> Cl	131.600
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	109.100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	162.000
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	112.000

**Tablo 4.4.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı organik azot-karbon kaynaklarının etkisi

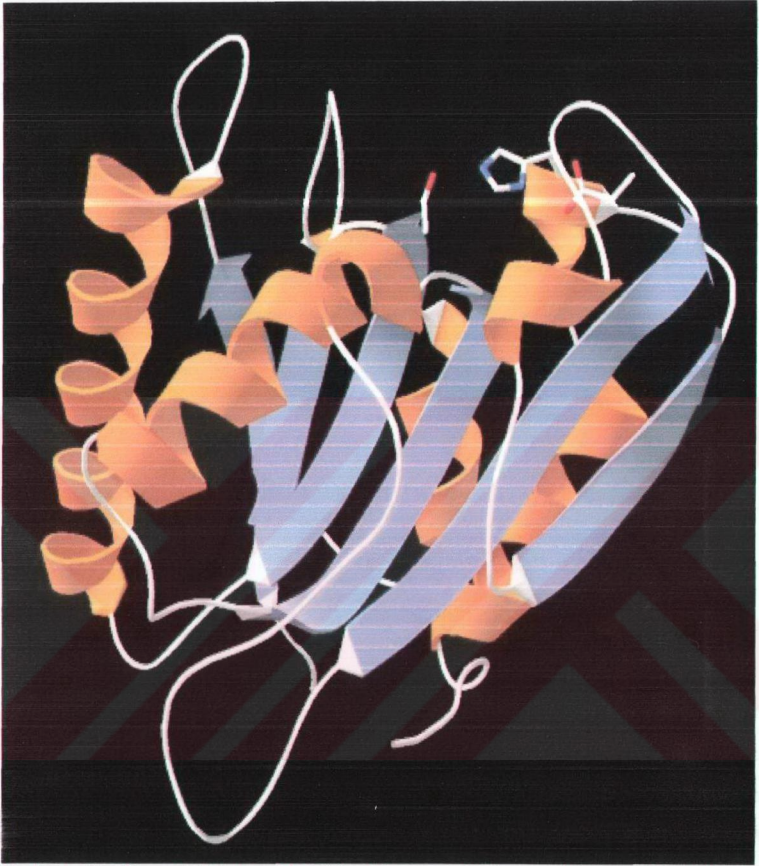
Azot-karbon kaynakları (%2)	Lipaz aktivitesi (U/g)
Üre	69.200
Casoamino acid	99.900
Pepton	81.500
Beef extract	94.000
Yeast extract	97.500
Bacto liver	106.800

**Tablo 4.5.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

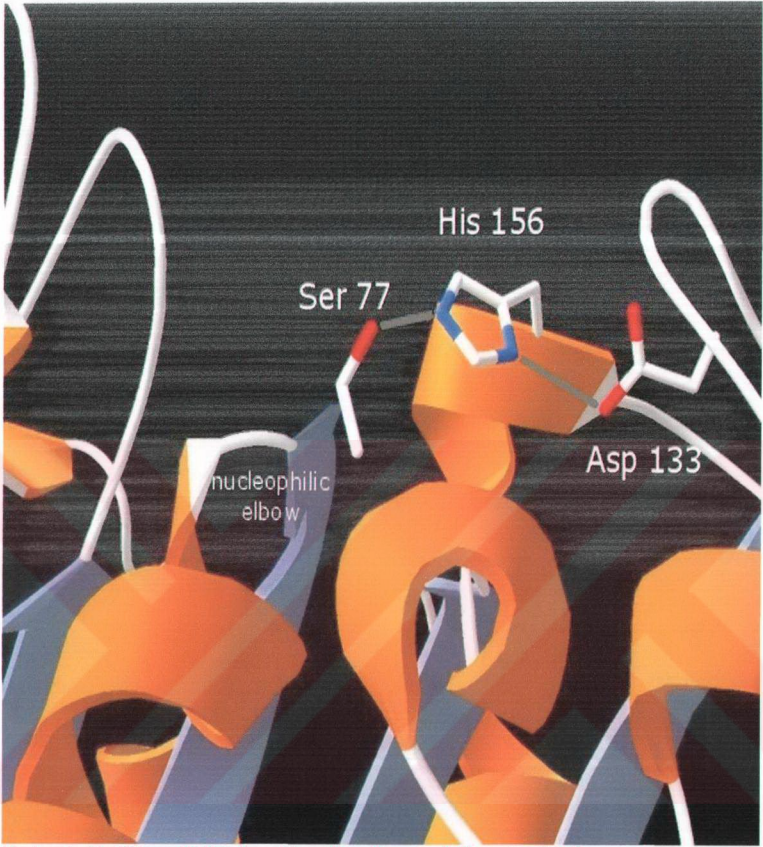
Karbon kaynakları (%2)	Lipaz aktivitesi (U/g)
Sukroz	139.000
Nişasta	149.000
Glukoz	118.800
Galaktoz	123.700
Maltoz	141.700

