

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BIYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FABRIKA ATIKLARINDAN İZOLE EDİLEN  
*BACILLUS SP.*'DEN AKTİF VE KARARLI  
LİPAZ ÜRETİM KOSULLARININ VE  
ÜRETİLEN ENZİMİN DETERJAN ENDÜSTRİSİNDE  
KULLANIMININ ARASTIRILMASI**

**Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Serpil TAKAÇ**

**Basak MARUL**

**ANKARA**

**2007**

Prof. Dr. Serpil TAKAÇ danışmanlığında, Başak MARUL tarafından hazırlanan bu çalışma 23/01/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU  
(Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi)



Üye : Prof. Dr. Serdar DİKER  
(Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi)



Üye : Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ  
(Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)




Üye : Prof. Dr. Leyla AÇIK  
(Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi)



Üye : Prof. Dr. Serpil TAKAÇ  
(Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Danışman)



Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Nejat AKAR  
Enstitü Müdürü

## **Fabrika Atiklarından İzole Edilen *Bacillus* sp.'den Aktif ve Kararlı Lipaz Üretim Kosullarının ve Üretilen Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanımının Araştırılması**

### **ÖZET**

Lipazlar (E.C.3.1.1.3; trigliserol açilhidrolazlar) enzim sınıflandırmasında hidrolazlar ana sınıfında yer alan, triaçilgliserollerin serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Endüstriyel lipazlar, genellikle hücre dışı lipaz üreten mikroorganizma türlerinden sağlanır. Mikrobiyal lipazlar çoğunlukla sıvı ortamlarda üretilir ve aktiviteleri karbon/azot kaynakları tür ve derisiminden, ortam pH'sından, sıcaklıktan ve metal iyonlarından etkilenir. Bu çalışmada; lipaz kaynağı olarak yağlı fabrika atıkları ile kontamine olmuş topraklardan izole edilen *Bacillus*'lar arasından en yüksek enzim aktivitesi gösteren seçilerek, lipaz üretiminde önem taşıyan ortam koşulları ile ortam bileşenleri parametre olarak incelenmiştir. Karbon kaynakları olarak ülkemizde yaygın olarak kullanılan bitkisel yağların (zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, mısır özü yağı, susam yağı), yağ asitlerinin (triasetin, tribütirin, trioktanoat, tripalmitin, tristearin, triolein), yağ asidi esterlerinin (palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit) ve glukozun farklı derisimlerinin; azot kaynakları olarak ise bazı doğal kaynaklar (mısır unu, soya unu ve buğday unu) ile organik kaynakların (pepton, maya özütü, üre, jelatin) ve ayrıca metal tuzlarının (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, LiCl, CuSO<sub>4</sub>) hücre dışı ve hücre içi lipaz aktivitesi, hücre derisimi ve protein derisimi üzerine etkileri incelenmiştir. Optimal ortam koşullarını belirlemek amacıyla, 6-9 başlangıç pH aralığı ve 37-50 °C sıcaklık aralığında üretimler yapılarak bu değişkenlerin lipaz aktivitesine etkileri incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda *Bacillus* sp.'nin hücre dışı lipaz ürettiği, en uygun karbon kaynağının % 1 (h/h) derisimde susam yağı, en uygun azot kaynağının % 0.5 (a/h) pepton + % 0.3 (a/h) maya özütü ve lipaz üretimini en fazla indükleyen metal tuzunun 1 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> olduğu belirlenmiştir. Optimal ortam koşulları ise pH=7.5 ve T=45 °C olarak bulunmuştur. Üretilen enzim ultrafiltrasyon ve anyon degistirici kromatografi ile kısmi saflastırılmış ve enzime olası deterjan katkılarının etkisi (proteaz, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, EDTA, SDS) belirlenerek elde edilen lipazın endüstriyel kullanım potansiyeli ortaya konulmuştur.

*Anahtar Kelimeler: Deterjan Enzimleri, Enzim Üretimi, Lipaz, Lipaz Aktivitesi*

# **The Investigation of Active and Stable Lipase Production Conditions from *Bacillus* sp. Isolated from Factory Wastewaters and of their Utilization in Detergent Industry**

## **ABSTRACT**

Lipases (E.C.3.1.1.3; triglycerol acylhydrolases), belong to the hydrolase family of enzymes, hydrolyze triacylglycerides into fatty acids and glycerol. Industrial lipases are mainly produced from microorganisms that secrete extracellular lipase. Microbial lipases are usually produced by submerged fermentation and their activities are influenced by the type and concentration of carbon/nitrogen sources, pH, temperature, and metal ions. In the present study, a *Bacillus* strain exhibiting the highest lipase activity was selected amongst isolated from soil contaminated by olive oil plants wastewater; and the effects of medium conditions and components were investigated for a higher enzyme activity. Vegetable oils (olive, sunflower, soybean, corn and sesame oils), triacylglycerides (triacetin, tributyrin, trioctanoat, tripalmitin, tristearin and triolein), fatty acids (palmitic, stearic, oleic and linoleic acids), and glucose were used for their different concentrations as carbon sources. Effects of some natural sources (corn flour, soybean flour and wheat mill bran) in addition to conventional sources (peptone, yeast extract, urea, gelatin) as nitrogen sources; and NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, LiCl, CuSO<sub>4</sub> as salts of metal ions on extracellular and intracellular lipase activities were investigated. The effects of initial pH and temperature on the lipase activity were investigated within 6-9 and 37-50 °C ranges, respectively. Sesame oil (1% v/v) and the combination of peptone (0.5% w/v) + yeast extract (0.3 % w/v) were found to be the best carbon and nitrogen sources, respectively. 1 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> favored the highest lipolytic activity. The optimal temperature and initial pH for lipase activity were 45°C and 7.5, respectively. The lipase produced under optimal conditions partially purified by ultrafiltration and anion exchange chromatography; and its molecular mass found to be about 40 kDa by SDS-PAGE. The purified enzyme was tested for its activity recovery in the presence of protease, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, EDTA and SDS; and its potential utilization in industry was discussed.

*Key Words: Detergent Enzymes, Enzyme Production, Lipase, Lipase Activity*

## TESEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, öneri ve yorumları ile çalışmamı düzenleyen, sistemli bir şekilde çalışmayı öğreten, çalışmamda ve hayatımda yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a çok teşekkür ederim.

Çalışmamı "Çesitli Kaynaklardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Lipaz Enzimi Üretim Kapasitelerinin ve Endüstriyel Kullanım Potansiyellerinin Arastırılması" isimli proje ile destekleyen ve bana Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteobilim Birimi'nde çalışma imkanı sağlayan Biyoteknoloji Enstitüsü Yönetim Kurulu'na;

Çalışmamın çesitli basamaklarında desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e; Doç. Dr. Hilal ÖZDAG'a; çalışmamın bir bütün oluşturmada önem taşıyan analizlerdeki yardımları için Prof Dr. Aziz TEKİN'e ;

Deneyisel çalışmalarıma başladığım ilk zamanlarda yanımda olan, deneyimleri ile beni yönlendiren Yard.Doç. Dr. Sema SALGIN'a; zamanımın büyük bir kısmını geçirdiğim Reaksiyon Mühendisliği Laboratuvarı'nda her konuda yardımını ve desteğini gördüğüm arkadaşım Mehmet BAKKAL'a ve çalışma arkadaşlarıma; Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda çalıştığım dönemde taniyabildiğim, çalışmamın en zorlu dönemlerinde beraber çabaladığım, üzüldüğüm, sevdiğim, desteğini gördüğüm, çalışkanlığını ve azmini örnek aldığım arkadaşım Dr. Duygu ÖZEL DEMIRALP'e yardımları için

çok teşekkür ederim.

Uzakta olsalar da her zaman güvenleri, maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan, her şeyimi borçlu olduğum sevgili annem Birsen MARUL ve babam B. Ali MARUL'a; Ankara'da geçirdiğim yedi yıl boyunca beni yalnız bırakmayan ve ailem olan, hayatımı paylaştığım arkadaşlarıma; her zaman yanımda olan ve varlığı ile sevinçlerimi tamamlayan M.Çağlar ÇINAR'a çok teşekkür ederim.

Basak MARUL

Ankara, Ocak 2007

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TESEKKÜR.....	iii
SEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Lipaz Kullanım Alanları ve Önemi.....	3
2.1.1 Deterjan Endüstrisinde Lipaz.....	4
2.1.2 Gıda Endüstrisinde Lipaz.....	5
2.1.3 Kağıt Sanayinde Lipaz.....	5
2.1.4 Organik Sentezlerde Lipaz Kullanımı.....	5
2.2 Lipaz Yapısı.....	6
2.3 Lipaz Sınıfı.....	7
2.4 Lipaz Kaynakları.....	7
2.5 Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler.....	10
2.5.1. Karbon Kaynakları Etkisi.....	10
2.5.2. Azot Kaynakları Etkisi.....	14
2.5.3 pH Etkisi.....	16
2.5.4 Sıcaklık Etkisi.....	17
2.5.5 Metal İyonları Etkisi.....	17
2.6 Lipaz Enziminin Saflastırılması.....	19
2.6.1 Proteinleri Çözünürlüklerine Göre Ayırıp Saflastırma Yöntemleri.....	19
2.6.2 Proteinleri Elektrik Yüklerine Göre Ayırma ve Saflastırma Yöntemleri.....	20
2.6.3 Proteinleri Molekül Büyüklüklerine Göre Ayırma Yöntemleri.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1 Materyal.....	25
3.2 Yöntem.....	25
3.2.1 Mikroorganizma İzolasyonu.....	25
3.2.2 Mikroorganizma Tanımlanması.....	25

3.2.3 Mikroorganizma Çoğaltma ve Lipaz Üretimi.....	27
3.2.3.1 Kati Agar Ortami.....	27
3.2.3.2 Ön Çoğalma Ortami.....	27
3.2.3.3 Lipaz Üretimi.....	27
3.2.4 Analizler.....	28
3.2.4.1 Spektrofotometrik Yöntemle Lipaz Aktivitesi Ölçümü.....	28
3.2.4.2 Titrimetrik Yöntemle Lipaz Aktivitesi Ölçümü.....	28
3.2.4.3 Proteaz Aktivitesi Ölçümü.....	29
3.2.4.4 Hücre Derisimi Ölçümü.....	29
3.2.4.5 Protein Derisimi Ölçümü.....	29
3.2.4.6 Hücre Parçalanması.....	30
3.2.5 Enzim Saflastırılması.....	30
3.2.6 TCA Çöktürmesi.....	31
3.2.7 SDS-PAGE Analizleri.....	31
4. ARASTIRMA BULGULARI.....	32
4.1 Mikroorganizma İzolasyon ve Tanımlama.....	32
4.2 Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler.....	33
4.2.1 Karbon Kaynakları Etkisi.....	33
4.2.1.1 Bitkisel Yağların Etkisi.....	34
4.2.1.2 Yağ Asidi ve Esterlerinin Etkisi.....	48
4.2.1.3 Karbon Kaynağı Olarak Glukozun Etkisi.....	56
4.2.1.4 Bazı Karbon Kaynaklarının Hücre İçi Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	58
4.2.1.5 Karbon Kaynakları Etkisi İncelenen Ortamlarda Ulaşılan Hücre Derisimleri.....	59
4.2.2 pH Etkisi.....	61
4.2.3 Sıcaklık Etkisi.....	64
4.2.4 Azot Kaynakları Etkisi.....	66
4.2.5 Metal İyonları Etkisi.....	68
4.2.6 Optimal Kosullarda Lipaz Üretimi.....	70
4.3 Lipazın Üretim Ortamından Ayrılması ve Saflastırılması.....	73
4.4 Saflastırılmış Lipazın Deterjan Katkı Maddeleri ile Kullanım Potansiyeli.....	76
5. TARTISMA ve SONUÇ.....	77
5.1 Mikroorganizma İzolasyon ve Tanımlama.....	77

<b>5.2 Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2.1 Karbon Kaynaklari Etkisi.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2.1.1 Bitkisel Yaqlarin Etkisi.....</b>	<b>78</b>
<b>5.2.1.2 Yag Asidi ve Esterlerinin Etkisi.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.1.3 Karbon Kaynagi Olarak Glukozun Etkisi.....</b>	<b>83</b>
<b>5.2.1.4 Bazi Karbon Kaynaklarinin Hücre İçi Lipaz Aktivitesine Etkisi.....</b>	<b>84</b>
<b>5.2.1.5 Karbon Kaynaklari Etkisi Incelenen Ortamlarda Ulasilan Hücre Derisimleri.....</b>	<b>85</b>
<b>5.2.2 pH Etkisi.....</b>	<b>85</b>
<b>5.2.3 Sicaklik Etkisi.....</b>	<b>86</b>
<b>5.2.4 Azot Kaynaklari Etkisi.....</b>	<b>86</b>
<b>5.2.5 Metal Iyonlari Etkisi.....</b>	<b>87</b>
<b>5.2.6 Optimal Kosullarda Lipaz Üretimi.....</b>	<b>88</b>
<b>5.3 Lipazin Üretim Ortamindan Ayrilmasi ve Saflastirmasi.....</b>	<b>89</b>
<b>5.4 Saflastirilmis Lipazin Deterjan Katki Maddeleri ile Kullanım Potansiyeli.....</b>	<b>89</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>91</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>94</b>
<b>EK1.....</b>	<b>95</b>
<b>EK2.....</b>	<b>97</b>
<b>EK3.....</b>	<b>98</b>
<b>EK4.....</b>	<b>99</b>
<b>EK5.....</b>	<b>100</b>
<b>EK6.....</b>	<b>101</b>
<b>EK7.....</b>	<b>102</b>
<b>EK8.....</b>	<b>103</b>
<b>EK9.....</b>	<b>104</b>
<b>EK10.....</b>	<b>105</b>
<b>EK11.....</b>	<b>106</b>
<b>ÖZGEÇMİS.....</b>	<b>107</b>



## SEKILLER DIZINI

Sekil 2.1 <i>Bacillus subtilis</i> lipazi.....	6
Sekil 2.2 SDS-PAGE Jel Elektroforezi ile proteinlerin ayrılması.....	20
Sekil 2.3 İyon degistirici kolon kromatografisi ile proteinlerin ayrılması.....	21
Sekil 2.4 <i>Bacillus sp.</i> RSJ-1 lipazi safliginin SDS-PAGE ile gösterilmesi.....	23
Sekil 3.1 Lipaz üretimi akim semasi.....	28
Sekil 4.1 Gram boyama yapilmis Örnek 8'in mikroskopik görüntüsü.....	33
Sekil 4.2 Çesitli derisimlerde zeytin yaginin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi.....	35
Sekil 4.3 Çesitli derisimlerde zeytin yaginin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi.....	35
Sekil 4.4 Çesitli derisimlerde zeytin yaginin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi.....	36
Sekil 4.5 Çesitli derisimlerde ayçiçek yaginin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi.....	37
Sekil 4.6 Çesitli derisimlerde ayçiçek yaginin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi.....	37
Sekil 4.7 Çesitli derisimlerde ayçiçek yaginin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi.....	38
Sekil 4.8 Çesitli derisimlerde soya yaginin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi.....	39
Sekil 4.9 Çesitli derisimlerde soya yaginin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi.....	39
Sekil 4.10 Çesitli derisimlerde soya yaginin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi.....	40
Sekil 4.11 Çesitli derisimlerde misir özü yaginin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi.....	41
Sekil 4.12 Çesitli derisimlerde misir özü yaginin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi.....	41
Sekil 4.13 Çesitli derisimlerde misir özü yaginin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi.....	42
Sekil 4.14 Çesitli derisimlerde susam yagi (1)'in lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi.....	43
Sekil 4.15 Çesitli derisimlerde susam yagi (1)'in toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi.....	43
Sekil 4.16 Çesitli derisimlerde susam yagi (1)'in spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi.....	44
Sekil 4.17 Çesitli derisimlerde susam yagi (2)'nin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi.....	45
Sekil 4.18 Çesitli derisimlerde susam yagi (2)'nin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi.....	45
Sekil 4.19 Çesitli derisimlerde susam yagi (2)'nin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi.....	46
Sekil 4.20 Karbon kaynagi olarak kullanılan çesitli bitkisel yaglar ile elde edilen en	

yüksek lipaz aktiviteleri (U/ml).....	47
Sekil 4.21 Karbon kaynagi olarak kullanılan çeşitli bitkisel yağlar ile ulaşilan en yüksek spesifik aktiviteler (U/mg).....	47
Sekil 4.22 Çeşitli yağ asidi esterlerinin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi.....	49
Sekil 4.23 Çeşitli yağ asidi esterlerinin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi.....	50
Sekil 4.24 Çeşitli yağ asidi esterlerinin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi.....	50
Sekil 4.25 Yağ asidi esterlerinin maksimum lipaz aktivitelerinin karsilastirilmesi.....	51
Sekil 4.26 Çeşitli yağ asitlerinin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi.....	53
Sekil 4.27 Çeşitli yağ asitlerinin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi.....	53
Sekil 4.28 Çeşitli yağ asitlerinin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi.....	54
Sekil 4.29 Yağ asitlerinin maksimum lipaz aktivitelerinin (U/ml) karsilastirilmesi.....	55
Sekil 4.30 Çeşitli yağ asitleri ve esterleri ile ulaşilan lipaz aktiviteleri (U/ml).....	55
Sekil 4.31 Susam yağı (2)'ye ek olarak ortama eklenen çeşitli derisimlerde glukozun lipaz aktivitesine etkisi (U/ml).....	56
Sekil 4.32 Susam yağı (2)'ye ek olarak ortama eklenen çeşitli derisimlerde glukozun toplam protein derisimine etkisi (mg/ml).....	57
Sekil 4.33 Susam yağı (2)'ye ek olarak ortama eklenen çeşitli derisimlerde glukozun spesifik lipaz aktivitesine etkisi (U/mg).....	57
Sekil 4.34 Çeşitli karbon kaynaklari içeren ortamlarin t=96. saatte hücre içi lipaz aktiviteleri (U/mg Hücre).....	58
Sekil 4.35 Farkli pH degerlerinde lipaz aktivitelerinin zaman ile değisimi.....	61
Sekil 4.36 Farkli pH degerlerinde protein derisimlerinin zaman ile değisimi değisimi.....	62
Sekil 4.37 Farkli pH degerlerinde spesifik lipaz aktivitelerinin zaman ile değisimi.....	62
Sekil 4.38 Farkli pH degerlerinde bağil lipaz aktivitelerinin değisimi.....	63
Sekil 4.39 Farkli spesifik lipaz aktivitelerinin zamana karsi değisimi.....	64
Sekil 4.40 Farkli bağil lipaz aktivitelerinin değisimi.....	65
Sekil 4.41 Çeşitli azot kaynaklari içeren ortamlarda t=24. saatte bağil lipaz aktiviteleri....	67
Sekil 4.42 Çeşitli metal iyonlari içeren ortamlarin t=24. saatte bağil lipaz aktiviteleri.....	69
Sekil 4.43 Optimal kosullarda hücre disi lipaz aktiviteleri.....	70
Sekil 4.44 Optimal kosullarda hücre disi proteaz aktivitesi.....	71
Sekil 4.45 Optimal kosullarda hücre disi protein ve hücre derisimleri.....	71
Sekil 4.46 Optimal kosullarda hücre içi lipaz aktiviteleri.....	72
Sekil 4.47 Anyon değistirici kromatografi sonucu elde edilen kromatogram.....	74
Sekil 4.48 SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre protein dağilimleri.....	75

## ÇİZELGELER DIZINI

Çizelge 2.1 Küresel enzim sektörü gelişimi.....	3
Çizelge 2.2 Novo Nordisk firması tarafından üretilen çeşitli endüstriyel amaçlarla kullanılan lipaz enzimleri.....	4
Çizelge 2.3 Bakteriyel lipaz kaynakları.....	8
Çizelge 2.4 <i>Bacillus coagulans</i> BTS-3 lipaz aktivitesine karbon kaynakları etkisi.....	11
Çizelge 2.5 <i>Bacillus</i> sp. J33 lipaz aktivitesine karbon kaynağı olarak yağ asidi esterleri etkisi.....	12
Çizelge 2.6 <i>Bacillus</i> sp. THL 027 lipaz aktivitesine karbon kaynakları etkisi.....	13
Çizelge 2.7 <i>Bacillus coagulans</i> BTS-3 lipazı üretiminde kullanılan azot kaynakları.....	15
Çizelge 2.8 <i>Bacillus</i> türlerinden lipaz üretimine pH etkisi.....	16
Çizelge 2.9 <i>Bacillus</i> türlerinden lipaz üretimine sıcaklık etkisi.....	17
Çizelge 2.10 Çeşitli iyonların <i>Bacillus coagulans</i> BTS-3 lipazı aktivitesine etkisi.....	18
Çizelge 2.11 Çeşitli iyonların <i>Bacillus</i> sp. BP-6 lipazı aktivitesine etkisi.....	19
Çizelge 2.12 <i>Bacillus pumilus</i> B26 lipazı saflaştırılma basamakları.....	22
Çizelge 2.13 <i>Bacillus</i> sp. RSJ-1 lipazı saflaştırılma basamakları.....	23
Çizelge 2.14 <i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7 lipazı saflaştırılma basamakları.....	24
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan yağ asidi esterlerinin bazı özellikleri.....	48
Çizelge 4.2 Çalışmada kullanılan yağ asitlerinin bazı özellikleri.....	52
Çizelge 4.3 Karbon kaynakları etkisi incelenen ortamlarda ulaşılan hücre derisimleri.....	60
Çizelge 4.4 Ortam başlangıç pH değeri, bağıl aktivite, deney sonunda ulaşılan pH değeri ve hücre derisiminin değişimi.....	63
Çizelge 4.5 Sıcaklıkla bağıl aktivite ve hücre derisiminin değişimi.....	65
Çizelge 4.6 Azot kaynakları etkisi incelenen ortamların bağıl aktivite değerleri, hücre ve protein derisimleri.....	67
Çizelge 4.7 Metal iyonları etkisi incelenen ortamların bağıl aktivite değerleri, hücre ve protein derisimleri.....	69
Çizelge 4.8 Lipaz enzimi saflaştırma basamakları.....	73
Çizelge 4.9 Saflaştırılmış lipaz enzimi aktivitesine deterjan katkıları etkisi.....	75

## SIMGELER DIZINI

BSA	Bovine Serum Albumin
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
N	Karistirma hizi, rpm
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PNF	<i>p</i> -Nitrofenol
PNFP	<i>p</i> -Nitrofenil Palmitat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
TCA	Triklor asetik asit
T	Sicaklik (°C)
t	Kalma süresi, (st)
U	Aktivite
U/ml	Spesifik aktivite
?	Dalga boyu (nm)
e	Molar absorptivite katsayisi (L/mol/cm)

## 1. GIRIS

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

Endüstriyel enzimlerin yaklaşık % 75'i hidrolitik amaçlı kullanılır. Birçok lipaz esterleşme, transesterleşme, peptit sentezi gibi reaksiyonları ve bölge seçimli, stereoseçimli dönüşümleri katalizlemekte kullanılır. Bunlara ek olarak sulu ve organik ortamlardaki biyodönüşümlerde, rasemik asit ve alkollerin çözünürlüğünde, bölge seçimli açilemelerde, ester sentezinde lipaz kullanımı mevcuttur. Birçok tepkimeyi katalizleyebilme yetenekleri ile lipazlar deterjan, gıda, kâğıt ve ilaç sanayilerinde geniş kullanıma sahiptirler.

Lipolitik enzimler, hidrofilik ve lipofilik yüzeyler arasında etkindir ve reaksiyon karışımındaki organik çözünenleri de tolere eder. Enzim, suyla karışmayan trigliseritlerin su-akışkan ara yüzeylerinde hidrolizini katalizler. Suyun olmadığı ya da çok az miktarda olduğu durumlarda reaksiyon esterleşme ya da transesterleşme lehinde olur. Fazla miktarda su bulunması durumunda ise hidroliz lehine döner.

Lipazlar kullandıkları substratların fazla olması, ekstrem koşullarda (sıcaklık, pH, organik çözücüler gibi) kararlı yapılarını koruyabilmeleri gibi başlıca nedenlerle en önemli biyokatalizörler olarak varsayılır. Son zamanlarda lipazların üç boyutlu yapılarının keşfedilmesi ile yapı/görev ilişkileri de aydınlatılmıştır. Lipazların yeni alanlarda da biyokatalizör olarak kullanımında olağanüstü artış olacağı düşünülmektedir. Son on yıl içerisinde özellikle organik sentezler başta olmak üzere lipazlar, proteaz ve amilazlar kadar önem kazanmıştır.

Biyolojik olarak aktif olan enzimler herhangi bir canlı organizmadan elde edilebilirler. Endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir çoğunluğu mantar ve maya, % 13'ü bakteri, % 4'ü bitki ve % 8'i hayvan kaynaklıdır. Günümüzde enzim üretiminde mikrobiyal kaynaklar, mikrobiyal olmayanlara tercih edilmektedir. Endüstriyel lipazlar, genellikle hücre dışı lipaz üreten mikroorganizma türlerinden sağlanır. Mikrobiyal lipazlar çoğunlukla sıvı ortamlarda üretilir ve karbon/azot kaynakları türü ve derisiminden, ortam pH'sından, sıcaklıktan ve metal iyonlarının varlığından etkilenir.

Ticari anlamda ilk lipaz üretimi, 1994 yılında Novo Nordisk firması tarafından üretilen *Thermomyces lanuginosus* (fungi) orijinli *Aspergillus oryzae*'e ifade edilmiş ilk rekombinant lipaz (Lipolase) dir. Ülkemizde endüstriyel olarak lipaz üretiminin henüz gerçekleştirilmemesi, atık maddelerden izole edilmiş mikrobiyal kaynaklardan lipaz üretiminin yapılmaması ve ayrıca lipaz üretiminde kaynak olarak kullanılmak üzere ülkemizde izole edilmiş bir mikroorganizmanın (*Bacillus* sp.) literatürde henüz yayımlanmamış olması yönleri ile bu çalışma önem taşımaktadır.

Bu yüksek lisans çalışmasında lipaz kaynağı olarak bakteriyel sınıflandırmada *Bacillaceae* familyasında bulunan *Bacillus* sp. türü mikroorganizmalar kullanılmıştır. Yağlı fabrika atıkları ile kontamine olmuş topraklardan izole edilen *Bacillus*'lar arasından en yüksek enzim aktivitesi gösteren seçilerek, lipaz üretiminde önem taşıyan ortam koşulları ve ortam bileşenlerinin etkisi incelenmiştir. Ortam bileşenleri olarak; karbon kaynakları için çeşitli bitkisel yağların, yağ asitlerinin ve yağ asidi esterlerinin farklı derisimlerinin etkisi, azot kaynakları olarak doğal kaynaklar ile organik azot kaynaklarının ve ayrıca metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Optimal ortam koşullarını belirlemek amacıyla çeşitli pH ve sıcaklıklarda üretim yapılarak lipaz aktivitesine etkileri incelenmiştir. Tüm koşullar belirlendikten sonra üretilen enzim kısmi saflaştırılmış ve saf enzime olası deterjan katkılarının etkisi belirlenerek elde edilen lipazın ticari kullanım potansiyeli ortaya konulmuştur.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Lipaz Kullanım Alanları ve Önemi

Günümüzde yaklaşık 4000 kadar enzim bilinmektedir ve bunların 200 kadarı ticari amaçlı kullanılmaktadır. 1960'lara kadar enzimlerin toplam yıllık satışı birkaç milyon Dolar iken bu pazar olağanüstü şekilde büyümüştür (Çizelge 2.1). Bu büyük gelişmenin nedeni biyokimyasal üretimlerin anlaşılmaması, fermantasyon yöntemleri gelişimi ve satın alınabilir enzim ürünlerinin sayısının artmasıdır. Bunlarla beraber enzimlerin kullanıldığı yöntemlerin geliştirilmesi ile enzimlerin katalizlediği çeşitli reaksiyonlar kullanılmaya başlanmış ve böylece enzimlerin ticari kullanımı artmıştır (Sharma vd. 2001).

Çizelge 2.1 Küresel Enzim Sektörü Gelişimi (milyon \$) (Hasan vd. 2006)

	2002	2003	2004	2009
Endüstriyel Enzimler	978.2	1009.2	1040.0	1222.0
Gıda Enzimleri	701.0	720.0	740.0	863.0
Hayvan Yem Enzimleri	210.8	215.6	220.0	267.0
Toplam	1890.0	1945.0	2000.0	2352.0

Dünyada enzim talepleri 12 büyük üretici ve 400 kadar üretici küçük firma tarafından karşılanmaktadır. Toplam üretimin yaklaşık % 60'i Avrupa ülkelerinden sağlanmaktadır. Endüstriyel enzimlerin yaklaşık % 75'i hidrolitik amaçlı (lipazları kapsayan grup) kullanılır. Lipazlar kolay elde edilir olmaları nedeniyle fizyolojik öneme ve endüstriyel potansiyele sahiptir. Ökaryotlarda lipazlar yağ sindirimi, yağ emilimi, yağ yenilenmesi ve lipoprotein metabolizmasını içeren yağ metabolizmasının çeşitli basamaklarında görev alırlar. Bitkilerde de enerji deposu olarak kullanılan dokularda lipazlar bulunur. Lipaz çalışmaları yapısal tanımlama, çalışma mekanizmalarının aydınlatılması, enzim kinetiklerinin belirlenmesi, lipaz gen sırasının belirlenmesi ve çoğaltılması ile performansın genel olarak tanımlanması üzerine yoğunlaşmıştır. Tüm bu çalışmalar sonucu enzimin ticari kullanımı geliştirilmektedir. Ticari kullanımlı lipazlar, genellikle hücre dışı lipaz üreten mikroorganizma türlerinden elde edilir. Birçok lipaz esterleşme, transesterleşme, peptid sentezi gibi reaksiyonları katalizler. Gelecekte lipazların da proteazlar ya da karbohidrazlar kadar endüstriyel öneme sahip olması tahmin edilmektedir.

Hidrolitik lipazların baslıca ticari kullanım alanı deterjanlardır. Toplam lipaz satışının % 32'si deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Yaklaşık olarak 13 milyar ton deterjana 1000 ton kadar lipaz eklemesi yapılmaktadır. Az miktarda lipaz gıda, kâğıt, süt, kozmetik, pestisit, insektisit, ilaç ve çeşitli kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır (Sharma vd. 2001).

Ticari anlamda ilk lipaz üretimi, 1994 yılında Novo Nordisk firması tarafından üretilen *Thermomyces lanuginosus* (fungi) orijinli *Aspergillus oryzae*'e ifade edilmiş ilk rekombinant lipaz (Lipolase)'dir. Hemen ardından 1995'de Genencor International tarafından iki bakteriyel lipaz daha üretilmiştir; *Pseudomonas mendocina*'dan 'Lumafast' ve *Pseudomonas alcaligenes*'den 'Lipomax'. Çizelge 2.2'de ilk ticari lipaz üretimi yapan Novo Nordisk firmasının farklı alanlarda kullanılan ürünleri görülmektedir (Sharma vd. 2001).

Çizelge 2.2 Novo Nordisk firması tarafından üretilen çeşitli endüstriyel amaçlarla kullanılan lipaz enzimleri (AU-KBC Research Centre) (Sharma vd. 2001)

Ürün Adı	Kullanım Alanı
Lipopan®	Maya Endüstrisi
Lipozyme®	Yağ Ürünleri
Novozym® 27007	Nisasta Ürünleri
Palatase™	Süt Ürünleri
Clear-Lens™ LIPO	Kisisel Bakım
GreaseX	Deri Sanayi
Lipolase™	Deterjan Endüstrisi
LipoPrime®	Deterjan Endüstrisi
NovoCor™ AD	Deri Sanayi
Novozym® 735	Tekstil Endüstrisi
Novozym® 871	Hayvan Yemi

### 2.1.1 Deterjan Endüstrisinde Lipaz

Endüstriyel lipaz kullanımları içerisinde en önemli pay kuskusuz hidrolitik lipazlara aittir. Son zamanlarda, farklı kullanım amaçlı (endüstriyel kullanım, ev içi kullanımlar, çamaşır, bulaşık, toz temizleyiciler vb.) deterjanlarda temizleme gücü artırımı hedeflenerek enzim katkıları kullanılmaya başlanmıştır. Deterjanlara ilave edilen baslıca enzimler; proteazlar,



amilazlar, selülozlar ve lipazlardır. Yağları hidrolize etme yetenekleri ile lipazlar deterjanların önemli katkı maddelerinden biridir. Deterjanda kullanılacak lipazlar bazı özellikleri içermelidirler: (1) düşük substrat özgülüğü (çesitli bileşimlerdeki yağları hidroliz edebilmeli) (2) yıpratıcı yıkama kosullarına karşı direnç gösterebilme (pH 10-11 ve 30-60 °C) (3) sürfaktanlara ve diğer enzimlerin (proteaz) hasarlarına karşı direnebilme yeteneği (Sharma vd. 2001).

### **2.1.2 Gıda Endüstrisinde Lipaz**

Kati ve sivi yağlar gıdaların önemli bileşenlerindedir. Yağ asitlerinin gliserol zincirindeki konumları, yağ asidi zincirlerinin uzunluğu, doymamış yağ asidi derecesi, trigliseritlerin fiziksel özellikleri gıdanın besleyiciliği ve lezzetini etkileyen faktörlerdir. Lipazlar, lipidlerin bu özelliklerine etkiyerek onları modifiye ederler. Gliseritlerde, yağ asitleri zincirlerinde biçim veya içerik yönünden değişiklik yaparlar. Bu yöntem, yağların aromasını ve besin değerlerini arttırmak için kullanılır ve diğer yöntemlere oranla daha basit ve ucuz bir yöntemdir. Lipaz enziminin çeşitli fermantasyon basamaklarında görev alması nedeniyle özellikle işlenmiş et ürünleri (sucuk, sosis vb.) üretiminde ve peynir pasta olmak üzere çeşitli gıdalarda aroma zenginleştirme amacıyla kullanımı gelişmektedir (Sharma vd. 2001, Hasan vd. 2006).

### **2.1.3 Kağıt Sanayinde Lipaz**

Ağaçlardaki hidrofobik bileşenler (balmumu ve trigliseritler) kağıt yapımında üretim aşamasında zorluklara ve kağıt kalitesinde düşüğe neden olmaktadır. Lipazlar bu olumsuz etkilerin giderilmesi amacıyla kağıt imalatında kullanılır. Japonya'da "Nippon Paper Industries" bu problemleri gidermek için trigliseritlerin % 90 oranında hidrolizini sağlayan *Candida rugosa* lipazının kullanıldığı bir yöntem geliştirmiştir (Sharma vd. 2001).

### **2.1.4 Organik Sentezlerde Lipaz Kullanımı**

Lipazlar çeşitli kimyasal, bölge seçimli ve stereoseçimli dönüşümleri katalizlemekte kullanılır. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların büyük çoğunluğu da mikrobiyal kökenlidir. Bu enzimler hidrofilik ve lipofilik yüzeyler arasında çalışır ve reaksiyon karışımındaki organik çözünenleri de tolere eder. Lipaz suyla karışmayan

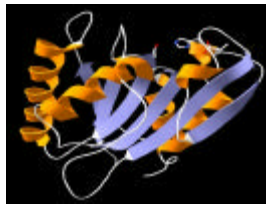
trigliseritlerin, su-akiskan ara yüzeylelerinde hidrolizini katalizler. Belirli kosullar altinda reaksiyon karisimindaki suyun miktarı lipaz katalizli reaksiyonun yönünü belirler. Suyun olmadığı ya da çok az miktarda olduğu durumlarda reaksiyon esterleşme ya da transesterleşme lehinde olur. Fazla miktarda su bulunması durumunda ise hidroliz lehine döner.

Lipaz kullanımı yukarıda sözü edilenler ile sınırlı değildir. Bunlara ek olarak sulu ve organik ortamda biyodönüşümlerde, rasemik asit ve alkollerin rezolüsyonunda, bölge seçimli açıllemelerde, ester sentezinde lipaz kullanımı mevcuttur (Hasan vd. 2006).

Lipazlar kullandıkları substratların fazla olması, ekstrem kosullarda (sicaklık, pH, organik çözücüler gibi) kararlı yapılarını koruyabilmeleri gibi baslıca nedenlerle en önemli biyokatalizörler olarak varsayılır. Son zamanlarda lipazların üç boyutlu yapılarının keşfedilmesi ile yapı/görev ilişkileri de aydınlatılmıştır. Lipazların yeni alanlarda da biyokatalizör olarak kullanımında olağanüstü artışı olacağı düşünülmektedir. Son on yıl içerisinde özellikle organik sentezler basta olmak üzere lipazlar, proteaz ve amilazlar kadar önem kazanmıştır (Saxena vd. 1999).

## 2.2 Lipaz Yapısı

Lipazlar (triacil gliserol açıl hidrolazlar) bir çok tepkimeyi katalizleyebilme yetenekleri ile fizyolojik öneme ve endüstriyel potansiyele sahiptirler. Lipazlar esteraz enzimlerinin özel bir sınıfıdır ve yağlar üzerine etkilidir. Yağları hidrolize ederek onları gliserol ve yağ asitlerine parçalarlar. Esterazların aksine lipazlar sadece su/yağ ara yüzeylelerinde aktivasyon gösterirler. Lipazlar aktif bölgelerinde serin yer aldığı için serin hidrolazlar olarak adlandırılmaktadır (Saxena vd. 1999). *Bacillus* cinsi bakterilerde lipaz üretimini kodlayan genler 600-750 baz arasında değişim göstermektedir ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) ve türlere özgü farklılıklar içermektedir. Şekil 2.1'de *Bacillus subtilis* tarafından sentezlenen lipaz enzimi görülmektedir.



Şekil 2.1 *Bacillus subtilis* lipazi ([www.rug.nl/proteincrystallography/gallery/index](http://www.rug.nl/proteincrystallography/gallery/index))

### 2.3 Lipaz Sinifi

Enzimler katalizledikleri tepkimeler temeline göre alti ana sinifa ayrılmıştır. Her enzim noktalarla ayrılan ve dört birimden oluşan bir kod numarası (E.C.) ile belirtilmektedir. Birinci basamak aşağıda gösterildiği gibi enzimin ait olduğu ana sınıfı gösterir.

1. Oksidoredüktazlar : Yükseltgenme/indirgenme tepkimeleri
2. Transferazlar : İki molekül arasında bir atom veya grubun transferi
3. Hidrolazlar : Hidroliz tepkimeleri
4. Liyazlar : Substrattan bir grubun ayrılması
5. İzomerazlar : İzomerizasyon tepkimeleri
6. Ligazlar : İki molekülün sentezle birleşmesi

Kod numarasındaki ikinci ve üçüncü basamaklar, katalizlenen tepkimenin türünü tanımlamaktadır. Bunun genel bir kuralı yoktur; çünkü her ana sınıf için bu basamakların anlamı ayrı ayrı tanımlanmıştır.

Sınıflandırmada lipaz enzimi numarası **E.C. 3.1.1.3'**tür. Burada **3:** enzimin ana sınıfı olan hidrolazları göstermektedir. **1:** hidrolazlar içerisinde birinci alt sınıfı yani esterazları göstermektedir. **1:** karboksilik ester hidrolazları, **3** ise triaçil gliserol lipazı ifade etmektedir.

### 2.4 Lipaz Kaynakları

Biyolojik olarak aktif enzimler herhangi bir canlı organizmadan elde edilebilirler. Ticari amaçlı enzim üretiminde kullanılan kaynaklar çok geniş çaptadır. Endüstride kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mantar ve maya, % 13 bakteri, % 4 bitki, % 8 hayvan kaynaklıdır. Günümüzde enzim kaynağı olarak mikrobiyal kaynaklar, mikrobiyal olmayanlara tercih edilmektedir çünkü;

- (1) Genellikle üretimleri daha ucuzdur.
- (2) Enzim içerikleri daha kontrol edilebilir ve daha tahmin edilebilirdir.
- (3) Bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre daha karalı yapıda enzim elde edilmektedir.
- (4) Kullanılacak hammadde ve araç gereci sağlamak kolaydır.
- (5) Hayvansal ve bitkisel dokular sağlıklı zararlı materyaller içerebilirler (Bitkiler fenolik bileşikler içerirler).

Bitki ve hayvan kültürleri kullanımında karşılaşılan zorluklardan dolayı mikrobiyal kaynaklar tercih sebebi olmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin büyük bir çoğunluğu kısıtlı sayıda türden elde edilmektedir.

Fungal lipaz kaynağı olarak; *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Ashbya*, *Beauveria*, *Acremonium*, *Alternaria* cinslerine ait türler kullanılabilir.

Lipaz kaynağı olarak kullanılabilen mayalar ise; *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Trichosporon*'dur. (Chaplin ve Bucke 1990).

Bakteriyel kaynaklar ise Çizelge 2.3' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 Bakteriyel lipaz kaynakları (Sharma vd 2001).

Kaynak	Cins	Tür	
BAKTERİ GRAM (+)	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>	
		<i>B. cereus</i>	
		<i>B. stearothermophilus</i>	
		<i>B. subtilis</i>	
		<i>B. brevis</i>	
		<i>B. thermocatenulatus</i>	
		<i>Bacillus</i> sp. IHI-91	
		<i>B. coagulans</i>	
		<i>B. acidocaldarius</i>	
		<i>Bacillus</i> sp. RS-12	
		<i>Bacillus</i> sp. J 33	
		<i>B. thermoleovorans</i> ID 1	
		<i>Staphylococcus</i>	<i>S. canosus</i>
			<i>S. aureus</i>
	<i>S. hyicus</i>		
	<i>Lactobacillus</i>	<i>S. epidermidis</i>	
<i>S. warneri</i>			
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus delbrückii</i>	

---

		<i>Lactobacillus</i> sp.
	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus freudenreichii</i>
		<i>M. luteus</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acne</i>
		<i>Propionibacterium granulosum</i>
	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.
		<i>Bu. Glumae</i>
<b>BAKTERI</b>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>GRAM (-)</b>		<i>P. fragi</i>
		<i>P. mendocina</i>
		<i>P. putida</i> 3 SK
		<i>P. glumae</i>
		<i>P. cepacia</i>
		<i>P. fluorescens</i>
		<i>P. aeruginosa</i> KKA-5
		<i>P. pseudoalcaligenes</i> F 111
		<i>Pseudomonas</i> sp.
		<i>P. fluorescens</i> MF0
		<i>Pseudomonas</i> sp. KW 156
	<i>Chromobacterium</i>	<i>Ch. Viscosum</i>
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Aci. pseudoalcaligenes</i>
		<i>Aci. Radioresistens</i>
	<i>Aeromonas</i>	<i>Ae. hydrophila</i>
		<i>Ae. sorbia</i> LP004

---

Bu çalışmada bakteriyel lipaz kaynağı olarak, yağlı fabrika atıkları ile kontamine olmuş topraktan izole edilmiş *Bacillus* sp. türünde mikroorganizma kullanılmıştır.

## 2.5 Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler

Mikrobiale lipazlar çoğunlukla sıvı kültürde üretilir; ancak katı faz fermentasyon metotları da kullanılabilir. Bu çalışmada bakteriyel lipaz üretimi için sıvı kültür kullanılmıştır.

Lipaz üretimi, karbon ve azot kaynakları türü ve derisimi, pH, sıcaklık ve ortamdaki iyonlardan etkilenir (Gupta vd. 2004).

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

### 2.5.1. Karbon Kaynakları Etkisi

Mikrobiyal lipaz üretiminde çoğunlukla karbon kaynağı olarak bitkisel yağlar kullanılmıştır. Kullanılan yağların derisimleri % 0.5 ve % 1.5 arasında değişmekte, genellikle en uygun derisimin % 1 olduğu görülmektedir. *Bacillus alcalophilus* ve *Bacillus licheniformis* türlerinde ise literatürde verilen genel bilgilerin aksine glikoz ve maltoz kullanımı ile yüksek lipaz aktiviteleri elde edilmiştir (Gupta vd. 2004).

*Bacillus alcalophilus* alkali termofilik lipaz üretiminde, karbon kaynağı olarak soya yağı ve maltoz kullanılmıştır (Gupta vd. 2004).

*Bacillus licheniformis* lipaz üretiminde, karbon kaynağı olarak zeytin yağı ve mısır yağı deneyerek üretimin inhibe olduğu görülmüş ve kaynak olarak glukoz kullanılmıştır (Gupta vd. 2004).

*Bacillus thermoleovorans* ID-1 termofilik lipaz üretiminde, karbon kaynağı olarak % 1.5 derisiminde zeytin yağı, palm yağı ve soya yağı kullanılmıştır (Lee vd. 2001).

*Bacillus coagulans* BTS-3 hücre disi alkali termofilik lipazi üretiminde, karbon kaynagi olarak bitkisel yağların etkisi % 1 derisimleri için incelenmiştir ve en yüksek lipaz aktivitesine hardal yağı kullanıldığı zaman ulaşmıştır (Çizelge 2.4; Kumar vd. 2005).

Çizelge 2.4 *Bacillus coagulans* BTS-3 lipaz aktivitesine karbon kaynakları etkisi  
(Kumar vd. 2005)

<b>Karbon Kaynagi (% 1 w/v)</b>	<b>Lipaz Aktivitesi (U/ml)</b>
Hindistan Cevizi Yağı	0.19
Yerfıstığı Yağı	0.03
Hardal Yağı	0.68
Ayçiçek Yağı	0.16
Tween 80	0.42
Tween 20	0.38
Zeytin Yağı	0.38
Pamuk Tohumu Yağı	0.09
Soya Yağı	0.04

*Bacillus* sp. RSJ –1 türünden hücre disi alkalın termofilik lipaz üretiminde, karbon kaynagi olarak % 0.75 derisiminde pamuk tohumu yağı ve % 0.5 derisiminde Tween 80 kullanılmıştır (Sharma vd. 2002).

*Bacillus* sp. THL 027 termofilik lipaz üretiminde, karbon kaynagi olarak bazı bitkisel yağların ve yağ asidi esterlerinin etkisi incelenmiştir. En yüksek lipaz aktivitesine bitkisel yağlar içerisinde zeytin yağı ve pirinç kepeği yağı kullanıldığında, esterler içerisinde ise trikaprilin kullanıldığında ulaşmıştır (Çizelge 2.5; Dharmstithi vd. 1999).