**Tablo 4.6.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı metal iyonların etkisi

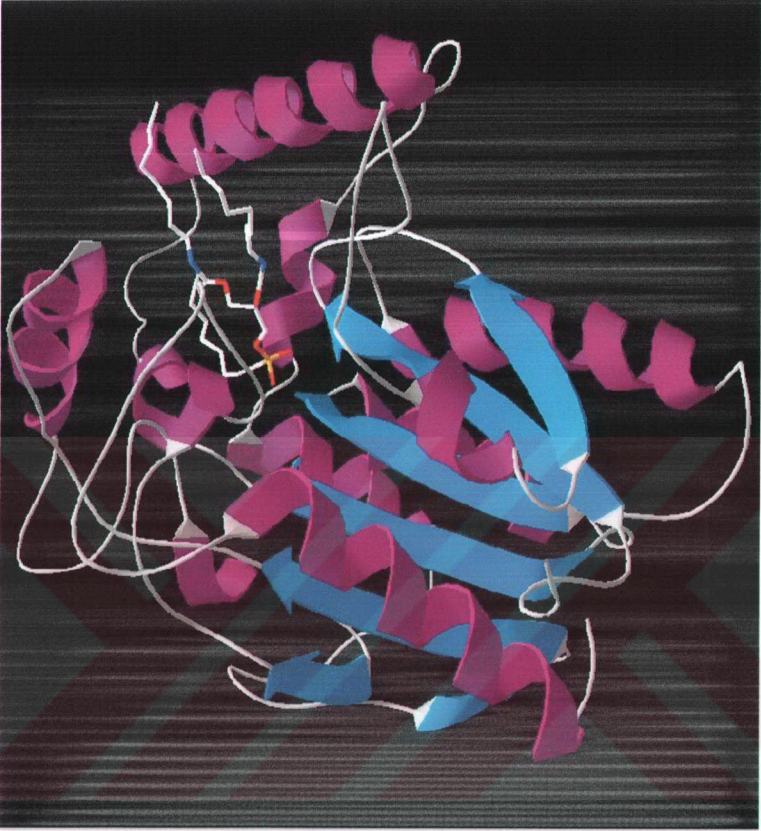
Metal iyonlar	Relatif aktivite ( % kontrol)
Kalsiyum klorür	105
Bakır sülfat	71
Magnezyum sülfat	76
Mangan sülfat	32
Çinko sülfat	71
Demir sülfat	56
Nikel sülfat	26



**Resim.1.** *Bacillus subtilis*' den elde edilen lipazın üçüncül yapısı için önerilen model (91)



**Resim.2.** *Bacillus subtilis*' den elde edilen lipazın aktif merkezi (91)



**Resim.3.** *Pseudomonas aeruginosa*' dan elde edilen lipazın üçüncül yapısı için önerilen model (92)



## 7. EKLER

### Ek.1. Tampon Hazırlanması

#### pH: 4; 50 mM Asetat tamponu:

20.2 mL 50 mM asetik ait ve 4.5 mL 50 mM sodyum asetat saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

#### pH: 5; 50 mM Asetat tamponu:

7.4 mL 50 mM asetik ait ve 17.6 mL 50 mM sodyum asetat saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

#### pH: 6; 50 mM Asetat tamponu:

250  $\mu$ L 50 mM asetik ait ve 4.75 mL 50 mM sodyum asetat saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

#### pH: 7; 50 mM Tris-HCl tamponu:

23.3 mL 50 mM HCl ve 25 mL 50 mM Tris saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

#### pH: 8; 50 mM Tris-HCl tamponu:

14.6 mL 50 mM HCl ve 25 mL 50 mM Tris saf su ile 50 mL' ye tamamlandı.