Çizelge 2.5 *Bacillus* sp. THL 027 lipaz aktivitesine karbon kaynakları etkisi  
(Dharmsthiti vd. 1999)

Karbon Kaynağı	Spesifik Aktivite (U/mg)
<i>BITKİSEL YAĞLAR</i>	
Zeytin Yağı	4.8
Soya Yağı	4.3
Pirinç Kepeği Yağı	4.8
Palm Yağı	3.5
Tereyağ	3.1
Ton Balığı Yağı	1.2
Hindistan Cevizi Yağı	1.2
<i>YAĞ ASIDI ESTERLERİ</i>	
Tribütirin (C 4:0)	4.1
Trikaproin (C 6:0)	4.1
Trikaprilin (C 8:0)	4.9
Trikaprin (C 10:0)	4.1
Trilaurin (C 12:0)	4.1
Trimyristin (C 14:0)	3.7
Tripalmitin (C 16:0)	2.6
Tristearin (C 18:0)	1.8

*Bacillus stearothermophilus* MC 7 hücre disisi termofilik lipaz üretiminde, karbon kaynağı olarak soya yağı (% 0.5 ) ve zeytin yağı (% 0.1) kullanılmıştır (Kambourova vd. 2003).



*Bacillus* sp. J33 termofilik lipaz üretiminde, karbon kaynagi olarak % 1 derisiminde yag asidi esterleri kullanilmistir. En yüksek lipaz aktivitesine tribütirin kullanildiginda ulasilmistir (Çizelge 2.6; Nawani vd. 2000).

Çizelge 2.6 *Bacillus* sp. J33 lipaz aktivitesine karbon kaynagi olarak yag asidi esterleri etkisi (Nawani vd. 2000)

<b>Yag Asidi Esterleri (%1w/v)</b>	<b>Bagil Aktivite (%)</b>
Tribütirin (C 4:0)	100
Trikaproin (C 6:0)	90
Trikapriline (C 8:0)	25
Trikaprin (C 10:0)	35
Trilaurin (C 12:0)	32
Tripalmitin (C 16:0)	12.5
Triolein (C 18:1)	28

### 2.5.2. Azot Kaynaklari Etkisi

*Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan lipaz üretiminde, azot kaynagi olarak çoğunlukla çeşitli derisimlerde pepton ve maya özütü kullanılmistir. Birkaç türde dogal kaynak olarak soya unu kullanimi görölmektedir. Lipaz üretiminde organik kaynaklariin üretimi stimüle ettigi, inorganik kaynaklariin ise büyük çoğunlukla lipaz üretimini olumsuz etkiledigi bilinmektedir (Gupta vd. 2004).

*Bacillus* sp. RSJ-1 türünden hücre disi alkali termofilik lipaz üretiminde, azot kaynagi olarak % 0.75 pepton ve % 0.75 maya özütü kullanılmistir (Sharma vd. 2002).

*Bacillus* sp. THL027 türünden termofilik lipaz üretiminde, azot kaynagi olarak % 0.5 pepton ve % 0.2 maya özütü kullanılmistir (Dharmstithi vd. 1999).

*Bacillus pumilus* B26 türünden rekombinant lipaz üretiminde, % 1 tripton ve % 0.5 maya özütü kullanılmistir (Kim vd. 2002).

*Bacillus stearothermophilus* MC 7 hücre disi termofilik lipaz üretiminde, azot kaynagi olarak % 0.5 soya unu kullanılmistir (Kambourova vd. 2003).

*Bacillus coagulans* MTCG6375 rekombinant lipaz üretiminde, azot kaynagi olarak % 0.5 maya özütü kullanılmistir (Kanwar vd. 2006).

*Bacillus alcalophilus* alkali termofilik lipaz üretiminde, azot kaynagi olarak % 2 soya unu ve % 1 maya özütü kullanılmistir (Ghanem vd. 2000).

*Bacillus licheniformis* lipaz üretiminde, azot kaynagi olarak pepton ve maya özütü kullanılmistir (Gupta vd. 2004).

*Bacillus coagulans* BTS-3 alkalik termofilik lipaz üretiminde, azot kaynagi olarak % 0.1 derisimde organik ve inorganik kaynaklar kullanılmistir. En yüksek lipaz aktivitesine kontrol grubunda (pepton % 0.5 ve maya özütü % 0.5) ulasilmistir (Çizelge 2.7; Kumar vd. 2005).

Çizelge 2.7 *Bacillus coagulans* BTS-3 lipazi üretiminde kullanılan azot kaynakları  
(Kumar vd. 2005)

<b>Azot Kaynagi (% 0.1)</b>	<b>Aktivite (U/ml)</b>
Maya Özütü	0.36
Pepton	0
Tripsin	0
Jelatin	0.16
Üre	0.12
Amonyum Nitrat	0.23
Amonyum Sülfat	0.42
Potasyum Nitrat	0.25
L-asparajin	0.17
Kontrol	0.67
(%0.5 pepton % 0.5 maya özütü)	

### 2.5.3 pH Etkisi

*Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan lipaz üretiminde pH etkisini göstermek amacıyla, enzim aktivitesinin gözlemlendiği çalışma aralıkları ve enzimin maksimum aktivitede olduğu pH değerleri yayınlar taranarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8 *Bacillus* türlerinden lipaz üretimine pH etkisi

Mikroorganizma	Kaynak	Çalışma Aralığı	Optimal pH
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	Kumar vd. 2005	6.5-9.5	8.5
<i>Bacillus</i> sp. RSJ –1	Sharma vd. 2002	5-12	8
<i>Bacillus</i> sp. THL027	Dharmsthiti vd.1999	3-10	7
<i>Bacillus pumilus</i> B26	Kim vd. 2002	6-10	8.5
<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7	Kambourova vd. 2003	6-12	8.5
<i>Bacillus megaterium</i> AKG-1	Sekhon vd. 2005	5-10.5	7
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nthangeni vd. 2001	7-12	10.5
<i>Bacillus alcalophilus</i>	Ghanen vd. 2000	9.4-12	10.5
<i>Bacillus stearothermophilus</i> P1	Sinchaikul vd. 2001	4-11	8.5
<i>Bacillus megaterium</i>	Lima vd. 2004	2.5-10	6

#### 2.5.4 Sicaklik Etkisi

*Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan lipaz üretiminde sicaklik etkisini göstermek amacıyla, enzimin aktivitesini koruyabildigi sicaklik araliklari ve enzimin maksimum aktivitede oldugu sicaklik degerleri yayinlar taranarak belirlenmis ve sonuclar Çizelge 2.9’da verilmistir.

Çizelge 2.9 *Bacillus* türlerinden lipaz üretimine sicaklik etkisi

Mikroorganizma	Kaynak	Çalışma Araligi	Optimal Sicaklik
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	Kumar vd. 2005	35-65	55
<i>Bacillus</i> sp. RSJ –1	Sharma vd. 2002	50-85	65
<i>Bacillus</i> sp. THL027	Dharmsthiti vd.1999	37-90	70
<i>Bacillus pumilus</i> B26	Kim vd. 2002	10-50	35
<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7	Kambourova vd. 2003	50-90	75-80
<i>Bacillus megaterium</i> AKG-1	Sekhon vd. 2005	20-90	55
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nthangeni vd. 2001	30-75	55
<i>Bacillus alcalophilus</i>	Ghanen vd. 2000	40-90	65
<i>Bacillus stearothermophilus</i> P1	Sinchaikul vd. 2001	30-80	55
<i>Bacillus megaterium</i>	Lima vd. 2004	20-70	55

#### 2.5.5 Metal Iyonlari Etkisi

*Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan lipaz üretiminde, metal iyonlari etkisi türlere göre degiskenlik göstermektedir. Genel olarak ortama 1 mM derisimde iyon ilave edilmektedir. Bu yüksek lisans çalışmasında, öncelikli olarak lipaz üretimini stimüle ettigi bilinen iyonlari etkisi 1mM ve 10 mM derisimleri için incelenmistir.

*Bacillus* sp. RSJ-1 hücre disi alkali termofilik lipaz aktivitesi  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  varliginda stimüle,  $\text{Cs}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  varliginda inhibe olmaktadır (Sharma vd. 2002).

*Bacillus stearothermophilus* P1 hücre disi termofilik lipazi aktivitesi, ortama ilave edilen tüm iyonlar ile ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Li}^{+}$ ,  $\text{Cs}^{+}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ) inhibe olmuştur (Sinchaikul vd. 2001).

*Bacillus stearothermophilus* MC7 termofilik lipazi aktivitesi,  $\text{Cu}^{+}$  iyonu varliginda inhibe olmuştur, en yüksek aktiviteden sıralanırsa  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Li}^{+}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cs}^{+}$  ve  $\text{Fe}^{+3}$  iyonları varliginda aktive olmuştur (Kambourova vd. 2003).

*Bacillus* sp. THL 027 termofilik lipaz aktivitesi  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Cu}^{+}$  varliginda stimüle,  $\text{Fe}^{+3}$  varliginda inhibe olmaktadır (Dharmstithi vd. 1999).

*Bacillus coagulans* BTS-3 hücre disi alkalın termofilik lipaz aktivitesi  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  varliginda stimüle,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  varliginda inhibe olmaktadır.  $\text{Na}^{+}$  aktiviteyi etkilememektedir (Çizelge 2.10; Kumar vd. 2005).

Çizelge 2.10 Çesitli iyonların *Bacillus coagulans* BTS-3 lipazi aktivitesine etkisi  
(Kumar vd. 2005)

Metal Iyonları (1 mM)	Bagil Aktivite (%)
Katkisiz Ortam	100
$\text{Co}^{+2}$	0
$\text{K}^{+}$	386
$\text{Fe}^{+3}$	251
$\text{Hg}^{+2}$	458
$\text{Mg}^{+2}$	357
$\text{Mn}^{+2}$	0
$\text{Zn}^{+2}$	0
$\text{Al}^{+3}$	86
$\text{Na}^{+}$	100

*Bacillus* sp. BP-6 lipazi aktivitesine metal iyonlari etkisini incelemek amaciyla iyonlar ortama iki farkli derisimde ilave edilerek sonuçlar karsilastirilmistir (izelge 2.11; Ruiz vd. 2003).

Çizelge 2.11 esitli iyonlari *Bacillus* sp. BP-6 lipazi aktivitesine etkisi (Ruiz vd. 2003)

Metal Iyonlari	Bagil Aktivite (%)	
	(1 mM)	(10 mM)
Katkisiz Ortam	100	100
CaCl <sub>2</sub>	96.4	88.1
FeCl <sub>2</sub>	110.1	46.9
NiCl <sub>2</sub>	92.0	99.5
CoCl <sub>2</sub>	96.1	98.8
ZnCl <sub>2</sub>	100.4	82.0
BaCl <sub>2</sub>	104.6	108.3
MnCl <sub>2</sub>	102.3	85.6
AgNO <sub>3</sub>	45.9	35.0
CuSO <sub>4</sub>	91.2	71.9
MgCl <sub>2</sub>	102.0	103.6
HgCl <sub>2</sub>	26.3	18.2

## 2.6 Lipaz Enziminin Saflastirilmesi

Enzim saflastirma islemleri, proteinlerin u temel zelligine dayanilarak yapilir. Bunlar proteinlerin farkli çözünürlüklere sahip olmasi, farkli elektrik yüklerine sahip olmalari ve farkli moleköl büyüklükleridir. Saflastirma islemleri dayandiklari temele göre siniflandirilirs;

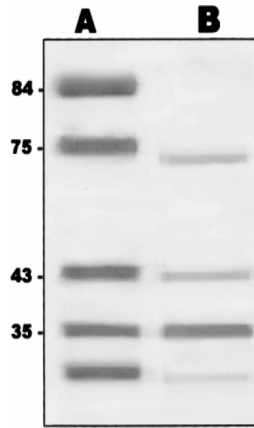
### 2.6.1 Proteinleri özünürlüklerine Göre Ayirip Saflastirma Yöntemleri

Proteinler, özünürlüklerine göre ayirilip saflastirilabilirler. Sodyum sülfat veya amonyum sülfat ile çöktürme yöntemleri, proteinlerin ayrilmasinda ve saflastirilmasinda kullanılan en

eski yöntemlerdir. Ayırma işlemi sırasında proteinlerin denatüre olmaması için çöktürme soğukta yapılmalıdır. Çözünmüş proteinlerin amonyum sülfat gibi nötral tuzların etkisiyle çökmelerinin nedeni, protein moleküllerindeki bağlı suyun çekilmesidir.

## 2.6.2 Proteinleri Elektrik Yüklerine Göre Ayırma ve Saflastırma Yöntemleri

**Elektroforez**, proteinleri izoelektrik noktalarından farklı bir pH değerine sahip elektriksel bir alanda farklı göçme hızlarına dayanarak ayırma yöntemidir. Elektroforez işleminde proteinler, taşıyıcı materyal üzerinde göç ettirilirlir. Farklı göçme hızlarına göre taşıyıcı materyal üzerinde ayrılan proteinler, boyanarak görünür hale getirilir ve elde edilen protein bantları, kantitatif olarak değerlendirilir. Elektroforezde kullanılan taşıyıcı materyal; kâğıt, selüloz asetat tabakası, nişasta jeli, poliakrilamid jeli, agar jeli gibi maddeler olabilir. Taşıyıcı materyalin çeşidine göre de farklı elektroforez yöntemleri tanımlanır. Şekil 2.2’ de SDS-PAGE Jel Elektroforezi ile ayrılmış proteinler görülmektedir. Burada A seridi protein standartlarını, B seridi ise kısmi saflastırma yapılmış lipaz enzimini göstermektedir.

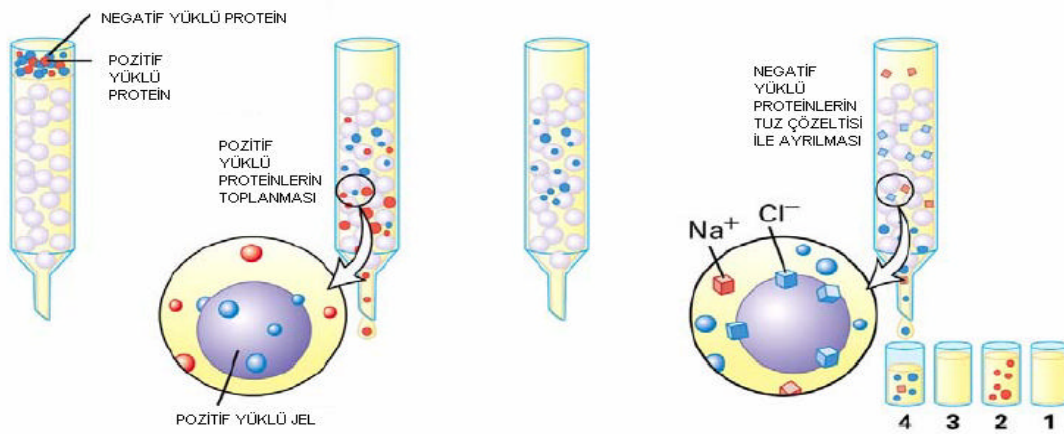


Şekil 2.2 SDS-PAGE Jel Elektroforezi ile proteinlerin ayrılması (Sekhon vd. 2005)

**Izoelektrik odaklama yöntemi**, proteinleri izoelektrik noktalarının farklılığına göre ayırma yöntemidir. Bu yöntemde, yapay elektrolitler kullanılarak elektriksel alanda bir pH gradyenti oluşturulur. Elektriksel alandaki pH gradyeninde her protein molekülü, izoelektrik noktasına göre uygun bir yöne doğru hareket eder; iki yönde etki eden kuvvetlerin eşit olduğu, pH’ın proteinin izoelektrik noktasına eşit olduğu yerde ise hareketsiz kalır.



**Iyon degistirici kolon kromatografi**, sabit faz olarak pozitif yüklü dietilaminoetil gruplari veya negatif yüklü karboksimetil gruplari içeren bir kolona, hareketli faz içinde proteinler yüklenir. Proteinler, izoelektrik noktalarına göre farklı pH'daki ortamlarda farklı yük kazanması özelliklerine dayanılarak ayrıştırılır. Proteinler yük durumlarına göre kolonda tutulurlar. Daha sonra yüksek tuz konsantrasyonu ile yapılan yıkama ile kolona tutulmuş olan proteinlerin kolondan ayrılması sağlanır. Proteinler yük durumlarına göre kademeli olarak kolondan ayrılır. Şekil 2.3'de pozitif yüklü bir kolonda proteinlerin ayrılması görülmektedir. Burada ilk aşamada pozitif kolona tutunamayıp kolondan öncelikle çıkan pozitif yüklü proteinler elde edilmektedir. İkinci aşamada NaCl ile yapılan yıkamada Cl<sup>-</sup> iyonları negatif iyonların yerini almakta ve negatif yüklü proteinler kolonda ayrılarak elde edilmektedir.



Şekil 2.3 Iyon degistirici kolon kromatografisi ile proteinlerin ayrılması

### 2.6.3 Proteinleri Molekül Büyüklüklerine Göre Ayırma Yöntemleri

**Ultracentrifugasyon**, yer çekimi ivmesinin binlerce katına ulaşan çekim alanlarında büyük moleküllerin sedimente olarak (çökerek) ayrılmalarına dayanan yöntemdir.

**Jel filtrasyon kromatografisi**, proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmalarını sağlar. Bu yöntemle proteinlerin birbirinden ayrılması, sabit fazdaki jelin oluşturduğu gözeneklerin çapına göre moleküllerin belli derecede engellenmesine dayanır. Sabit faz

olarak kullanılan Sephadex, Biogel, Agarose gibi dolgu maddeleri kolona doldurulduktan sonra protein çözeltisi tampon ile birlikte kolona verilir. Asagi dogru hareket eden protein çözeltisi içerisinde bulunan küçük proteinler, kolon dolgu maddesinin küçük gözeneklerine girerken, büyük proteinler gözeneklere girmeden kolondan ilk çıkan moleküller halinde ayrılırlar.

**Diyaliz**, proteinleri daha küçük molekül ağırlıklı moleküllerden ayırmak için kullanılır. Bu yöntem, yarı geçirgen bir membran içerisine konulan protein çözeltisi içerisinden küçük moleküllerin membran gözeneklerinden suyla veya tamponla dış ortama geçirilmesi temeline dayanır.

**Ultrafiltrasyon**, diyaliz temelinde çalışır; aradaki fark küçük moleküllerin ortamdan ayrılması için hidrostatik basınç veya santrifüj gibi kuvvetlerin etkisiyle proteinleri molekül ağırlıklarına göre diyalize oranla daha hızlı ve daha yüksek verimle ayrılmalarını sağlamasıdır.

Lipaz enziminin saflastırılması için yukarıda bahsedilen metotlar kullanılmaktadır. *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan elde edilen lipaz enzimi saflastırmasında bahsedilen yöntemlerden birkaç tanesi beraber kullanıldığı zaman saf ürün elde edilebilmektedir. Saflastırma işlemi sonunda enzimin saflığını göstermek amacıyla SDS-PAGE yöntemi uygulanır.

*Bacillus pumilus* B26 türünden rekombinant lipaz saflastırılması üç basamakta gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.12; Kim vd. 2002).

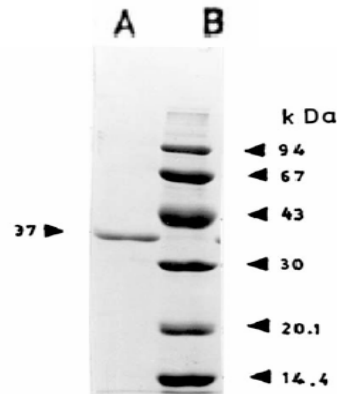
Çizelge 2.12 *Bacillus pumilus* B26 lipazi saflastırılma basamakları (Kim vd. 2002)

Basamak	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflastırma Kati
Kültür üst faz	14.000	440	32	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi	9700	300	32	69	1
CM-Sepharose	5300	130	41	38	1.3
Jel filtrasyon	4700	34	138	34	4.3

*Bacillus* sp. RSJ-1 türünden hücre disisi alkali termofilik lipaz saflastırılması altı basamakta gerçekleşmiştir (Çizelge 2.13). Saflastırma işlemleri sonunda enzim saflığı SDS-PAGE ile Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Sharma vd. 2002).

Çizelge 2.13 *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazi saflastırılma basamakları (Sharma vd. 2002)

Basamak	Hacim (ml)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflastırma Kati
Kültür üst faz	500	5100	2400	2.13	100	1
Ultrafiltrasyon (10 kDa)	100	4050	450	9.00	79.4	4.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi	40	2425	205	11.82	47.5	5.56
Diyaliz	30	1824	68.2	26.74	35.76	12.5
İyon değişim kromatografisi	10	1432	14.0	102.28	28.07	48.13
Jel filtrasyon kromatografisi	10	1006	2.35	428.08	19.7	201.45



Şekil 2.4 *Bacillus* sp. RSJ-1 lipazi saflığının SDS-PAGE ile gösterilmesi (Sharma vd. 2002)

*Bacillus stearothermophilus* MC 7 hücre disisi termofilik lipaz saflastırılması dört basamakta gerçekleşmiştir (Çizelge 2.14; Kambourova vd. 2003).

Çizelge 2.14 *Bacillus stearothermophilus* MC 7 lipaz saflastırılma basamakları  
(Kambourova vd. 2003)

Basamak	Hacim (ml)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflastırma Kati
Kültür üst faz	728	1638	2641.9	0.62	100	1
Ultrafiltrasyon	98	1228.5	264.6	0.98	75	1.56
Sephadex G-200	360	982.5	14.4	10.21	60	16.47
DEAE-Selüloz	54.6	167.1	4.56	11.94	10.2	19.25

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

Çalışmada yağlı fabrika atıkları ile kontamine olmuş topraktan izole edilen *Bacillus* sp. lipaz üretimi için mikrobiyal kaynak olarak kullanılmıştır. Deneyleerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler Ek 1’de verilmiştir.

#### **3.2 Yöntem**

##### **3.2.1 Mikroorganizma İzolasyonu**

Su, hava, toprak ve çürüyen materyaller *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların yaşama alanlarıdır. Birçok *Bacillus* cinsi mikroorganizmanın doğal yaşama alanı topraktır. Çalışmada kullanılan mikroorganizma için de kaynak olarak toprak kullanılmıştır. Yağlı fabrika atıkları ile kontamine olmuş topraktan serum fizyolojik çözeltisi yardımıyla mikroorganizmalar ayrılmış, elde edilen çözeltiden petri kabındaki Tri Bütirin Agar (TBA) besiyerine (% 0.5 Pepton, % 0.3 Maya Özü, % 1 Tribütirin, % 1.5 Agar) yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Elde edilen karışık kültürlerden seri olarak yapılan tek koloni ekimleri sonucunda saf kültürler elde edilmiş ve TBA besiyerinde saklanmıştır. Ortamda tek karbon kaynağı, bir yağ asidi esteri olan tribütindir ve lipaz aktivitesi gösteren kolonilerin etrafında tribütirin kullanımına bağlı olarak seffaf bir zon oluşmaktadır. İzole edilmiş mikroorganizmalardan zon oluşumuna bağlı olarak lipaz aktivitesi olduğu düşünülenler seçilmiştir. İzolasyon çalışmaları Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı’nda yapılmıştır.