### Ek.2. Alkali Çözeltisinin Hazırlanması

% 4 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

% 4 Na-K tartarat

% 2 CuSO<sub>4</sub>

100 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> üzerine 1 mL Na-K tartarat, 1 mL CuSO<sub>4</sub> ilave edilir.

### **Ek.3. Folin Reaktifinin Hazırlanması**

500 mL' lik balona 100 gr  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25 gr  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50 mL % 85' lik  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 100 mL derişik HCl ve 700 mL saf su bırakıldıktan sonra çözelti 10 saat süreyle yavaş bir şekilde geri soğutucu altında kaynatılır. 150 gr  $\text{LiSO}_4$ , 50 mL saf su ve birkaç damla  $\text{Br}_2$  ilave edilir. Bromun aşırısını tutmak için soğutucusuz olarak 15 dakika kaynatılıp soğutulur. Hacim daha sonra 1000 mL' ye tamamlanır.



## 8. KAYNAKLAR

1. ÖZÇELİK S., 1998. Genel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Ün. Yayınları.
2. YILDIZ A., 2002. Endüstriyel Mikrobiyoloji. Dicle Ün. yayınları (Ders Notları).
3. MIWA, T.C, 1971. Jojoba oil wax esters and derived fatty acids and alcohols: Gas chromatographic analysis. Jaocs, 48, 259-264.
4. LANGRAD, G., TRIANTAPHYLIDES, C., and BARATTI, J., 1998. Lipase-catalyzed formation of flavour esters. Biotech. Lett., 10 (8), 549-554.
5. ZAIDI, A., GAINER, J.L., and CARTA, G., 1995. Fatty acid esterification using nylon-immobilized lipase, Biotechnology and Bioengineering., 48, 601-605.
6. GLLIES, B., YAMAZAKI, H., and ARMSTRONG, D.W., 1987. Production of flavouresters by immobilized lipase. Biotechnology Letters, 9(10), 709-714.
7. SANCHEZ, N., COTERON, A., MARTINEZ, M., and ARACIL, J., 1992. Kinetic analysis and modeling of the esterification of oleic acid and oleyl alcohol using cobalt chloride as catalyst. Ind. Eng. Chem. Res., 31, 1985-1988.
8. ARACIL, J., MARTINEZ, M., SANCHEZ, N., CORMA, A., 1992. Formation of a jojoba oil analog by esterification of oleic acid using zeolites as catalyst. Zeolites, 12, 233-236.
9. WELSH, F.W., MURAY, W.D., and WILLIAMS, R.E., 1989a. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. Crit. Rev. Biotechnol., 9 (2), 105-169.
10. CARTA, G., GAINER, J.L., and BENTON, A.H., 1991. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. Biotechnology and Bioengineering, 37, 1004-1009.
11. HARI KRISHNA, S., 2002. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. Biotechnology Advances, 20, 239-267.
12. HARI KRISHNA, S. and KARANTH, N.G., 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. Catal Rev., 44, 499-590.
13. ADLERCREUTZ, P., IBORRA, L.J., SCHMIDT, E. and PEDERSON, S., 1994. Application In: Applied Biocatalysis. Eds: J.M.S. Cabral, D. Best, L Boross and J. Tramper, Hoawood Academic Publishers GmbH, Switzerland, 109-156.

14. SCHRERIER, P. 1997. Enzymes and flavour biotechnology. In: Advances in Biotechnological Engineering/Biotechnology, Vol. 55, Ed: T. Scheper, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 51-72.
15. VALLIKIVI IMRE., web sitesi,  
(<http://rd1.hitbox.com/rd?acct=WQ500529CCED92EN0&p=s>)
16. SANTANIELLO, E., FERRABOSCHI, P., and GRISENTI, P., 1993. Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. Enzy. Microb. Technol., 15(2), 367-382.
17. GODDAD, R., BOSLEY, J., and AL-DURI, B., 1999. Immobilised lipase esterification of oleic acid and ethanol in plug flow reactor under supercritical conditions: Investigation of kinetics. CISF 99 fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications, June 13-16, Garda, (Verona), Italy.
18. BORNSCHEUER, U., CAPAWELL, A., WENDEL, V., and SCHEPER, T., 1996. On-line determination of the conversion in a lipase-catalyzed kinetic resolution in supercritical carbon dioxide. Journal of Biotechnolgy, 46, 139-143.
19. KAPUCU, N.C., 2003. Lipaz enziminin katalizlediği bir ester üretiminin süperkritik karbondioksitte incelenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
20. JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B.W., REETZ, M.T., 2000. Bacterial Biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications. Ann. Rev. Microbiol., 53, 315-351.
21. LARGE, K.P., MIRJALILI, N., OSBORNE, M., PEACOCK, L.M., ZORMPAIDIS, V., WALSH, M., CAVANAGH, M.E., LEADLAY, P.F., ISON, A.P., 1999. Lipase activity in Streptomyces. Microb. Technol., 25, 569-575.
22. GAO, X.G., CAO, S.G., ZHANG, K.C., 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. Enzyme Microb. Technol., 27, 78-82.
23. DALMOU, E., MONTESINOS, J.L., LOTTI, M., CASAS, C., 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme Microb. Technol., 26, 657-663.

24. AKPINAR, M.A, 2000. *Oncorhynchus mykiss* Walbau 1972 karaciger lipaz enziminin bazı kinetik özellikleri. Türk J. Biol., 24, 489-502.
25. GHOSH P.K., SAXENA, RX, GUPTA, R., YADAV, RP., and DAVIDSON S., 1996. Microbial lipases:production and applications. Sci. Prog., 79, 2, 119-157.
26. JAEGER, K.E. and REETZ, M.T.,1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. Tibtech, September Vol 16.
27. HAQ, I.U., IDREES, S., RAJOKA, M.I., 2002. Production of lipase by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. Process Biochemistry, 37, 637-641.
28. GUNNLAUGSDOTTIR, R, 1997. Lipase-catalysed lipid modifications in supercritical carbon dioxide. Lund University, Lund, Sweden.
29. GANDHI, N.N., PATIL, N.S., SAWANT, S.B., JOSHI, J.B., WANGIKAR, P.P. and MUKESH, D., 2000. Lipase catalyse esterification. Catal. Rev-Sci. Eng., 42(4), 439-480.
30. KAYA Z., 1996. Subtilizin kinetiği ve etilmetan sülfonatın sporlaşma üzerine etkisi. Dicle Üniv. Fen-Bilimleri Enstitüsü yayınları, Doktora Tezi.
31. UYAR F., 1993. Prokaryotlarda proteolitik aktivite. Dicle Üniv. Fen-Bilimleri Enstitüsü yayınları, Yüksek Lisans Tezi.
32. PANDEY, A., 2003. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal,13,81-84.
33. AIKAT, K., BHATTACHARYA, B.C., 2000. Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. Process Biochemistry, 35,907-914.
34. BEYATLI, Y., 1996 Biyoteknoloji ve Biyoprotein üretimi. KÜKEM Yayınları Ankara.
35. TUNGA, R., BANERJEE, R., BHATTACHARYYA, B.C., 1998. Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. Bioprocess Engineering, 19,187-190
36. GUCHTE M V., KADDE J., VOSSEN J.V., KOK J. and VENEMA G., 1990. Heterologous gene expression in *Loctococcus loctis* subsp. Lactis: synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. Appl. Envir. Microbiol., Sept 2606-2611.