##### **3.2.2 Mikroorganizma Tanımlanması**

Lipolitik aktivitesi olduğu düşünülerek seçilen örneklerden preparat hazırlanmış, metilen mavisi ile basit boyama yapılarak mikroskopik morfolojileri incelenmiştir. *Bacillus*’lar sıcak, soğuk, radyasyon, kuruma veya kimyasallara maruz kaldığında sentral ya da terminal spor (endospor) oluşturabilme yeteneğindedir. Aerobik koşullarda üretimi yapılan tüm örneklerde *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar için ayırt edici bir özellik olan spor oluşumu ve basil hücre yapısı görülmüştür. Hücre duvarı yapısına bağlı olarak Gram

özelliğinin belirlenmesi amacıyla Gram boyama yapılmış ve *Bacillus* cinsinde mikroorganizmaların genel tanımlamasına uygun olarak Gram (+) özellik gösterenler seçilerek deneye devam edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *Bacillus* cinsine ait mikroorganizmanın tür tanımlamasının yapılması amacıyla 16S rRNA analizleri yapılmıştır. 16S rRNA dizileri, sabit ve kritik rolleri nedeni ile zaman boyunca çok az değişmiştir ve türlere özgü karakteristik diziler içermektedir. Bu karakteristik ve yüksek korunumlu bölgelerin dizi analizi sonuçları mikroorganizmanın sınıflandırılması hakkında bilgi vermektedir. Çalışmada izole edilen mikroorganizmanın tür tayini için uygulanan yöntem şu şekildedir:

1. *Primerlerin Saptanması*: 16S rRNA dizisini PCR yöntemiyle çoğaltabilmek için öncelikle kullanılacak primerlerin belirlenmesi gerekmektedir. Primerlerin belirlenmesi için yapılan literatür çalışması sonucunda primer dizileri elde edilmiştir (Rocha vd. 2005; Kuske vd. 1998). Seçilen primerler; 5' AGG GTC ATT GGA AAC TGG G 3' (F1), 5' CGT GTT GTA GCC CAG GTC ATA 3' (R1) 5' CCG TCG ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3' (F2), 5' CCC AGT TTC CAA TGA CC 3' (R2).
2. *DNA izolasyonu*: DNA izolasyonu için Nükleospin Tissue (Macherey-Nagel) DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.
3. *PCR*: Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik DNA dizilerini *in vitro* enzimatik sentezleme metodudur. Bu spesifik bölgelerin sınırlarını oluşturmak için değişik sayıda ve uzunlukta oligonükleotit primerler kullanılır, bunlar karşı anlamlı kalıp iplikçiklere bağlanırlar. Ardi ardına tekrarlayan döngüler serisi; kalıp DNA'nın tek iplikçikli hale getirilmesi, primerlerin kendi eşlenik bölgelerine yapışması, yapışan primerlerin DNA polimeraz ile DNA sentezlenmesi olarak gerçekleşir. Döngüler serisi sayesinde ürün miktarı logaritmik olarak artar. Çalışmada Bio-RAD marka PCR cihazı (Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı) kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri Ek 2'de verilmiştir.
4. *Sekans Analizi*: DNA dizi analizi ya da 'sequencing' DNA'nın nükleotit dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Nükleotit dizilerinin belirlenmesinde, asimetrik çoğaltma ile elde edilmiş tek iplikçikli DNA; DNA Polimeraz enzimi ile ddNTP ve biri radyo aktif olan işaretlenmiş dNTP kullanılır. Sekans analizleri için kapiller

sistem otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter/Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı) kullanılmıştır.

### **3.2.3 Mikroorganizma Çoğaltma ve Lipaz Üretimi**

#### **3.2.3.1 Kati Agar Ortami**

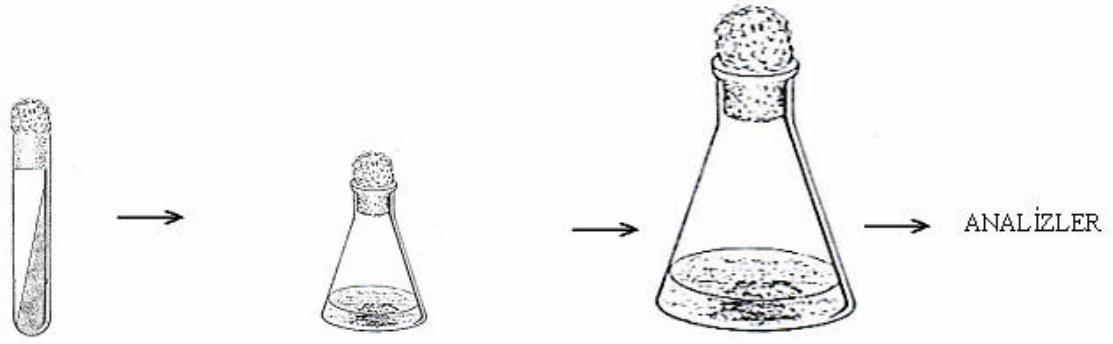
*Bacillus* cinsinde olduğu kesinleştirilen örneklerden en yüksek lipaz aktivitesine sahip olan seçilerek lipaz üretim parametreleri araştırılmaya başlanmıştır. Tüplerde taze kültür hazırlama amacıyla kati ortam olarak steril tribütirin agar besiyeri kullanılmıştır (ALP Sterilizatör). Ortam bileşenleri; % 0.5 Pepton, % 0.3 Maya Özütü, % 1 Tribütirin, % 1.5 Agar'dır. Tüplerde hazırlanan kati ortama steril koşullarda laminer akis kabininde (Biolab BHG2004) ekim yapılarak mikroorganizma 30 °C'de t=24 h inkübasyona bırakılmıştır (Friocell).

#### **3.2.3.2 Ön Çoğalma Ortami**

Lipaz üretim ortamına aktarma yapılmadan önce sıvı ortamda mikroorganizma çoğalmasını sağlamak amacıyla, ön deneylerle belirlenmiş uygun pH için hazırlanmış tamponda steril besi ortamı hazırlanmıştır. Ortam bileşenleri; % 0.5 Pepton, % 0.3 Maya Özütü, % 1 Tribütirindir ve tampon olarak 0.1 M pH 7.5 Fosfat tamponu kullanılmıştır. Ön çoğalma ortamı, T=37 °C, N=150 rpm koşullarında t=24 h çalkalmalı hava banyosunda (Edmund Bühler SM-30) inkübe edilmiştir. Yeterli çoğalma var ise steril koşullarda lipaz üretim ortamına 1/10 oranında asılama yapılmıştır.

#### **3.2.3.3 Lipaz Üretimi**

Lipaz enzimi üretimi için, gerekli karbon ve azot kaynaklarını içeren, üretimi indüklemek üzere substrat olarak yağların bulunduğu ve uygun pH'da tamponlanmış steril besi ortamları kullanılmıştır. İncelenecek parametreler lipaz üretim ortamında değişken olarak kullanılmaktadır. Lipaz üretimi akim seması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



*Egik Tribütirin Agar*  
*T=30 °C, t=24 h*

*Ön Çoğalma Ortami (10 ml)*  
*T=37 °C, N=150 rpm, t=24 h*

*Lipaz Üretim Ortami (100ml)*  
*Değişken Ortam Kosullari*

Sekil 3.1 Lipaz üretimi akim semasi

### 3.2.4 Analizler

#### 3.2.4.1 Spektrofotometrik Yöntemle Lipaz Aktivitesi Ölçümü

Lipaz aktivitesi spektrofotometrik olarak, *p*-nitrofenil palmitatin (PNFP) hidroliz tepkimesi sonucu açığa çıkan *p*-nitrofenolün (PNF) absorbansta yarattığı değişiklikten yararlanılarak belirlenmiştir. 10000 rpm, 4 °C’de 10 dk santrifüjlenerek (Hettich Rotina 35R) hücre içerisinden ayrılmış olan 1 ml lipaz üretim ortamı ve 1 ml PNFP çözeltisi (etanol içinde (% 0.5 a/h)) oda koşullarında 5 dk karıştırılarak hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonu sonlandırmak için 2 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.5 N) kullanılmış, 10000 rpm ve oda sıcaklığında 10 dk santrifüj işlemi sonrasında üst fazda λ=404 nm’de spektrofotometrik (Shimadzu 1601A) olarak açığa çıkan *p*-nitrofenol (PNF) ölçülmüştür. 1 Ünite (U)=1 dk’da 1 µmol *p*-nitrofenol üreten enzim miktarı olarak hesaplanmıştır (Hung vd. 2003). Çalışmada kullanılan PNF kalibrasyon grafiği Ek 3’de, örnek hesaplama Ek 4’de verilmiştir.

#### 3.2.4.2 Titrimetrik Yöntemle Lipaz Aktivitesi Ölçümü

Lipaz aktivitesinin titrimetrik olarak belirlenmesinde substrat olarak zeytin yağı kullanılmıştır. Bu amaçla, 2.5 ml pH=7.2 fosfat tamponu (0.1 M), 500 µL zeytin yağı, 100 µL örnek 37 °C’de su banyosunda 30 dk karıştırılmıştır. Ortama 2.5 ml etanol:aseton (1:1)



ve 2 damla fenol fitalein eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve 0.1 M NaOH'e karşı titre edilerek kullanılan NaOH miktarı belirlenmiştir (Cernia vd. 2002). Aktivite tayini için örnek hesaplama Ek 5'de verilmiştir.

#### **3.2.4.3 Proteaz Aktivitesi Ölçümü**

Proteaz aktivitesinde substrat olarak kazein kullanılmıştır (Moon vd. 1991). Bu amaçla pH=10 Borat Tamponunda % 0.5 Kazein, % 0.037 EDTA çözeltisi hazırlanmış ve 2 ml'si ile 1 ml örnek ile 100 rpm, 37 °C'de 20 dk reaksiyona sokulmuştur. 2 ml TCA (% 10 a/h) çözeltisi ile reaksiyon durdurulmuş ve 15 dk buzda bekleme süresi sonunda 10000 rpm, 4 °C'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Üst faz  $\lambda=275$  nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan kalibrasyon grafiği Ek 6'da, örnek aktivite hesaplaması Ek 7'de verilmiştir.

#### **3.2.4.4 Hücre Derisimi Ölçümü**

Hücre derisimini ölçmek için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. İçerisinde mikroorganizma üretilmemiş besi yeri ile sıfırlama yapılmış ve hücre derisimi ölçülecek sıvı çoğalma ortamından örnek alınarak  $\lambda=600$  nm'de absorbansı okunmuştur. Kalibrasyon için kuru hücreler kullanılmıştır. Bu amaçla, lipaz üretim ortamında çoğaltılan hücreler, hücre miktarının maksimum olduğu zamanda santrifüjlenerek ortamdan ayrılmış, distile su ile birkaç defa yıkandıktan sonra vakumlu santrifüj ile (ThermoElectron Corporation DNA 120 SpeedVac Concentrator/Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı) kurutulmuş ve kalibrasyon için hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan kalibrasyon grafiği Ek 8'de verilmiştir.

#### **3.2.4.5 Protein Derisimi Ölçümü**

Protein derisimleri  $\lambda=595$  nm'de Bradford protein analiz yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Bradford 1976). Çalışmada kullanılan kalibrasyon grafiği Ek 9'da verilmiştir.

### 3.2.4.6 Hücre Parçalanması

Hücre içeriğini elde etmek amacıyla ultrasonikatör cihazından (Sonics VibraCell VC 130/ Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı) yararlanılmıştır. Lipaz üretim ortamının 10000 rpm, 4 °C'de 10 dk santrifüjlenmesi ile elde edilen pellet (hücre) birkaç kez fosfat tamponu ile yıkanarak sonikasyona hazır hale getirilmiştir. Sonikasyon öncesi 2 ml 0.1 M pH=7.5 fosfat tamponu kullanılarak pellet çözülmüş, sonikasyon süresi 20 s olarak belirlenmiş ve işlem iki kez tekrarlanmıştır. Aktivite kaybını önlemek için sonikasyon süreleri arasında örnek buz içerisinde tutulmuş ve yükselen sıcaklık düşürülmüştür. Sonikasyon işlemi sonrasında örnek 10000 rpm, 4 °C'de 10 dk santrifüjlenerek hücre kalıntılarından arındırılmış ve yapılacak analizlere hazırlanmıştır.

### 3.2.5 Enzim Saflastırılması

*1. Üretim:* En yüksek lipaz üretimi ile sonuçlanan ortam koşullarında 200 ml lipaz üretim ortamında üretim yapılmış ve lipaz aktivitesinin en yüksek olduğu saatte ortam santrifüjlenerek (+4 °C, 10000 rpm, 20 dk) hücrelerden arındırılmıştır.

*2. Ultrafiltrasyon:* Ultrafiltrasyon için Amicon Ultra 15 (Millipore) ultrafiltrasyon santrifüj tüpleri kullanılmıştır. Hücrelerden ayrılmış lipaz üretim ortamı, ultrafiltrasyon tüplerinde santrifüjlenerek 5 kDa molekül ağırlığın altındaki moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Santrifüj koşulları +4 °C, 4000 g'de (6200 rpm) 40 dakikadır. Santrifüj sonrasında filtrenin üzerinde kalan ve yüksek molekül ağırlıklara sahip proteinleri içeren kısımlar toplanmıştır. Toplanan ultrafiltrasyon ürünü kromatografi aşamasına geçilmeden önce, olası partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla +4 °C, 14000 rpm, 10 dakika koşullarında santrifüjlenmiştir.

*3. Kromatografi:* Lipaz enzimini diğer proteinlerden ayırmak için, proteinlerin izoelektrik noktalarına göre farklı yüklenme özelliklerinden yararlanılarak BIO-RAD UNO Q1 kolon ile anyon degistirici kromatografi yapılmıştır (BIO-RAD Duo Flow / Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı). Elde edilen fraksiyonların ayrılması ve toplanması için BIO-RAD Fraction Collector kullanılmıştır. 1 ml örnek 1ml/dk akis hızı ile kolona yüklenmiş, 0.4 ml fraksiyonlar halinde toplanmıştır.

Ayırma işleminde örnek A tamponu (pH=8.3 20 mM TRIS-HCl) ile kolondan geçirilmiş, kolona tutunamayan proteinler (izoelektrik noktası pH 8.3'ten yüksek olan ve (+) yüklenerek (+) kolona tutunamayan proteinler) gradyen oluşturulmadan önceki fraksiyonlar olarak elde edilmistir. Izoelektrik noktaları 8.3'den düşük olan ve pH=8.3 olan ortamda (-) yüklenen proteinler kolona (+) tutunmustur. Bu proteinlerin kolondan ayrılması için % 1 den % 100'e artan dogrusal bir gradyen uygulanarak kolon tampon B (pH=8.3, 20 mM TRIS-HCl + 1M NaCl) ile yikanmis ve kolona tutunan proteinler kademeli olarak fraksiyonlar halinde elde edilmistir. Gradient oluşturmak amacıyla pH=8.3, 20 mM TRIS-HCl tamponu (Tampon A) ile pH=8.3, 20 mM TRIS-HCl + 1M NaCl (Tampon B) kullanilmistir.

Her saflastırma basamaginin sonunda ve kromatografi sonucu elde edilen protein içeren fraksiyonlara, titrimetrik yöntemle lipaz aktivitesi ve Bradford yöntemi ile protein analizi yapilmis ve kalan miktarlar ayirilan lipaz enziminin safligini göstermek ve yaklasik molekül ağırligini belirlemek amacıyla yapılan SDS-PAGE için saklanmistir.

### **3.2.6 TCA Çöktürmesi**

SDS-PAGE analizi yapılacak örneklerin protein derisiminin düşük olması nedeniyle, örneklerdeki protein miktarlarını deristirmek amacıyla TCA çöktürmesi uygulanmistir. Bu amaçla örnek, % 100'lük TCA ile 15 s vorteklendikten sonra 10 dakika 14000 rpm'de santrifüjlenmistir. Elde edilen protein çökeltisini yıkamak amacıyla % 100 aseton kullanilmistir. Yıkama sonrasında yapılan santrifüj (5 dk 14000 rpm) sonrasında örnekteki proteinler çökelti halinde elde edilmistir.

### **3.2.7 SDS-PAGE Analizleri**

Tüm saflastırma basamaklarında elde edilen örnekler, enziminin safligini göstermek ve yaklasik molekül ağırligini belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapilmis ve örneklerdeki proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrılmistir (Laemmli 1970). Yürütme jeli için % 10'luk, yigma jeli için % 4'lük akrilamid jel hazırlanmistir. Protein bantlarının gözlenmesi için gümüş boyama metodu uygulanmistir (ProteoSilver Silver Stain Kit-Sigma).

## 4. ARASTIRMA BULGULARI

### 4.1 Mikroorganizma Izolasyon ve Tanımlama

Yagli fabrika atiklarından izole edilmiş 9 farklı bakteri kültüründen, morfolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla preparatlar hazırlanmıştır. Öncelikle basit boyama tekniği kullanılarak hücre yapısı ve spor oluşturma yetenekleri incelenmiştir.

Örnek 1 : Sporlu, basil

Örnek 2 : Sporlu, basil

Örnek 3 : Sporlu, basil (sporlar zincir şeklinde sıralanmış)

Örnek 4 : Sporlu, basil

Örnek 5 : Basil (boyutu çok küçük)

Örnek 6 : Basil (boyutu çok küçük)

Örnek 7 : Sporlu, basil (boyutu küçük)

Örnek 8 : Sporlu, basil (boyutu küçük)

Örnek 9 : Sporlu, basil

Yapılan boyama sonucunda tüm örneklerin *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların genel morfolojisine uygun olduğu görülmüştür. İkinci aşama olarak mikroorganizmaların gram boyanma özellikleri incelenmiştir.

Örnek 1 : Gram +

Örnek 2 : Boyanma özelliği görülmemiştir

Örnek 3 : Gram +

Örnek 4 : Gram +

Örnek 5 : Gram -

Örnek 6 : Gram -

Örnek 7 : Gram +

Örnek 8 : Gram +

Örnek 9 : Gram +

*Bacillus* sp. türleri Gram (+) boyanma özelliği gösterdiği için 2, 5 ve 6 nolu örnekler ile çalışmaya devam edilmemiş, diğer örnekler kati tribütirin agar ortamında petri kaplarında

çoğaltılarak lipaz üretim potansiyelleri belirlenmek üzere ön deneylere tabi tutulmuştur. Ön deneyler sonucu üretim potansiyeli en yüksek olan 8 numaralı örnek ile çalışmaya devam edilmiştir (Sekil 4.1).



Sekil 4.1 Gram boyama yapılmış Örnek 8'in mikroskopik görüntüsü

Çalışmada kullanılan Örnek 8 için yapılan 16S rRNA analizleri içerisinde yapılan PCR optimizasyonu ve DNA dizi analizi sonucunda elde edilen baz dizileri Ek 10'da verilmiştir. Elde edilen 16S bölgesindeki baz dizisi gen bankasındaki ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) bilgiler ile karşılaştırıldığında baz dizisinin sadece *Bacillus* cinsindeki mikroorganizmalar ile yüksek uyum gösterdiği belirlenmiş; ancak sonuçlar çalışılan iki lokus ile tek bir türe indirgenememiştir. Çalışmanın ileri aşamalarında 16S bölgesinde bulunan diğer lokusların gen dizilerinin belirlenmesi gerçekleştirilmelidir.

## 4.2 Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler

### 4.2.1 Karbon Kaynakları Etkisi

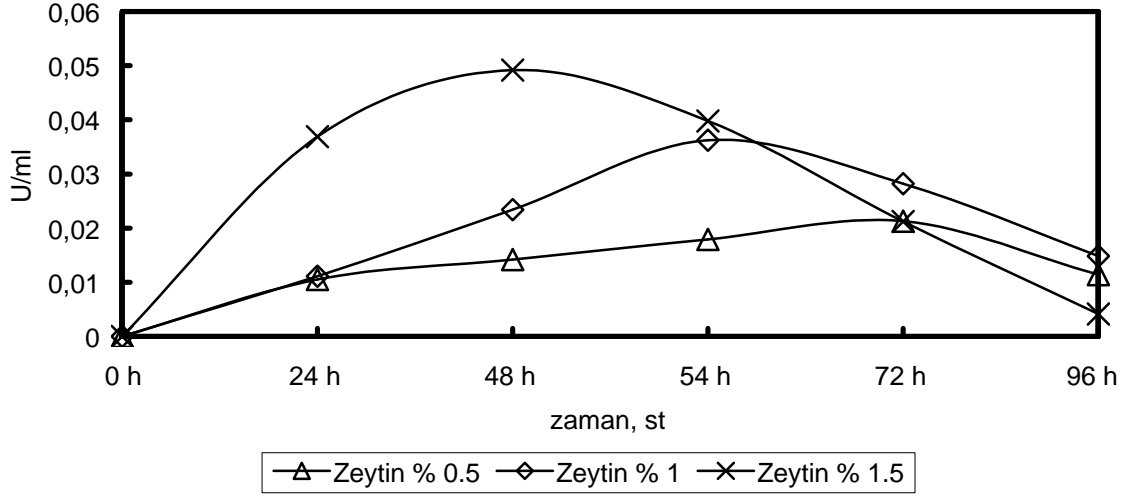
Lipaz üretiminde önemli parametreler içerisinde, üretimi en önemli derecede etkileyen faktör ortamdaki karbon kaynaklarıdır. Ortamda karbon kaynağı olarak yağların bulunmasının lipaz enzimi üretimini indükleyeceği düşünülerek öncelikle bitkisel yağların

etkisi incelenmiştir. Bitkisel yağ olarak zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, mısır özü yağı ve iki farklı susam yağı çeşitli derisimlerde kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda lipaz üretiminde kullanılan bitkisel yağların önemli bileşenlerini oluşturan bazı yağ asitleri ve bu yağ asitlerinin esterlerinin lipaz üretimine etkisi incelenmiştir. Son olarak ise, tüm karbon kaynakları içerisinde en yüksek lipaz üretimini sağlayan susam yağı (2) ile beraber, ortama çeşitli derisimlerde glukoz eklenmiş ve üretime katkısı incelenmiştir. Parametre içerisinde tüm deneyler; pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm sabit koşullarında, azot kaynağı olarak % 0.5 pepton ve % 0.3 maya özütü birlikte kullanılarak, 250 ml erlenlerde 100 ml fermantasyon ortamı içerisinde gerçekleştirilmiştir. 96 saat süresince 24 saatte bir ve önemli olabileceği düşünülen ara zamanlarda steril koşullarda 2 ml örnek alınmış ve analizler yapılmıştır. Yapılan analizler spektrofotometrik yöntemle lipaz aktivitesi tayini, Bradford protein analizi ve deney sonunda (t=96. saat) hücre derisimi ölçümüdür. Bazı örnekler için deney sonunda ultrasonikatör yardımı ile hücre parçalanarak hücre içerisindeki lipaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır.

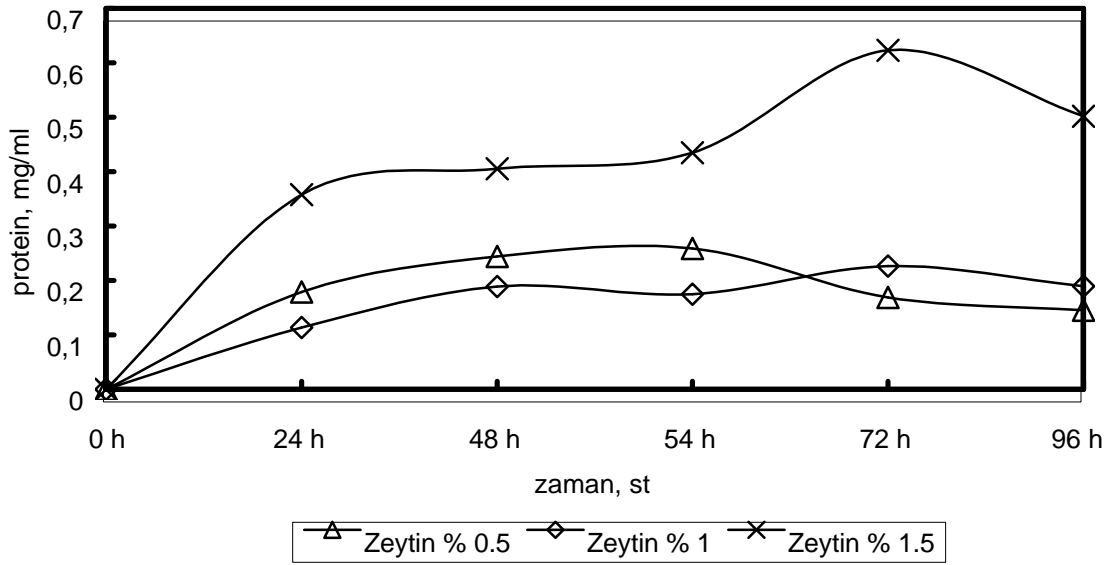
#### **4.2.1.1 Bitkisel Yağların Etkisi**

##### ***Zeytin Yağı Etkisi***

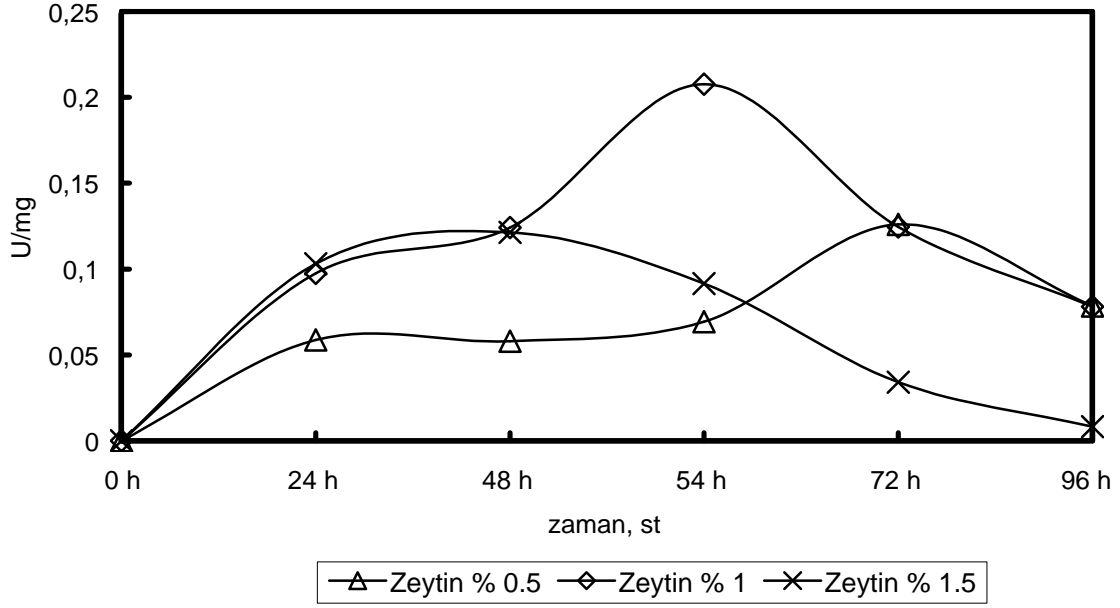
Lipaz üretiminde zeytin yağının etkisi % 0.5, % 1 ve % 1.5 derisimleri için incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; aktivite bakımından yağ derisimi % 1.5 olduğunda t=48. saatte maksimum aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Bunu sırasıyla t=54. saatte % 1, t=72. saatte % 0.5 derisiminde zeytin yağı izlemektedir. Yağ derisimi arttıkça maksimum aktiviteye ulaşılan zaman azalmaktadır ve substrat miktarı arttıkça aktivite değerleri de artmaktadır (Şekil 4.2). Protein derisimlerinin zamanla değişimi incelendiğinde ise en yüksek değere % 1.5 derisimde zeytin yağı kullanıldığında ulaşılmıştır (Şekil 4.3). Spesifik aktiviteler incelendiğinde; protein miktarlarından gelen farklılık nedeniyle % 1 derisimde zeytin yağı kullanılan ortamın spesifik aktivitesi t=54. saatte en yüksek değerdedir. Bunu sırasıyla t=72. saatte % 0.5, t=48. saatte % 1.5 derisiminde zeytin yağı içeren ortamlar izlemektedir (Şekil 4.4).



Sekil 4.2 Çesitli derisimlerde zeytin yaginin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi  
 pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.3 Çesitli derisimlerde zeytin yaginin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi  
 pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

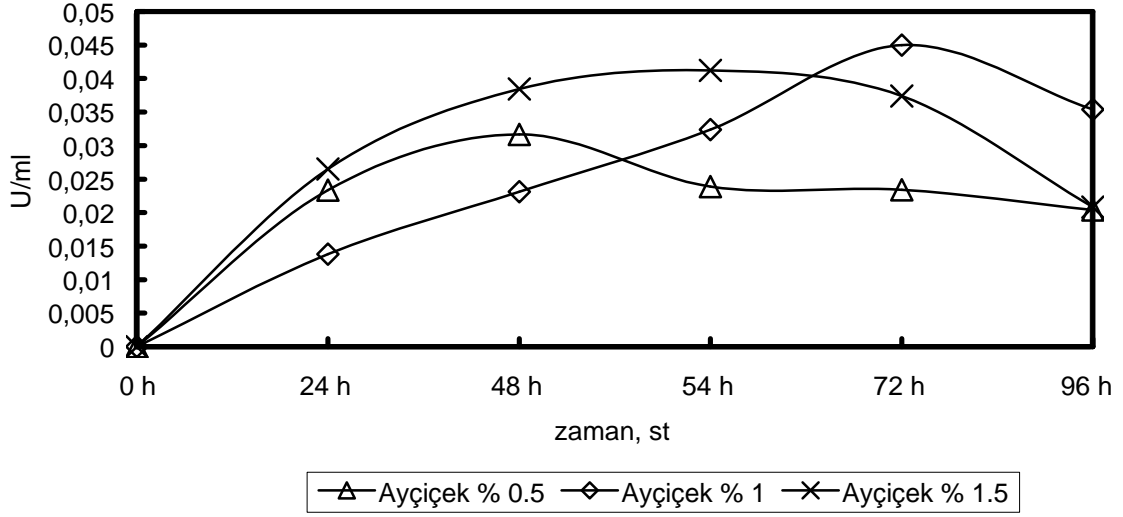


Sekil 4.4 Çeşitli derisimlerde zeytin yağının spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

#### ***Ayçiçek Yağı Etkisi***

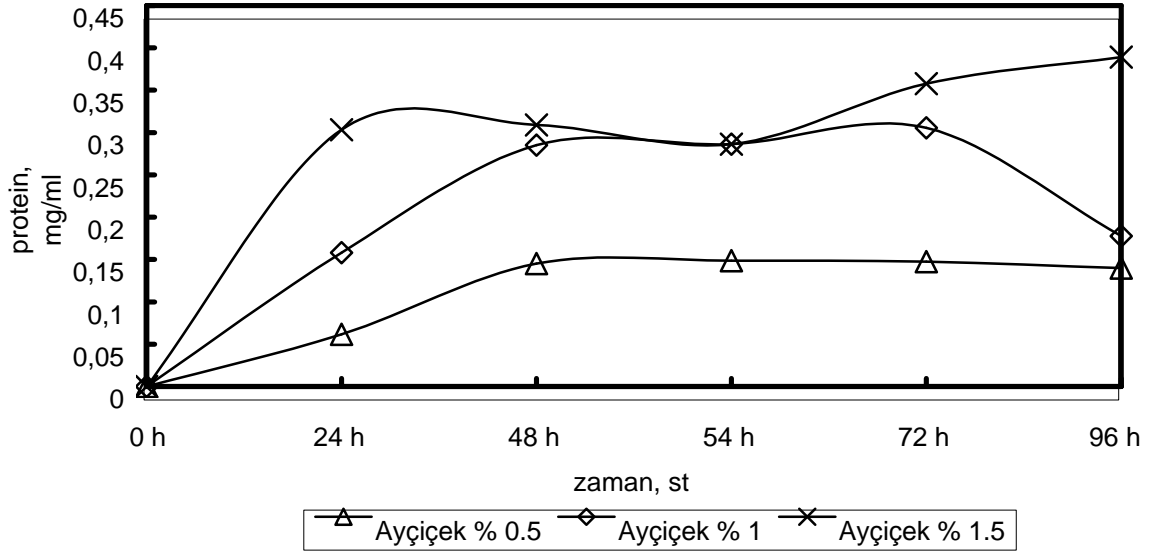
Lipaz üretiminde ayçiçek yağının etkisi % 0.5, % 1 ve % 1.5 derisimleri için incelenmiştir. Ayçiçek yağı sonuçları incelendiğinde; yağ derisimi % 1 olduğunda t=72. saatte maksimum aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Bunu sırasıyla t=54. saatte % 1.5, t=48. saatte % 0.5 derisiminde ayçiçek yağı izlemektedir. Yağ derisimi % 1.5 olduğunda substrat inhibisyonu etkisi ile aktivitede düşme gözlenmiştir (Sekil 4.5). Üretilen protein derisimleri içerisinde en yüksek değere % 1.5 derisimde ayçiçek yağı kullanıldığında ulaşılmıştır (Sekil 4.6). Spesifik aktiviteler incelendiğinde; protein miktarlarından gelen farklılık nedeniyle % 0.5 derisimde ayçiçek yağı kullanılan ortamın spesifik aktivitesi t=24. saatte en yüksek değerdedir. Bunu sırasıyla t=96. saatte % 1, t=54. saatte % 1.5 derisiminde zeytin yağı içeren ortamlar izlemektedir (Sekil 4.7).





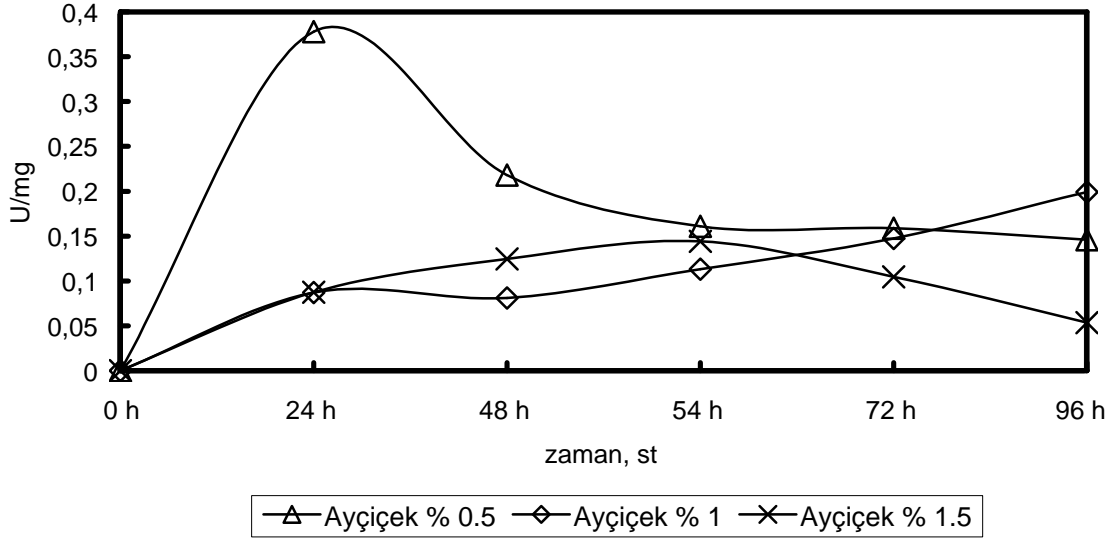
Sekil 4.5 Çesitli derisimlerde ayçiçek yaginin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.6 Çesitli derisimlerde ayçiçek yaginin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi

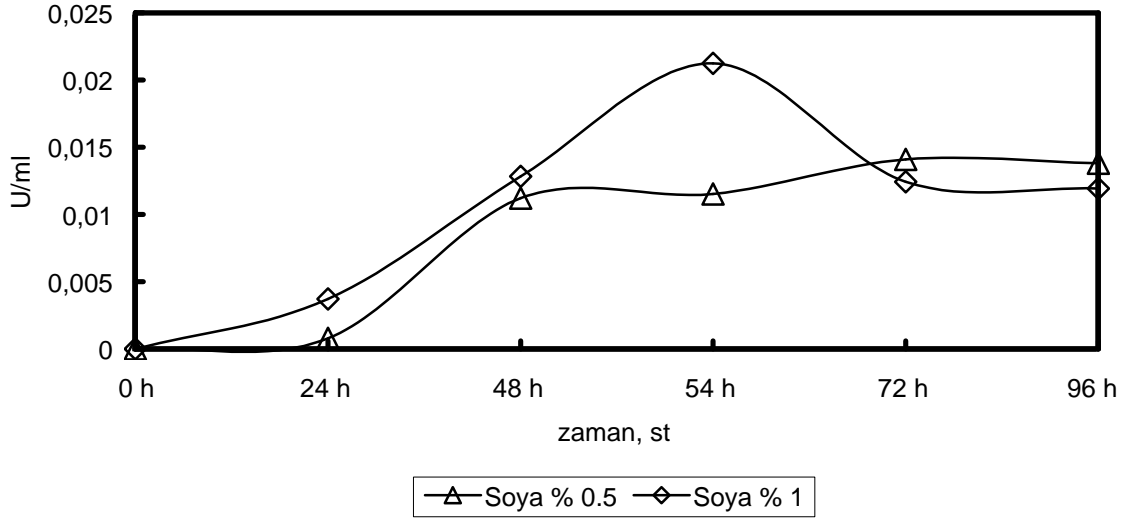
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.7 Çeşitli derisimlerde ayçiçek yağının spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi  
 pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

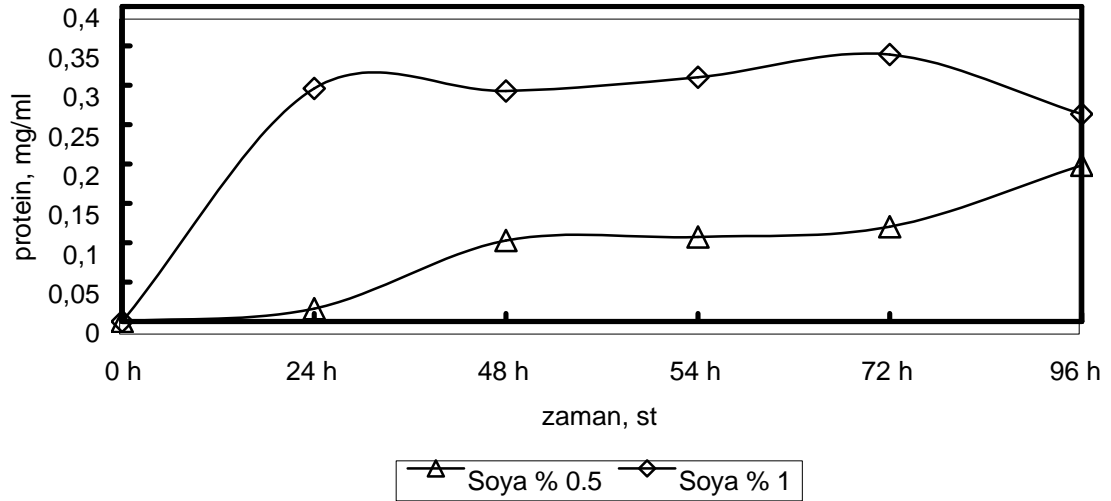
### Soya Yağı Etkisi

Lipaz üretiminde soya yağının etkisi % 0.5 ve % 1 derisimleri için incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; yağ derisimi % 1 olduğunda t=54. saatte maksimum aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Yağ derisimi % 0.5'e indirildiğinde maksimum aktiviteye t=72. saatte ulaşılmaktadır (Sekil 4.8). En yüksek protein derisimine % 1 derisimde soya yağı kullanıldığında ulaşılmıştır (Sekil 4.9). Spesifik aktiviteler incelendiğinde; protein miktarlarından gelen farklılık nedeniyle % 0.5 derisimde soya yağı kullanılan ortamın spesifik aktivitesi t=72. saatte en yüksek değerdedir. Yağ derisimi % 1 olduğunda t=54. saatte maksimum spesifik aktivite değerine ulaşılmıştır (Sekil 4.10).



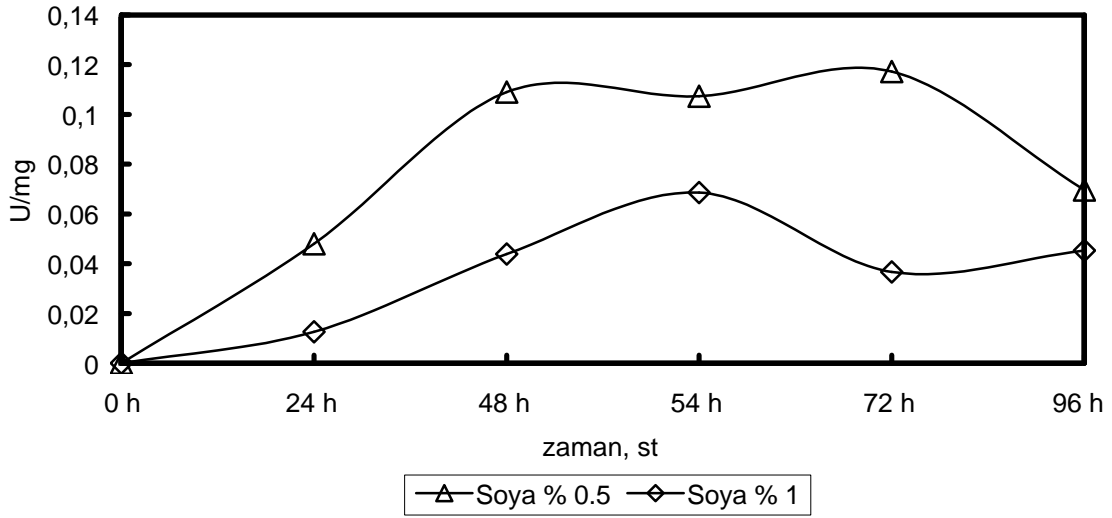
Sekil 4.8 Çesitli derisimlerde soya yaginin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.9 Çesitli derisimlerde soya yaginin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi

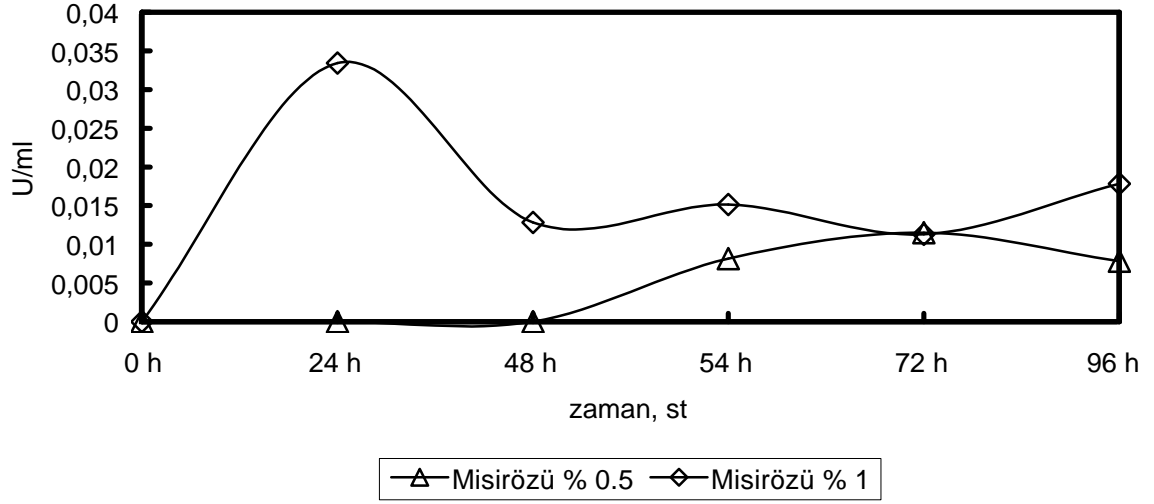
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.10 Çesitli derisimlerde soya yaginin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

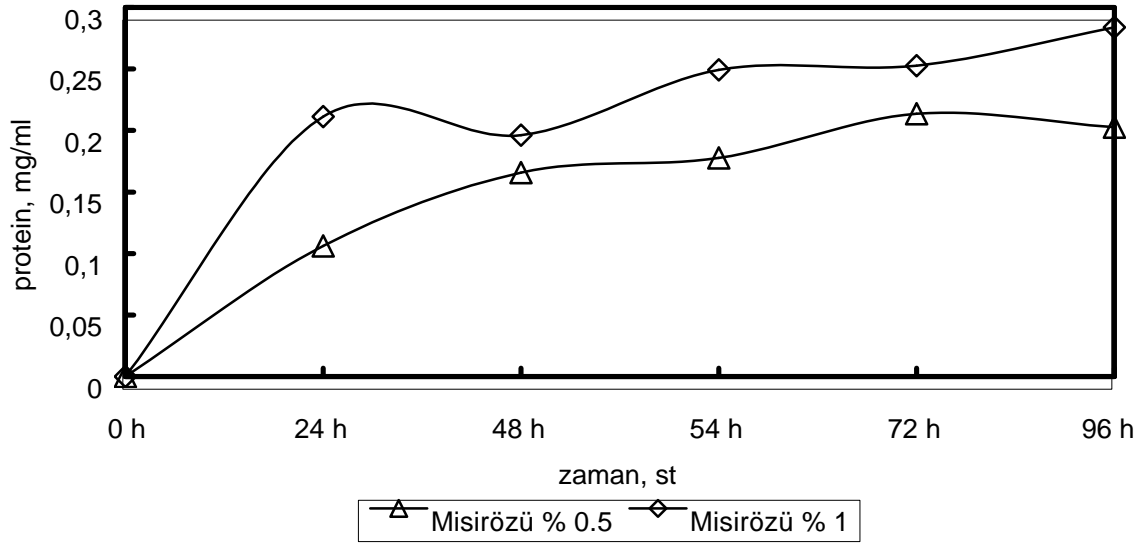
### ***Misir Özü Yagi Etkisi***

Lipaz üretiminde misir özü yaginin etkisi % 0.5 ve % 1 derisimleri için incelenmiştir. Misir özü yagi ile ulasilan aktiviterler incelendiginde; yag derisimi % 1 oldugunda t=24. saatte maksimum aktiviteye ulasildiği görülmektedir. Yag derisimi % 0.5'e indirildiginde maksimum aktiviteye t=72. saatte ulasilmaktadır (Sekil 4.11). En yüksek protein miktarina % 1 derisimde misir özü yagi kullanildiginda ulasilmistir (Sekil 4.12). Spesifik aktiviterler incelendiginde protein derisimlerinden kaynakli bir farklılasma görülmemekte ve yag derisimi % 1 oldugunda t=24. saatte maksimum spesifik aktiviteye ulasildiği görülmektedir. Yag derisimi % 0.5'e indirildiginde maksimum spesifik aktiviteye t=72. saatte ulasilmaktadır (Sekil 4.13).