37. GERMANO S., PANDEY A., OSAKU C. A., ROCHA S.N., SOCCOL C. R., 2003. Characterization and stability of proteases. Enzyme Microb. Technol., 32,246-251.
38. LONSANE B. K. and RAMESH M. V., 1990. Production of bacterial thermostable  $\alpha$ -amylase by solid-state fermentation, Adv. Applied Biochemistry, 35,1-56.
39. COURI, S., TERZI, S.C., PINTO, S.G.A.,FREITAS, S.P., AUGUSTO DA COSTA, A.C., 2000. Hydrolytic enzyme production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. Process Biochemistry, 36, 255–261.
40. RAMESH, M.V.AND LONSANE, B.K., 1990. Critical importance of moisture content of the medium in alpha - amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid–state fermentation system. Appl. Microbial Biotechnol 33,501-505.
41. DE SOUZA, D.F., D., DE SOUZA, C.G.M., PERALTA, R.M., 2001. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid- state fermentation. Process Biochemistry, 36,835-838.
42. ELLAIAH, P., ADINARAYANA, K., BHAVANI, Y., PADMAJA, P., SRINIVASULU, B., 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. Process Biochemistry, 38,615-620.
43. HÖLKER U., HÖFER M., LENZ J., 2004. Biotchnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. Appl. Microbial. Biotechnol., 64,175-186.
44. GEORGE S., RAJU V., SUBRAMANIAN T.V. , JAYARAMAN K., 1997. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. Bioprocess Engineering, 16, 381-382.
45. KRISHNA C, CHANDRASEKARAN M., 1996. Banana waste as substrate for  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation. Appl. Microbial Biotechnol., 46, 106-111.

46. SOCCOL C.R., VANDENBERGHE P.S.L., 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal, 13, 205-218.
47. PANDEY, A., SOCCOL, R.S., MITCHELL, D., 2000. New developments in solid state fermentation : I-bioprocesses and products. Process Biochemistry, 35 1153-1169.
48. ELIBOL, M. and ANTONIO, R.M., 2004. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. Process Biochemistry, Article in press.
49. GESSESSE, A., MAMO, G., 1999. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid - state fermentation. Enzyme Microb. Technol., 25, 68-72.
50. UYAR, F., and BAYSAL, Z., 2004. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. Process Biochemistry, 39, 1893-1898
51. MAHADIK, N.D., BASTAWDE, K.B., PUNTAMBEKAR, U.S., KHIRE, J.M., GOKHALE, D.V., 2004. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. Process Biochem., 39, 2031-2034.
52. GAUTAM, P., SABU, A., PANDEY, A., SZAKACS, G., SOCCOL, C.R., 2002. Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene inert solid support. Bioresource Technology, 83, 229-233.
53. BABU, K.R. and SATYANARAYANA, T., 1996. Production of bacterial enzymes by solid state fermentation. Journal of Scientific&Industrial Research, 55, 464-467.
54. BABU, K.R. and SATYANARAYANA, T., 1995.  $\alpha$ -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. Process Biochemistry, 30, 305 – 309.
55. KASHYAP, P., SABU, A., PANDEY, A., 2002. Extra-cellular glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation. Process Biochemistry, 3, 307-312.

56. VAN DE LAGEMAAT, J., PYLE, D.L., 2001. Solid state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. Chemical Engineering Journal, 84, 115-123.
57. FUJIAN, X., HONZHANG, C, ZUOHU, L., 2002. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. Enzyme Microb. Technol., 30, 45-48
58. IIZUMI, T., NAKAMURA, K., FUKASE, T., 1990. T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agric. Biol. Chem., 54, 1253-1258.
59. WANG, Y., SRIVASTAVA, K.C., SHEN, G.J., WANG, H.Y., 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841). Journal of Fermentation and Bioengineering, 5, 433-435.
60. LIN, S.F., CHIOU, C.M., YEH, C.M., TSAI, Y.C., 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. Appl. Environ. Microbiol., 3, 1093-1095.
61. CORDOVA., J., NEMMAOUI, M., ISMAYLI-ALAOUI, M., MORIN, A., ROUSSOS, S., 1998. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic, 5, 75-78.
62. KAMINI, N.R., MALA, J.G.S., PUVANAKRISHNAN, R. 1998. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. Process Biochem., 33, 505-511.
63. ESSAMRI, M., DEYRIS, V., COMEAU, L. 1998. Optimization of lipase product by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. J. of Biotechnol., 60, 97- 103.
64. GOMBERT, A.K., PINTO, A.L., CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G., 1999. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. Process Biochem., 35, 85-99.
65. OH, B.C., KIM, H.K., LEE, J.K., KANG, S.C., OH, T.K., 1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. FEMS Microbial. Lett., 179, 385-392.



66. JOSE, J., KURUP, M., 1999. Purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated thermophilic *B. pumilis*. J. of Experimental Biology., 37, 1231-1217.
67. LEE, D.W., KOH, Y.S., KIM, K.J., KIM, B.Y., CHOI, H.J., KIM, D.S., SUHARTONO, M.T., PYUN, Y.R., 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS Microbiol. Lett., 179, 393-400.
68. OGINO, H., NAKAGAWA, S., SHINYA, K., MUTO, T., FUJIMURA, N., YASUDA, M., ISHIKAWA, H., 2000. Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic tolerant *Pseudomonas aeruginosa* ST-03. Journal of Bioscience and Bioengineering, 5, 451-457.
69. HIOL, A., JONZO, M.D., RUGANI, N., DRUET, D., SARDA, L., COMEAU, L.C., 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. Enzyme Microb. Technol., 26, 421-430.
70. IMAMURA, S.K., KITUARA, S., 2000. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. J. Biochem., 127, 419-425.
71. SHARMA, A.K., TIWARI R.P., HOONDAL, G.S., 2001. Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. J. Basic Microbial., 6, 363-366
72. ARABACI, N., 2001. Ayrıçığı tohumlarından lipaz enzimi izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu, Trakya Üniv. Yüksek lisans tezi.
73. MAHADIK, N.D., BASTAWDE, K.B., PUNTAMBEKAR, U.S., KHIRE, J.M., GOKHALE, D.V., 2004. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. Process Biochem., 39, 2031-2034.
74. BHUSHAN, B., DOSANJHI, N.S., KUMAR, K., HOONDAL, G.S. 1994 Lipase production from an alkalophilic yeast sp. by solid state fermentation. Biotechnology Letters, 8, 841-842.
75. ORHAN, A., 2002. *Rhizopus arrhizus*' dan katı hal fermantasyonu ile lipaz üretimi. Fırat Üniv. Yüksek Lisans Tezi.

76. DALMAU, E., MOSTESINOS, J.L., LOTTI, M., CASAS, C., 2000, Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme Microb. Technol., 26, 657-663.
77. O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
78. LINDSAY, D., BROZEL, V.S., MOSTERT, J.F., VON HOLY, A., 2000. Physiology of dairy associated *Bacillus* sp. over a wide pH range. Int. J. Food Microbiol., 54, 49-62.
79. MOLLER, B., VETTER, R., WILKE, D., FOULLOIS, B., 1991. Alkaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefore and *Bacillus* which produce the lipase. Patent No. WO91/16422.
80. SHARMA, R., SONI, S.K., VOHRA, R.M., GUPTA, L.K., GUPTA, J.K. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. Process Biochem., 37, 1075-1084.
81. RUA, M.L., SCHMIDT-DANNERT, C., WAHL, S., SPARAUER, A. SCHMIS, R.D., 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. Large-scale production, purification and properties; aggregation behaviour and its effect on activity. J.of Biotechnol., 56, 89-102.
82. COSTAS, M., DEVIE, F.J., LONGO, M.A., 2004. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenka orientalis*. Process Biochem., 39, 2109-2114.
83. MAREK, A., BEDNARSKI, W., 1996. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. Biotechnol. Lett., 18, 1155-1160.
84. MAIA, M.M.M., HEASLEY, A., CAMARGO, DE MORAIS, M.M., MELO, E.H.M., MORAIS JR, M.A., LEDINGHAM, W.M., 2001 Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentations. Bioresour. Technol., 76, 23-27
85. CHOI, Y.J., LEE, B.H., 2001. Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL 96. Bioprocess Biosyst. Eng., 24, 59-63.
86. ESPINOSA, E., SANCHEZ, S., FARRAS, A., 1990. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. Biotechnol. Lett., 12, 209-214.
87. MURALIDHAR, R.V., CHIRUMAMILA, R.R., MARCHANT, R., NIGAM, P., 2001. A response surface approach for the comparison of lipase production