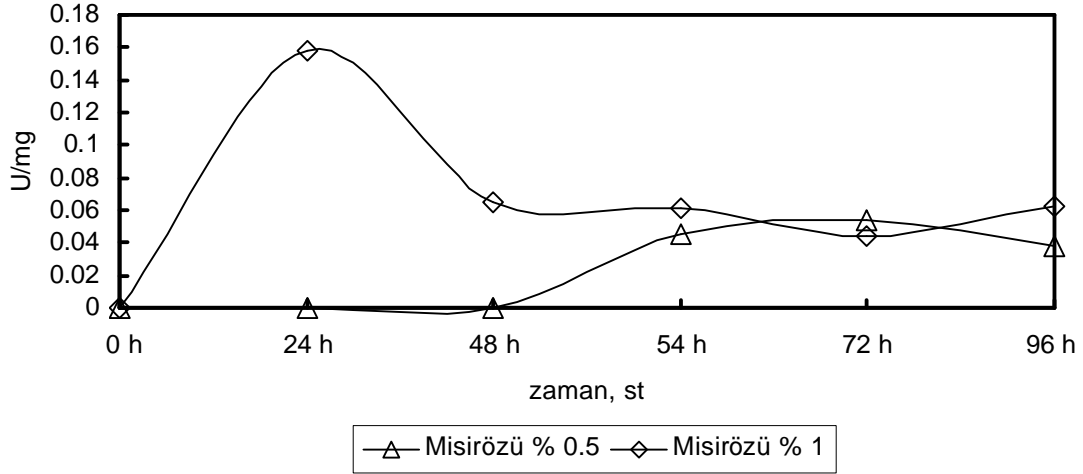
Sekil 4.11 Çesitli derisimlerde misir özü yaginin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.12 Çesitli derisimlerde misir özü yaginin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi

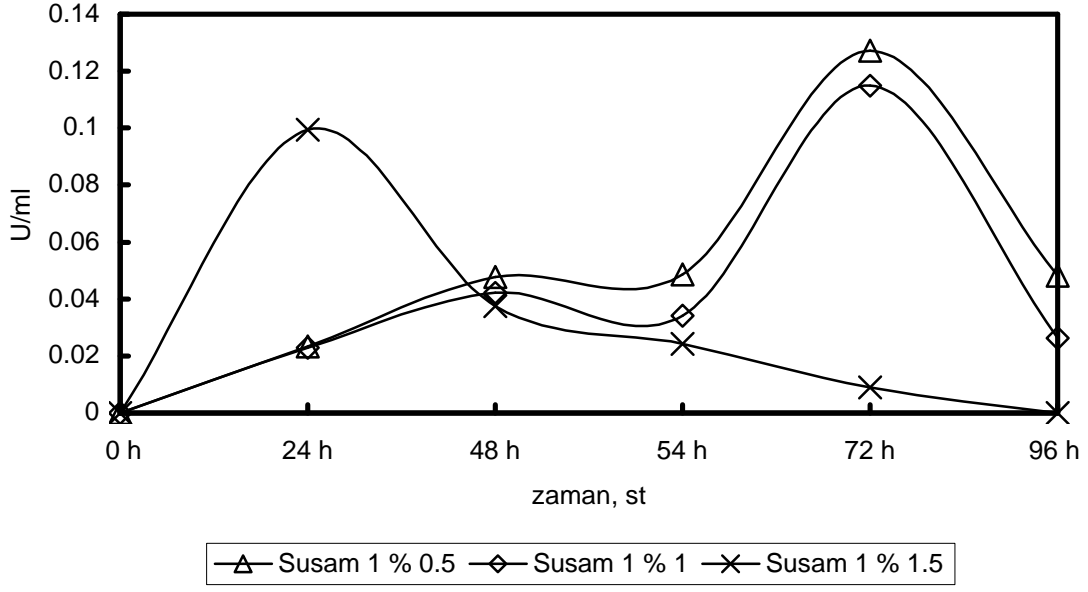
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



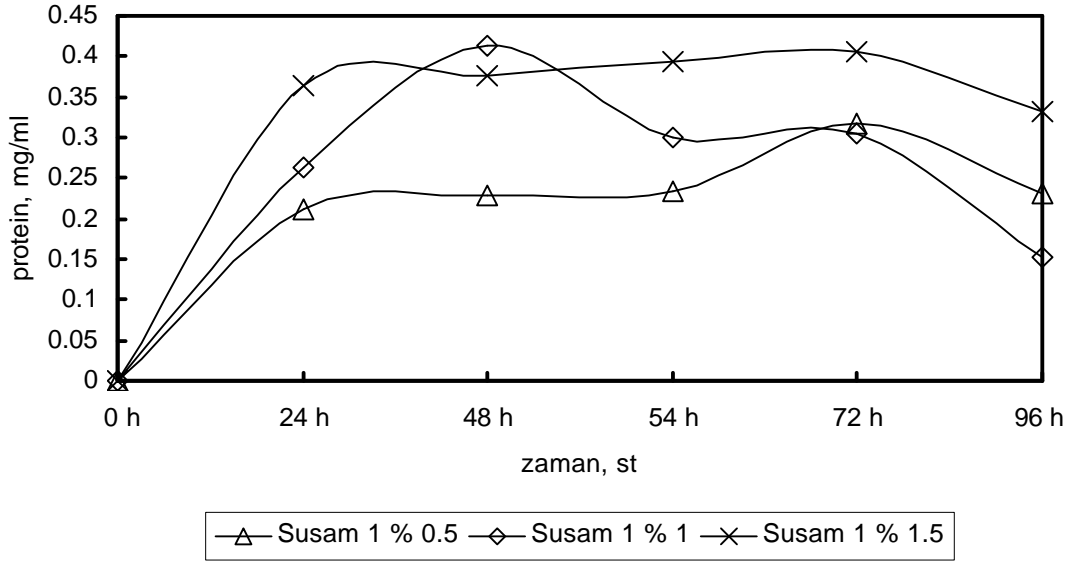
Sekil 4.13 Çeşitli derisimlerde misir özü yağının spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

### ***Susam Yağı (1) Etkisi***

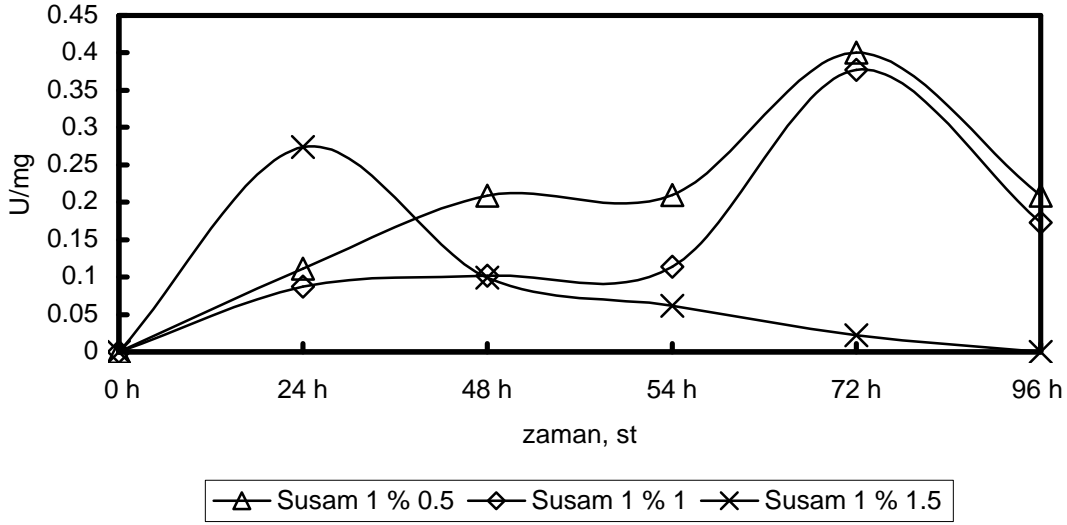
Lipaz üretiminde susam yağı (1)'in etkisi % 0.5, % 1 ve % 1.5 derisimleri için incelenmiştir. Susam yağı (1) sonuçları incelendiğinde; yağ derisimi % 0.5 olduğunda t=72. saatte maksimum aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Bunu sırasıyla yine t=72. saatte % 1, t=24. saatte % 1.5 derisiminde susam yağı (1) izlemektedir. Yağ derisimi % 1.5'a çıkarıldığında substrat inhibisyonu etkisi ile aktivitede düşme gözlenmiştir (Sekil 4.14). Protein en fazla % 1 derisimde susam yağı (1) kullanıldığında oluşmuştur (Sekil 4.15). Spesifik aktiviteler incelendiğinde ise; yağ derisimi % 0.5 olduğunda t=72. saatte maksimum spesifik aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Bunu sırasıyla yine t=72. saatte % 1, t=24. saatte % 1.5 derisiminde susam yağı (1) izlemektedir. Susam yağı (1) lipaz aktiviteleri ve spesifik lipaz aktiviteleri sonuçları arasında protein derisimlerinden kaynaklı bir farklılaşma görülmemekte ve benzer sonuçlar gözlenmektedir (Sekil 4.16).



Sekil 4.14 Çesitli derisimlerde susam yagi (1)'in lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.15 Çesitli derisimlerde susam yagi (1)'in toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

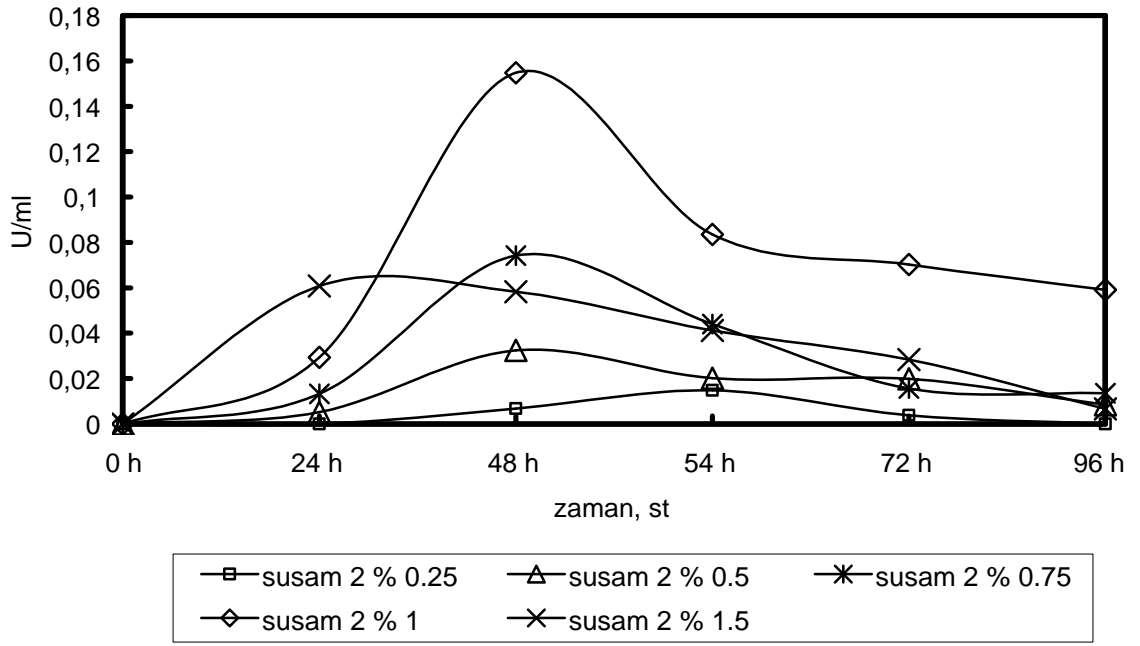


Sekil 4.16 Çesitli derisimlerde susam yagi (1)'in spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

### ***Susam Yagi (2) Etkisi***

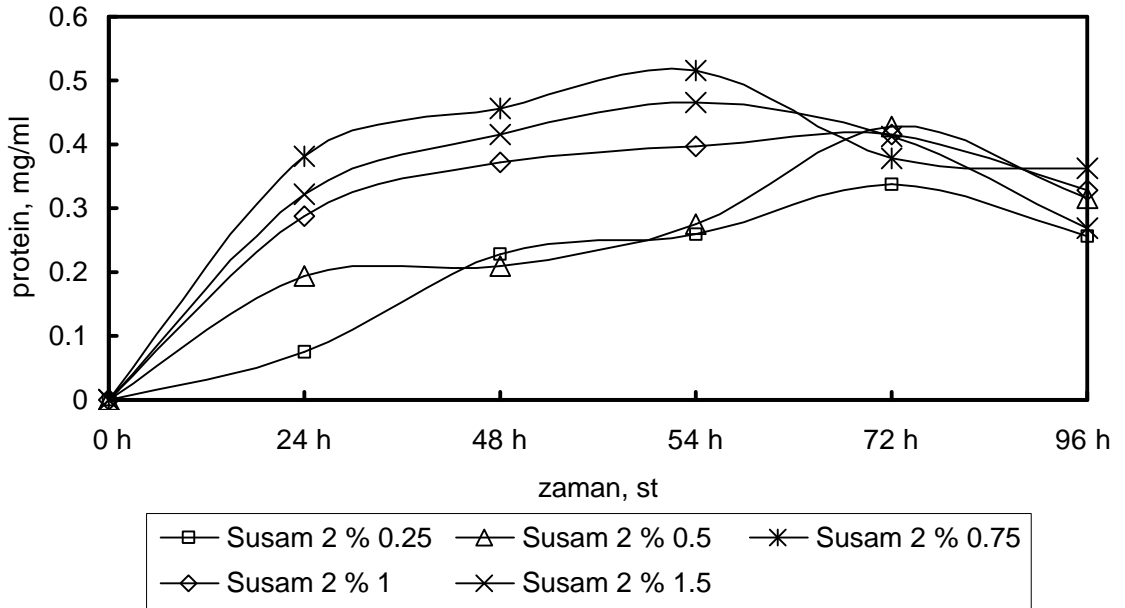
Lipaz üretiminde susam yagi (2)'nin etkisi % 0.25, % 0.5, % 0.75, % 1 ve % 1.5 derisimleri için incelenmiştir. Susam yagi (2) sonuçları incelendiğinde; aktivite bakımından yağ derisimi % 1 olduğunda t=48. saatte maksimum aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Bunu sırasıyla yine t=48. saatte % 0.75, t=24. saatte % 1.5, t=48. saatte % 0.5, t=54. saatte % 0.25 derisiminde susam yagi (2) izlemektedir. Yağ derisimi % 1.5'e çıkarıldığında substrat inhibisyonu etkisi ile aktivitede düşme gözlenmiştir (Sekil 4.17). Protein derisimleri içerisinde en yüksek değere % 0.75 derisimde susam yagi (2) kullanıldığında ulaşılmıştır (Sekil 4.18). Spesifik aktiviteler incelendiğinde; yağ derisimi % 1 olduğunda t=48. saatte maksimum spesifik aktiviteye ulaşıldığı görülmektedir. Bunu sırasıyla t=24. saatte % 1.5, t=48. saatte % 0.75, t=48. saatte % 0.5, t=54. saatte % 0.25 derisiminde susam yagi (2) izlemektedir. Susam yagi (2) lipaz aktiviteleri ve spesifik lipaz aktiviteleri sonuçları arasında protein derisimlerinden kaynaklı bir farklılaşma görülmemekte ve benzer sonuçlar gözlenmektedir (Sekil 4.19). Spesifik aktivite sonuçları % 1 derisiminde susam yagi (2) kullanımının en yüksek lipaz üretimi ile sonuçlandığını desteklemektedir. Susam yagi (2) kullanıldığında yüksek lipaz enzim aktivitesi değerleri yanında, maksimum değerlere erken saatlerde (t=48) ulaşılması karbon kaynağı olarak en uygun yağ kullanımının % 1 derisiminde susam yagi (2) olduğunu göstermektedir.





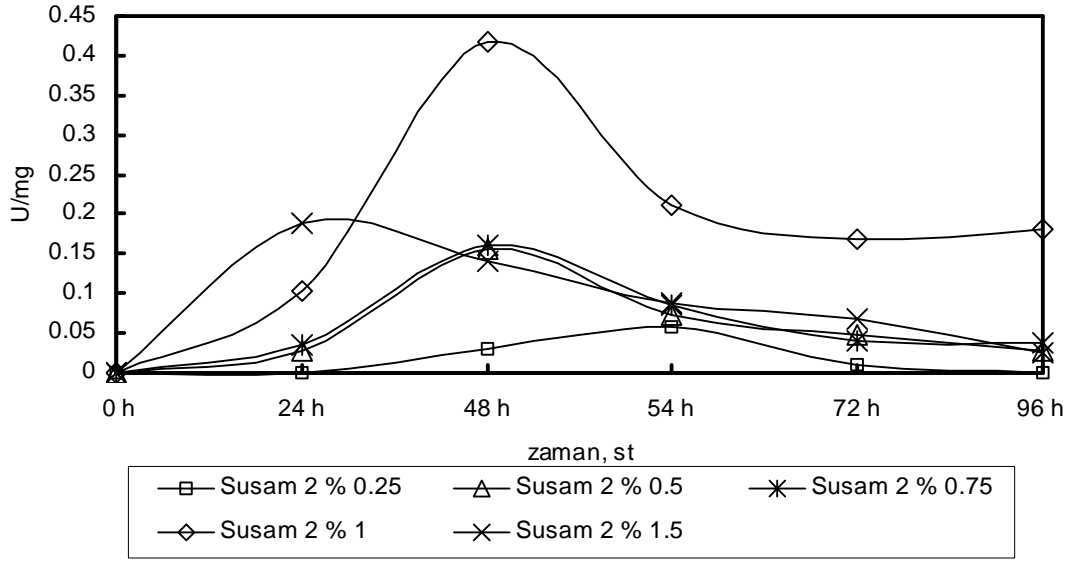
Sekil 4.17 Çesitli derisimlerde susam yagi (2)'nin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.18 Çesitli derisimlerde susam yagi (2)'nin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



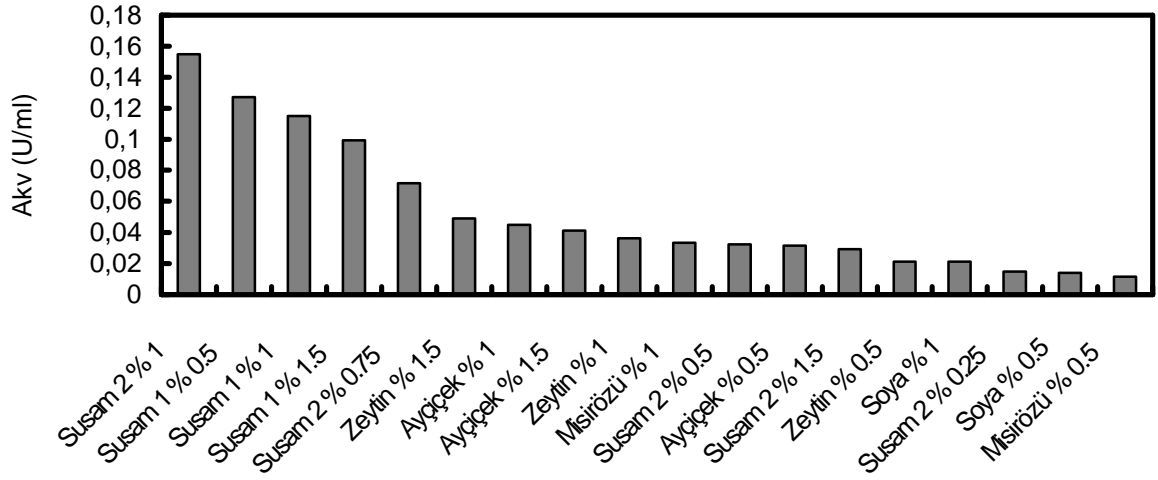
Sekil 4.19 Çesitli derisimlerde susam yagi (2)'nin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

### Karbon Kaynagi Olarak Bitkisel Yağların Karsilastirilmesi

Karbon kaynagi olarak kullanılan bitkisel yağlar birbirleri ile kiyaslanacak olursa; aktivite ve spesifik aktivite bakımından en uygun bitkisel yağın % 1 derisimdeki susam (2) yağı olduğu görülmektedir (0.155 U/ml; 0.416 U/mg). Aktivite bakımından susam (2) yağını, susam yağı (1) izlemektedir (0.127 U/ml; 0.401 U/mg). Lipaz üretimini en az indükleyen bitkisel yağın ise % 0.5 derisimindeki misir özü yağı olduğu bulunmuştur (0.012 U/ml; 0.054 U/mg). Bir siralama yapılacak olursa; susam yağlarını sirasiyla zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı ve misir özü yağı izlemektedir (Sekil 4.20 ve 21).

Lipaz üretiminde önemli etkenlerden biri olan bitkisel yağların ve derisimlerinin etkisinin yorumlanabilmesi için gaz kromatografisi ile yağ analizleri yaptırılmıştır. Sonuçlar Ek 11'de verilmektedir (Yağ analizleri Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yapılmıştır).

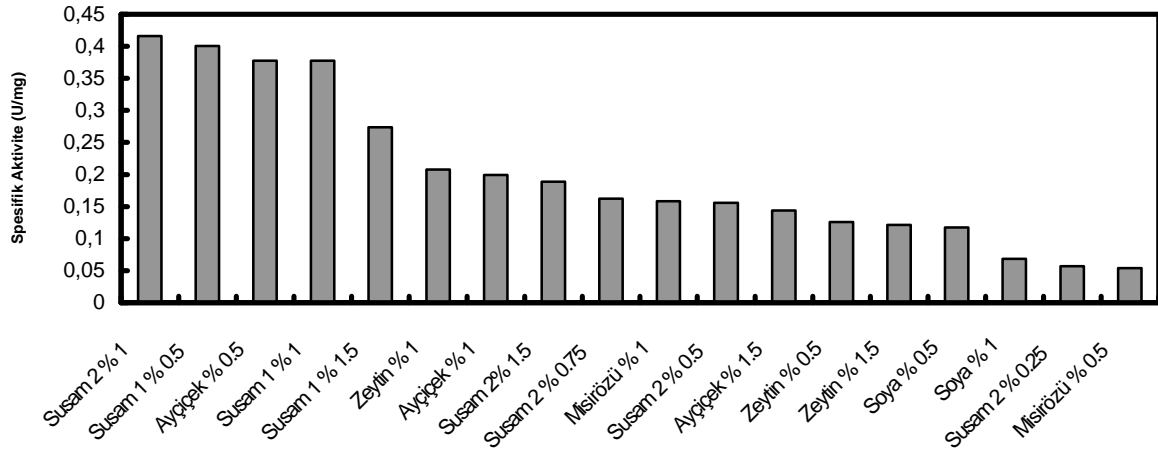
### Bitkisel Yağların Etkisi



Sekil 4.20 Karbon kaynağı olarak kullanılan çeşitli bitkisel yağlar ile elde edilen en yüksek lipaz aktiviteleri (U/ml)

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

### Bitkisel Yağların Etkisi



Sekil 4.21 Karbon kaynağı olarak kullanılan çeşitli bitkisel yağlar ile ulaşılan en yüksek spesifik aktiviteler (U/mg)

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

#### 4.2.1.2 Yag Asidi ve Esterlerinin Etkisi

Bitkisel yağların temel bileşenleri olan yağ asitlerinin ve yağ asitlerinin esterlerinin lipaz üretimine etkisi asetik asit hariç (pH değerini çok düşürdüğü için) % 1 derisimleri için incelenmiştir. Asetik asit etkisi ise % 0.1 ve % 0.5 derisimleri için incelenmiştir.

#### *Yag Asidi Esterlerinin Etkisi*

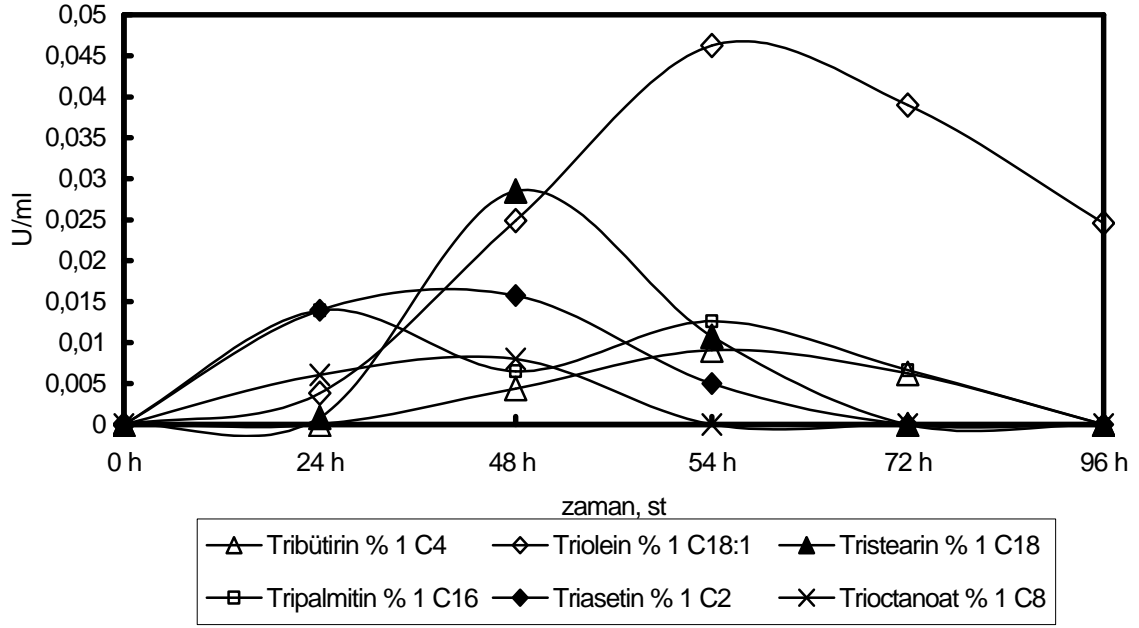
Yağ asidi esterlerinin etkisini incelemek üzere % 1 derisiminde triasetin, tribütirin, trioktanoat, tripalmitin, tristearin ve triolein kullanılmıştır. Kullanılan yağ asidi esterlerinin karbon sayıları aşağıda çizelge halinde verilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan yağ asidi esterlerinin bazı özellikleri

<i>YAG ESTERİ</i>	<i>DERISİM</i>	<i>KARBON SAYISI</i>
Triasetin	% 1	C2
Tribütirin	% 1	C4
Trioktanoat	% 1	C8
Tripalmitin	% 1	C16
Tristearin	% 1	C18:0
Triolein	% 1	C18:1

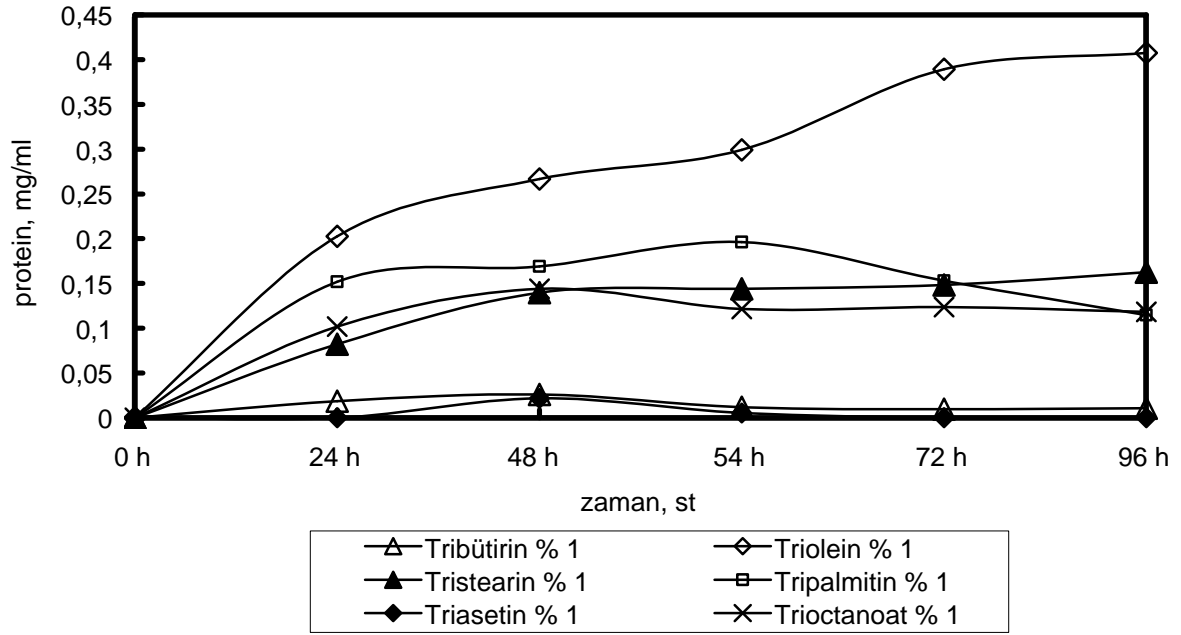
Yağ esterleri içerisinde en yüksek aktivite değerine t=54. saatte triolein içeren ortamda ulaşılmıştır. Daha sonra sırası ile t=48 saatte tristearin, t=48 saatte triasetin, t=54 saatte tripalmitin, t=54 saatte tribütirin, t=48 saatte trioktanoat içeren ortamlar yer almaktadır (Şekil 4.22). Protein derisimleri içerisinde de en yüksek değere triolein kullanıldığında ulaşılmıştır (Şekil 4.23). Spesifik aktiviteler incelendiğinde, protein derisimlerinden gelen farklılaşma nedeniyle t=54. saatte triasetin kullanımında maksimum spesifik aktivite değerine ulaşılmıştır. Bunu sırasıyla t=54. saatte tribütirin, t=48. saatte tristearin, t=54. saatte triolein, t=24. saatte tripalmitin ve trioktanoat izlemektedir (Şekil 4.24). Lipaz aktiviteleri ve protein derisimlerindeki belli saatlerden sonraki azalmanın açıklanabilmesi

için bazı yağ asidi esterleri örneklerinde t=96 saatte proteaz aktivitesi tayini yapılmıştır. Triolein içeren ortamda proteaz aktivitesi 8.30 U/ml, trioktanoat içeren ortamda 7.29 U/ml, tristearin içeren ortamda 4.68 U/ml, tripalmitin içeren ortamda 7.59 U/ml olarak bulunmuştur.

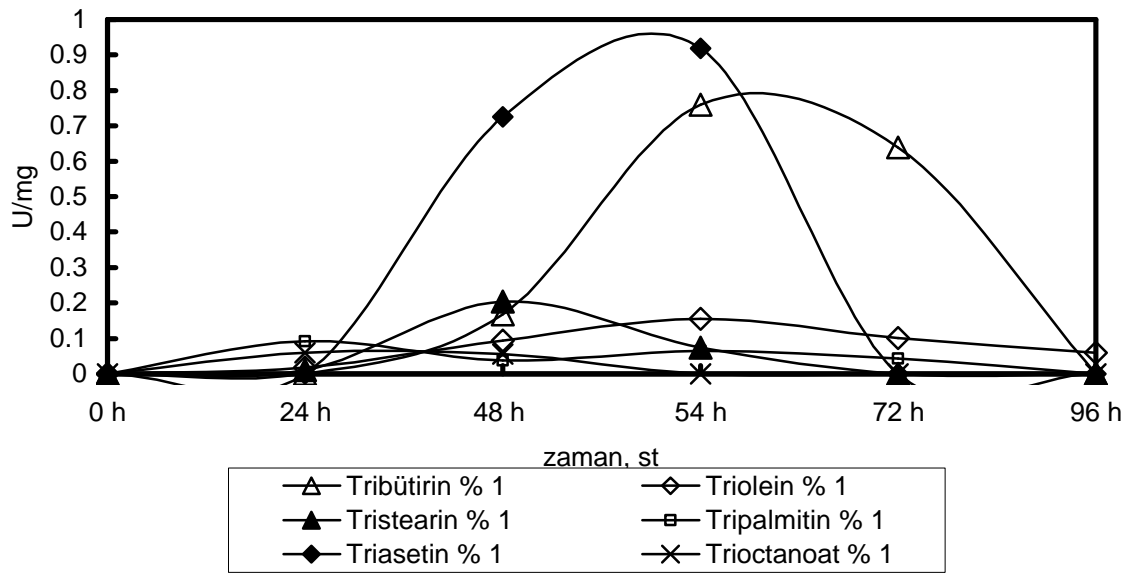


Sekil 4.22 Çeşitli yağ asidi esterlerinin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

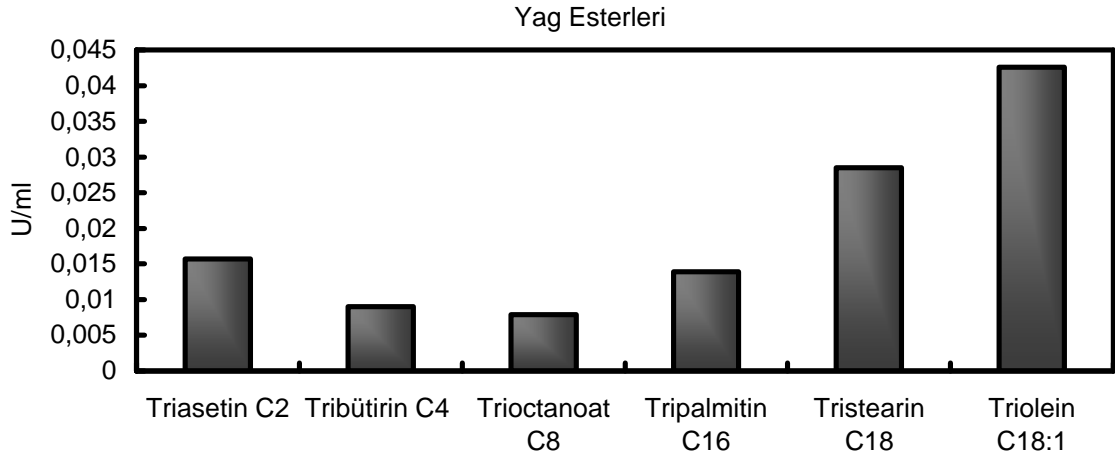


Sekil 4.23 Çesitli yag asidi esterlerinin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.24 Çesitli yag asidi esterlerinin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi  
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

Yag asitleri ile ulasilan maksimum lipaz aktiviteleri karsilastirildiginda; triasetin (0.016 U/ml) ve tribütirin (0.009 U/ml) hariç tutulursa karbon sayisi arttikça lipaz aktivitesinin de arttigi görölmektedir (trioktanoat; 0.008 (U/ml), tripalmitin; 0.014 (U/ml), tristearin; 0.029 (U/ml)). Esit sayıda karbon içeren, ancak yapısında çift bag bulunduran triolein (0.043 U/ml) ile düz zincirden olusan tristearin (0.029 U/ml) karsilastirildiginda triolein içeren ortamda enzim üretiminin daha yüksek seviyede oldugu görölmüştür (Sekil 4.25).



Sekil 4.25 Yag asidi esterlerinin maksimum lipaz aktivitelerinin karsilastirilmesi (U/ml)

### *Yag Asitlerinin Etkisi*

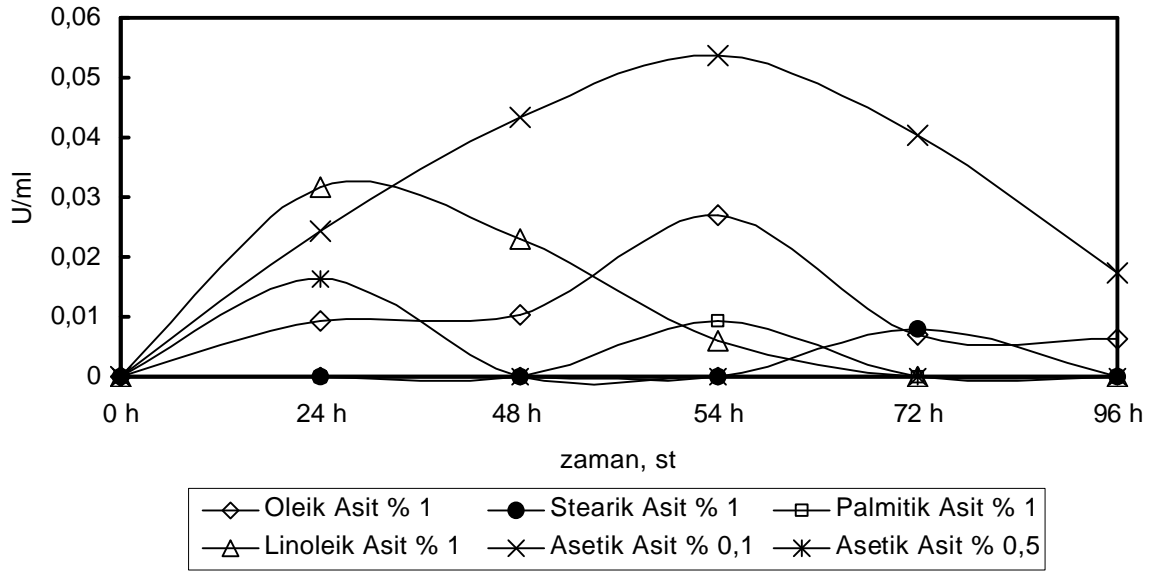
Yag asitlerinin etkisini incelemek üzere % 1 derisiminde palmitik asit, stearik asit, oleik asit ve linoleik asit kullanilmistir. Asetik asit etkisi ise % 0.1 ve % 0.5 derisimleri için incelenmistir. Kullanilan yag asitlerinin bazi özellikleri ve deneysel kosullar asagida çizelge halinde verilmistir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Yag asitlerinin bazi özellikleri

YAG ASIDI	KARBON SAYISI	MOLEKÜL FORMÜLÜ	DENEYSEL KOSULLAR	
			BASLANGIÇ pH'I	BASLANGIÇ DERISIMI (h/h)
Asetik Asit	C2	CH <sub>3</sub> COOH	7.30	% 0.1
Asetik Asit	C2	CH <sub>3</sub> COOH	4.60	% 0.5
Palmitik Asit	C16	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	7.35	% 1
Stearik Asit	C18	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	7.34	% 1
Oleik Asit	C18:1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	7.15	% 1
Linoleik Asit	C18:2	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	7.20	% 1

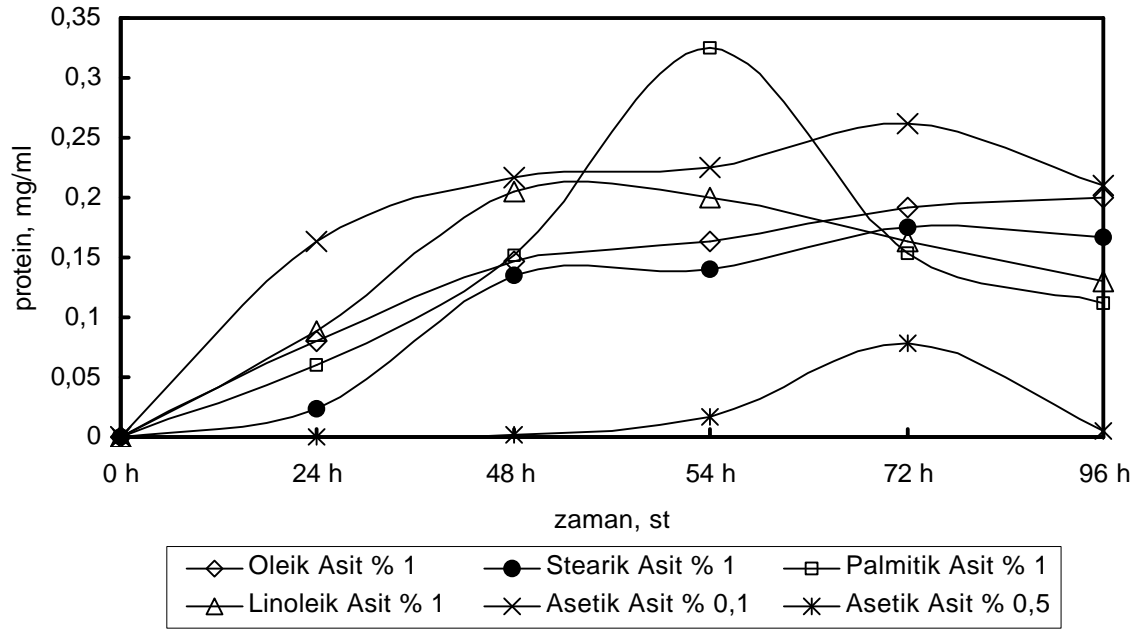
Yag asitleri içerisinde en yüksek aktivite degerine t=54. saatte % 0.1 asetik asit içeren ortamda ulasilmistir. Daha sonra sirasi ile t=24 saatte linoleik asit, t=54 saatte oleik asit, t=24 saatte asetik asit (% 0.5), t=54 saatte palmitik asit, t=72 saatte stearik asit içeren ortamlar yer almaktadır (Sekil 4.26). Protein derisimleri içerisinde en yüksek degere palmitik asit kullanildiginda ulasilmistir (Sekil 4.27). Spesifik aktiviteler incelendiginde, protein derisimlerinden gelen farklılaşma nedeniyle t=24. saatte linoleik asit kullanımında maksimum spesifik aktivite degerine ulasilmistir. Bunu sirasiyla t=54. saatte asetik asit (% 0.1), t= 54. saatte oleik asit, t=72. saatte stearik asit, t=54. saatte palmitik asit izlemektedir (Sekil 4.28).





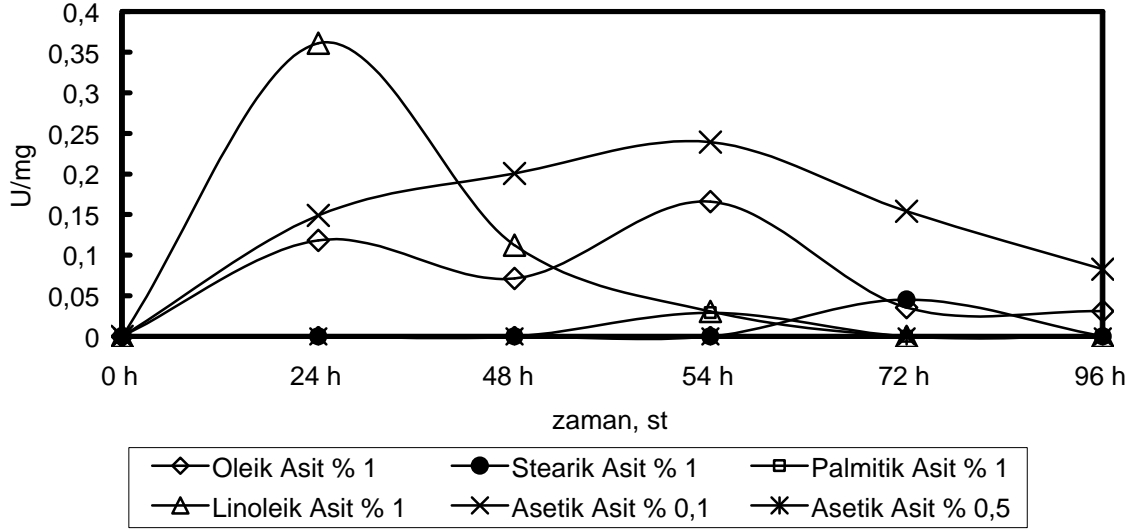
Sekil 4.26 Çesitli yağ asitlerinin lipaz aktivitesine (U/ml) etkisi

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.27 Çesitli yağ asitlerinin toplam protein derisimine (mg/ml) etkisi

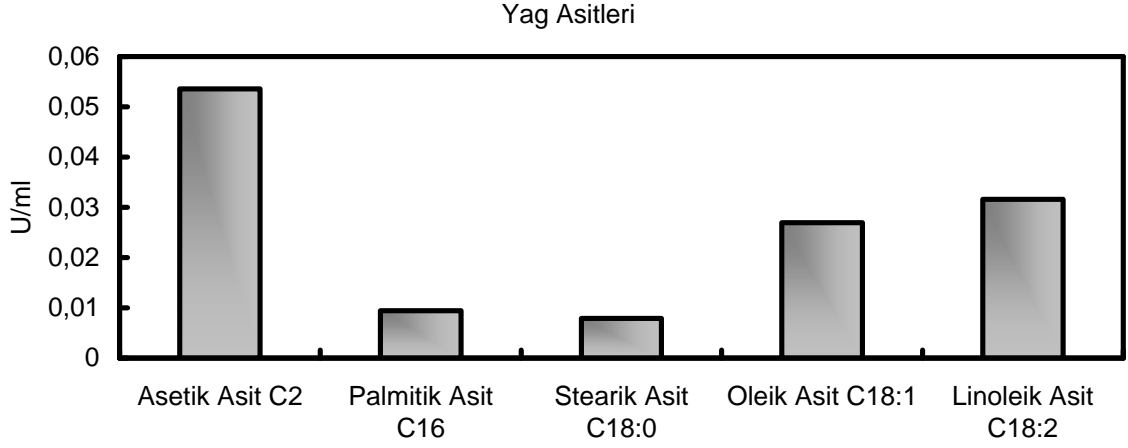
pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.28 Çesitli yag asitlerinin spesifik lipaz aktivitesine (U/mg) etkisi

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

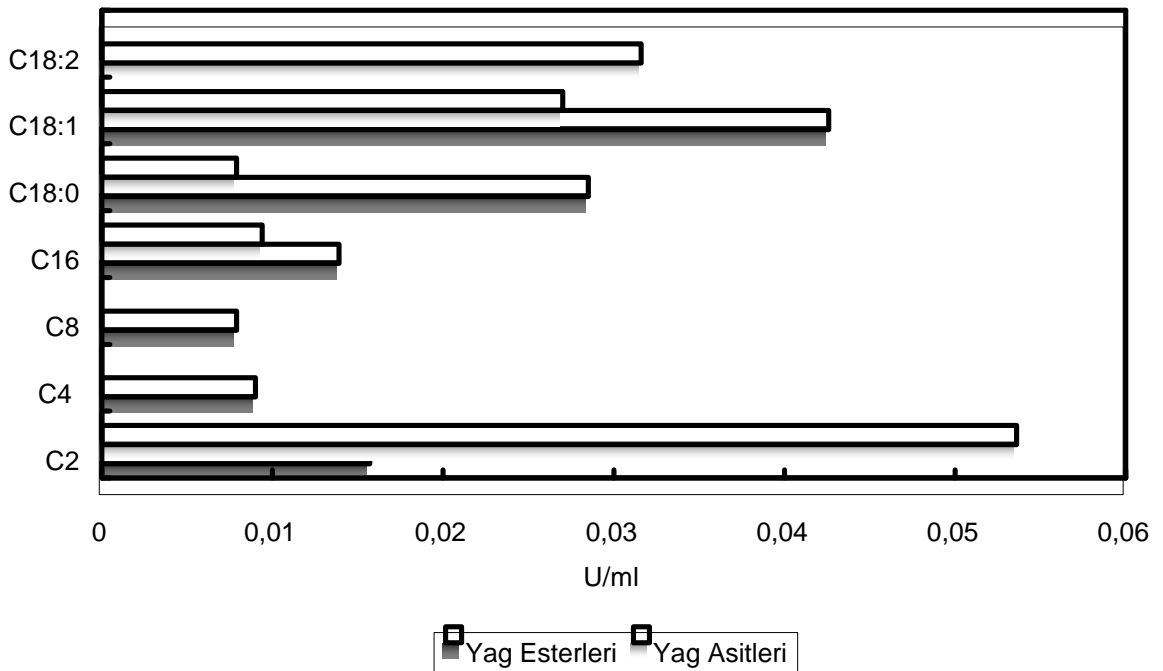
Yag asidi esterlerinin maksimum aktiviteleeri karsilastirildiginda; esit sayida karbon içeren ancak yapısında çift bag bulunduran oleik asit ve linoleik asit ile düz zincirden oluşan stearik asit karsilastirildiginda; iki çift bage sahip linoleik asit içeren ortamda enzim üretiminin daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür (0.032 U/ml). Daha sonra tek çift bag bulunduran oleik asit (0.027 U/ml) ve en sonda da düz bir zincirden oluşan stearik asit (0.008 U/ml) bulunmaktadır. Palmitik asit içeren ortamın lipaz aktivitesi; 0.010 (U/ml) olarak bulunmuştur ve en yüksek lipaz aktivitesi degerine % 0.1 asetik asit kullanımında ulasilmistir (0.054 U/ml) (Sekil 4.29).