- by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. Biochem. Eng. J., 9, 17-23.
88. FERRER, P., SOLA, C., 1992. Lipase production by immobilized *Candida rugosa* cells. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 737-741.
89. VERKATA, R., KUNTHALA, P., LAKSHMANAN, C.M., 1993. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation 2: medium optimization and effect of aeration. Process Biochem., 28, 391-395.
90. GRAY, C.J., 1995. Stabilization of enzymes with soluble additives. In: Gupta, M.N., editor. *Thermostability of Enzymes*. New Delhi; Narosa, 124-143.
91. VAN POUDEROYEN, G., EGGERT, T., JAEGER, K.-E., DIJKSTRA, B. W., 2001. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme J.Mol.Biol., 309 pp. 215.
92. NARDINI, M., LANG, D. A., LIEBETON, K., JAEGER, K.-E., DIJKSTRA, B.W., 2000. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases J.Biol.Chem., 275, 31219.

## 9. TABLO LİSTESİ

**Tablo1.1.** Lipazların endüstride uygulama alanları

**Tablo.1.2.** Mikrobiyal ürün üretiminde kullanılacak mikroorganizmalarda aranan özellikler

**Tablo 1.3.** SSF ve SmF' in ürün veriminin karşılaştırılması

**Tablo 1.4.** SSF'te sıklıkla kullanılan bazı substratlar

**Tablo 1.5.** SSF yöntemi ile elde edilen bazı mikrobiyal ürünler

**Tablo 4.1.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı yağların etkisi

**Tablo 4.2.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı zeytin yağı konsantrasyonunun etkisi

**Tablo 4.3.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi

**Tablo 4.4.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı organik azot-karbon kaynaklarının etkisi

**Tablo 4.5.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi

**Tablo 4.6.** Lipaz aktivitesi üzerine farklı metal iyonların etkisi

## 10. ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1.1.** Enzimlerin sentetik organik kimyada kullanım payı

**Şekil 1.2.** Enzimlerin dünya pazarındaki payları

**Şekil 1.3.** Lipaz molekülü

**Şekil 1.4.** Lipazların katalitik hareketi

**Şekil 1.5.** Lipazların reaksiyon mekanizması

**Şekil 4.1.** Farklı substratların *Bacillus coagulans* lipaz aktivitesi üzerine etkisi

**Şekil 4.2.** SSF' te uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

**Şekil 4.3.** Lipaz aktivitesi üzerine pH' nın etkisi

**Şekil 4.4.** Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

**Şekil 4.5.** Lipaz aktivitesi üzerine surfaktantların etkisi



## 11. RESİM LİSTESİ

**Resim.1.** *Bacillus subtilis*' den elde edilen lipazın üçüncül yapısı için önerilen model

**Resim.2.** *Bacillus subtilis*' den elde edilen lipazın aktif merkezi

**Resim.3.** *Pseudomonas aeruginosa*' dan elde edilen lipazın üçüncül yapısı için önerilen model



## 12. ÖZGEÇMİŞ

30 Mart 1979' da Diyarbakır' da doğdum. İlköğrenimimi Şehit Namık Tümer İlköğretim Okulu' nda, Ortaöğrenimini Yunus Emre Lisesi' nde tamamladım. Eylül 1998' te Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' ne başladım. Haziran 2002 yılında mezun oldum. Ocak 2003-Haziran 2003 tarihleri arasında Diyarbakır' ın Çınar ilçesinde Aşağı Konak İlköğretim Okulu' nda Bilgisayar ve İngilizce Öğretmenliği yaptım. Eylül 2003' te Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım.