Sekil 4.29 Yag asitlerinin maksimum lipaz aktivitelerinin (U/ml) karsilastirilmesi

#### *Yag Asitleri ve Esterlerinin Karsilastirmasi*

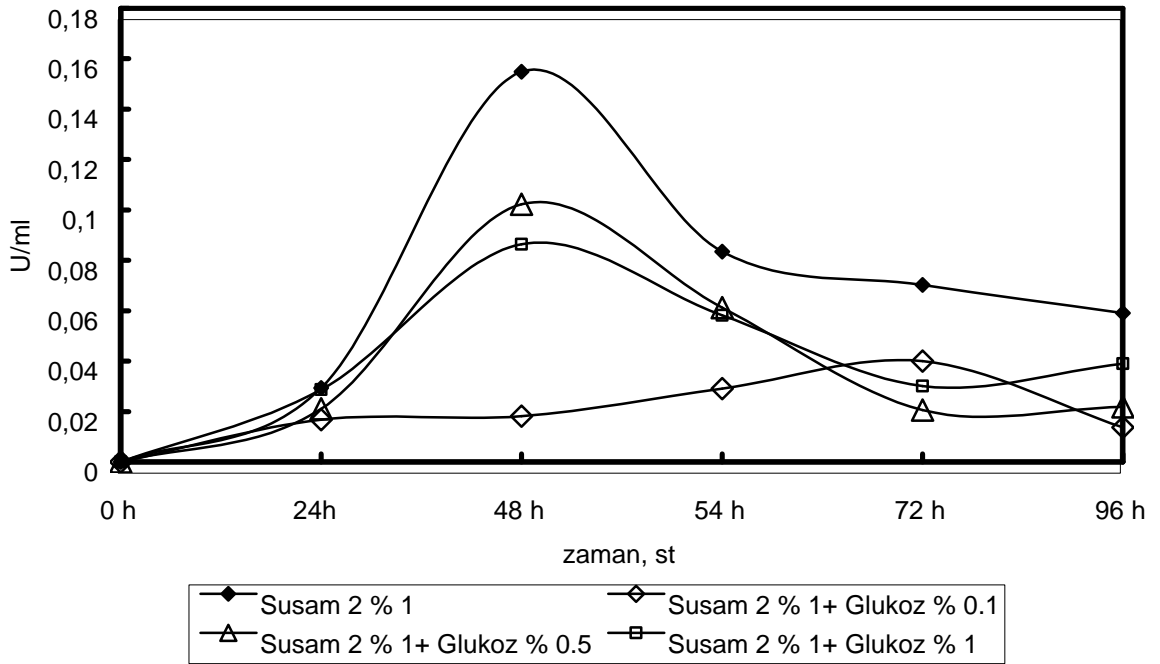
Karbon kaynagi olarak ayni derisimlerde, esit sayida karbon içeren yag asitleri ve yag esterleri karsilastirildiginda; triasetin disindaki yag asidi esterleri kullaniminin, yag asidi kullanımına oranla daha fazla aktivite verdigi görülmüştür. Asetik asit kullanımında ise, diger yag asitlerinin aksine, yag asidi esterinden daha yüksek aktiviteye ulasilmistir (Sekil 4.30).



Sekil 4.30 Çesitli yag asitleri ve esterleri ile ulasilan lipaz aktiviteleri (U/ml)

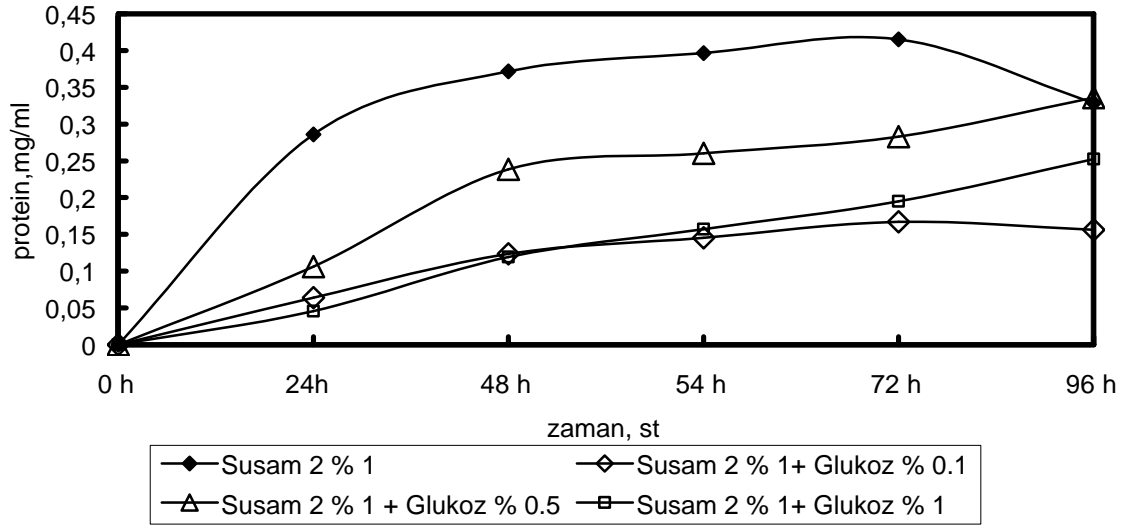
#### 4.2.1.3 Karbon Kaynagi Olarak Glukozun Etkisi

En uygun karbon kaynagi olarak seçilen % 1 derisiminde susam yagi (2)'ye ilave olarak lipaz üretim ortamına, % 0.1, % 0.5 ve % 1 derisimlerinde glukoz eklenerek lipaz aktivitesine etkileri incelenmiştir. Tüm derisimlerde ortama ilave edilen glukozun, lipaz aktivitesine olumsuz etki yaptığı görülmüştür (Sekil 4.31). Protein derisimleri içerisinde en yüksek degere ortamda glukoz olmadığı zaman ulaşmıştır (0.155 U/ml). Glukoz içeren ortamlarda ise en yüksek derisim, aktivite degerinde olduğu gibi % 0.5 glukoz kullanıldığında belirlenmiştir (0.102 U/ml) (Sekil 4.32). Spesifik aktiviteler incelendiğinde ise protein derisimlerinden gelen farklılık nedeniyle % 1 ve % 0.5 derisiminde glukoz ilavesinin olumlu etki yaptığı görülmüştür (Sekil 4.33).



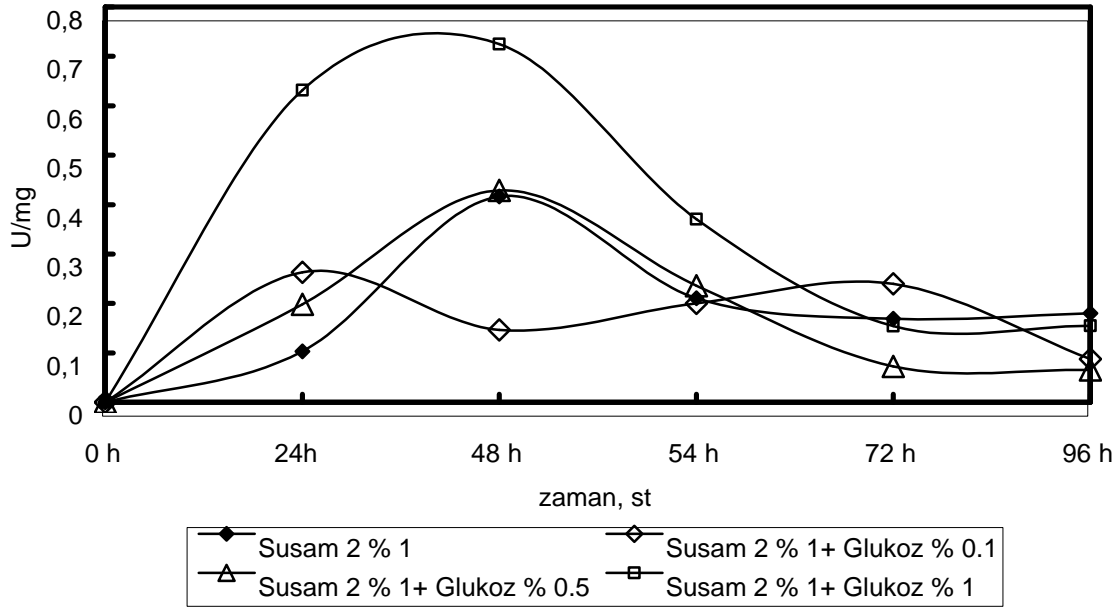
Sekil 4.31 Susam yagi (2)'ye ek olarak ortama eklenen çeşitli derisimlerde glukozun lipaz aktivitesine etkisi (U/ml)

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.32 Susam yagi (2)'ye ek olarak ortama eklenen çeşitli derisimlerde glukozun toplam protein derisimine etkisi (mg/ml)

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

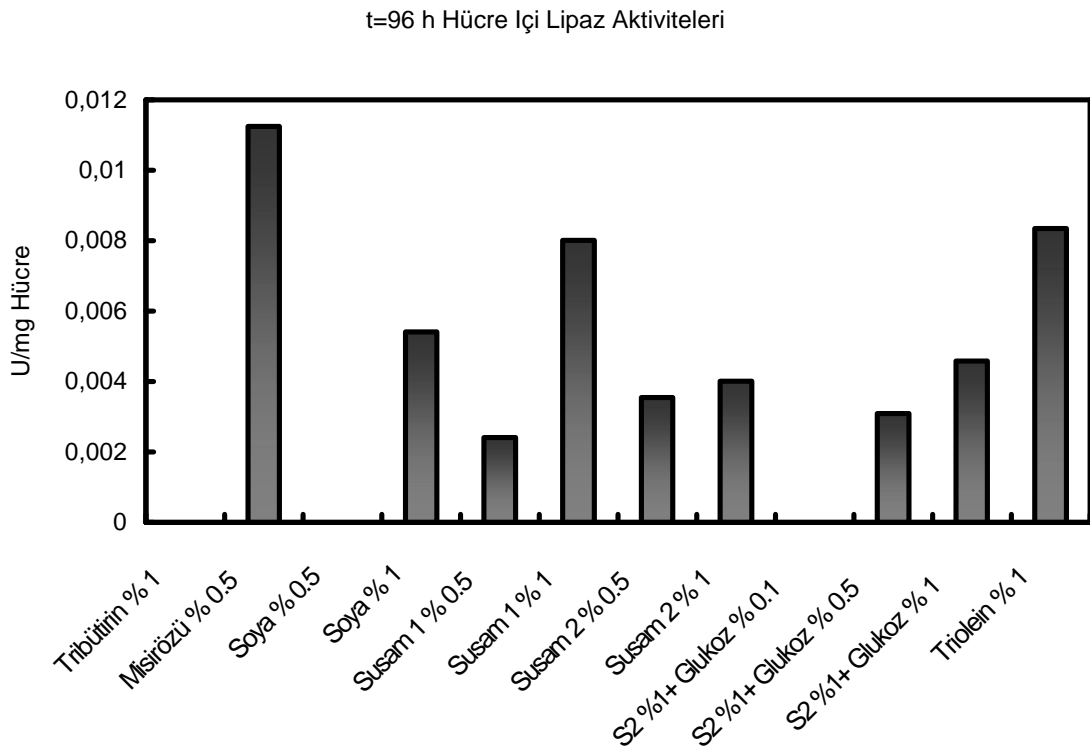


Sekil 4.33 Susam yagi (2)'ye ek olarak ortama eklenen çeşitli derisimlerde glukozun spesifik lipaz aktivitesine etkisi (U/mg)

pH=7.5, T=37 °C, N=150 rpm, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

#### 4.2.1.4 Bazı Karbon Kaynaklarının Hücre İçi Lipaz Aktivitesine Etkisi

Kullanılan bazı substratlar için hücre içi lipaz aktiviteleri incelendiğinde, hücre içerisinde tutulan lipaz aktivitelerinin hücre dışına salgılanan enzime oranla çok düşük seviyelerde kaldığı görülmüştür. Hücre içi lipaz aktiviteleri incelendiğinde; hücre dışı lipaz aktivitesi çok düşük olan % 0.5 mısır özü yağı ile en yüksek hücre içi lipaz aktivitesi (0.011 U/mg hücre) elde edilmiştir. Bunu sırasıyla % 1 triolein (0.0084 U/mg hücre), % 1 susam yağı (1) (0.008 U/mg hücre), % 1 soya yağı (0.005 U/mg hücre), susam yağı (2) ve % 1 glukoz (0.0046 U/mg hücre), % 1 susam yağı (2) (0.004 U/mg hücre), % 0.5 susam yağı (2) (0.0036 U/mg hücre), susam yağı (2) ve % 0.5 glukoz (0.003 U/mg hücre), % 0.5 susam yağı (1) (0.002 U/mg hücre) izlemektedir. Susam yağı (2) ve % 0.1 glukoz, % 0.5 soya yağı ve % 1 tribütirin içeren ortamlarda hücre içi lipaz aktivitesi saptanmamıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34 Çeşitli karbon kaynakları içeren ortamların t=96. saatte hücre içi lipaz aktiviteleri (U/mg Hücre)

#### 4.2.1.5 Karbon Kaynakları Etkisi İncelenen Ortamlarda Ulaşılan Hücre Derisimleri

Hücre derisimlerini saptamak amacı ile % 0.5 asetik asit içeren ortam hariç absorbansın  $\lambda=600$  nm'de 1 değerinin üzerinde okunması sebebi ile 8 ile 15 kat arası seyreltme yapılmıştır. Daha sonra kalibrasyon grafiği kullanılarak yapılan hesaplamada seyreltme oranı ile bulunan değerler çarpılarak g/L değerinde hücre miktarı hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde lipaz aktiviteleri ile hücre miktarları arasında belirgin bir bağlantı bulunamamıştır. Bitkisel yağlar içerisinde en yüksek hücre derisimine % 1 derisimde susam yağı (2) kullanıldığında (2.489 g/L), en düşük hücre derisimine ise % 0.5 derisimde zeytin yağı kullanıldığında (0.369 g/L) ulaşılmıştır. Yağ asitleri içerisinde en yüksek hücre derisimine % 1 derisimde oleik asit kullanıldığında (2.489 g/L), en düşük hücre derisimine ise % 0.5 derisimde asetik asit kullanıldığında (0.050 g/L) ulaşılmıştır. Yağ asidi esterleri içerisinde en yüksek hücre derisimine derisimde triolein kullanıldığında (2.587 g/L), en düşük hücre derisimine ise triasetin kullanıldığında (0.088 g/L) ulaşılmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Karbon kaynakları etkisi incelenen ortamlarda ulaşılan hücre derisimleri

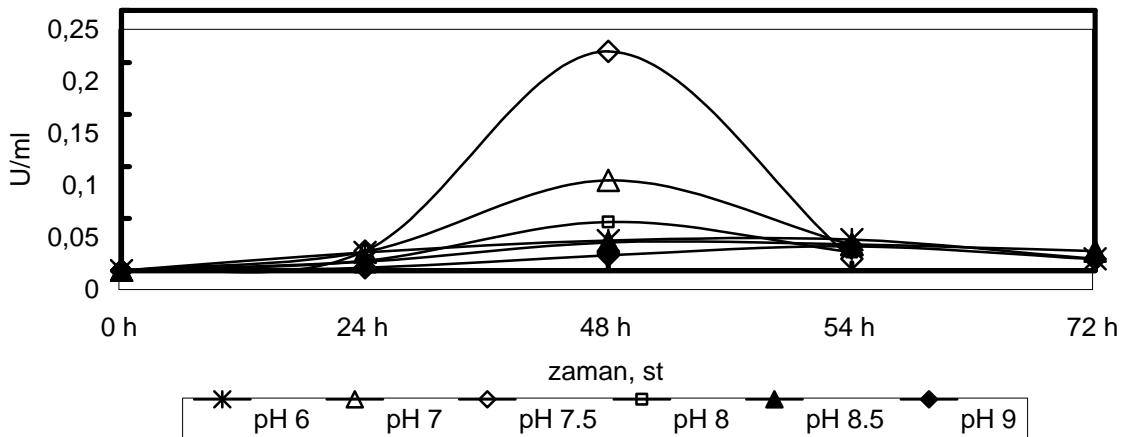
<b>KARBON KAYNAGI</b>	<b>g/L Hücre (t=96 h)</b>
Misirözü % 0.5	1.665
Misirözü % 1	0.778
Soya % 0.5	1.144
Soya % 1	2.406
Zeytin % 0.5	0.369
Zeytin % 1	1.094
Zeytin % 1.5	2.451
Ayçiçek % 0.5	0.681
Ayçiçek % 1	1.085
Ayçiçek % 1.5	1.083
Susam (1) % 0.5	1.267
Susam (1) % 1	1.619
Susam (1) % 1.5	1.986
Susam (2) % 0.25	0.568
Susam (2) % 0.5	1.081
Susam (2) % 0.75	1.342
Susam (2) % 1	2.489
Susam (2) % 1.5	1.873
Susam 2 % 1+ Glukoz % 0.1	0.596
Susam 2 % 1+ Glukoz % 0.5	1.320
Susam 2 % 1+ Glukoz % 1.0	1.217
Oleik Asit % 1	2.489
Stearik Asit % 1	0.772
Palmitik Asit % 1	0.425
Linoleik Asit % 1	1.858
Asetik Asit % 0.1	1.782
Asetik Asit % 0.5	0.050
Tribütirin % 1	0.606
Triolein % 1	2.587
Tristearin % 1	0.342
Tripalmitin % 1	0.400
Triasetin % 1	0.088
Trioctanoat % 1	0.626



#### 4.2.2 pH Etkisi

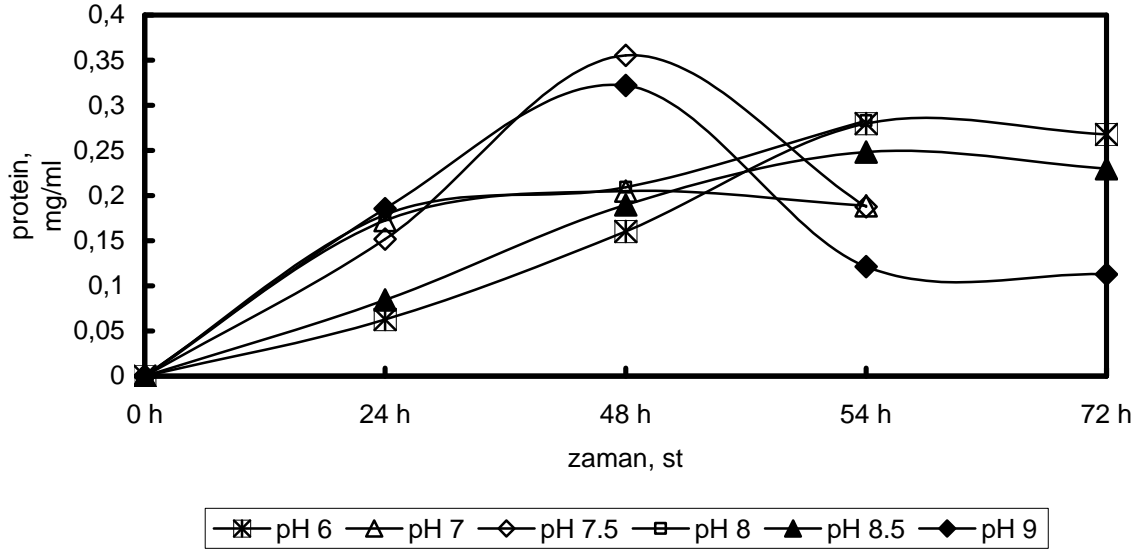
Lipaz üretimine önemli etkisi bulunan faktörlerden biri olan pH etkisi 6, 7, 7.5, 8, 8.5 ve 9 değerleri için incelenmiştir. Ortamın pH değeri; 6, 7, 7.5, 8 için Fosfat tamponu (0.1 M) ile, 8.5 ve 9 için Borat tamponu ile ayarlanmıştır (Dawson vd. 2002). Parametre içerisinde tüm deneyler; T=37 °C, N=150 rpm koşullarında, karbon kaynağı olarak % 1 susam yağı (2), azot kaynağı olarak % 0.5 pepton ve %0.3 maya özütü kullanılarak, 250 ml erlenlerde 100 ml fermantasyon ortamı içerisinde gerçekleştirilmiştir. 72 saat süresince 24 saatte bir ve önemli olabileceği düşünülen ara zamanlarda steril koşullarda 2 ml örnek alınmış ve analizler yapılmıştır. Yapılan analizler spektrofotometrik lipaz aktivitesi tayini, Bradford protein analizi ve deney sonunda (72. saat) hücre derisimi ölçümüdür.

Sonuçlar incelendiğinde; pH=7.5’da t=48. saatte en yüksek aktivite değerine (0.211 U/ml) ulaşmıştır. Bunu sırasıyla t=48. saatte pH 7, t=48. saatte pH 8, t=54. saatte pH 6, t=48. saatte pH 8.5, t=54. saatte pH 9 izlemektedir. pH=7, 7.5, 8 ve 8.5 değerlerinde maksimum aktiviteye ulaşılan zaman 48 saat iken pH=6 ve 9 değerlerinde maksimum aktiviteye ulaşma zamanı uzamaktadır (Şekil 4.35). Her pH için farklı zamanlarda ulaşılan en yüksek lipaz aktivitesi değerleri bağli olarak Şekil 4.38’de verilmiştir. Protein derisimleri içerisinde en yüksek değere pH=7.5’te ulaşmıştır (Şekil 4.36). Spesifik aktiviteler incelendiğinde; protein derisimlerinden gelen farklılaşma nedeniyle pH=6 ve 9 değerlerinde yüksek spesifik aktiviteler gözlenmiş, ancak en yüksek spesifik aktivite değerine yine t=48. saatte pH=7.5’te ulaşmıştır (0.592 U/mg) (Şekil 4.37).



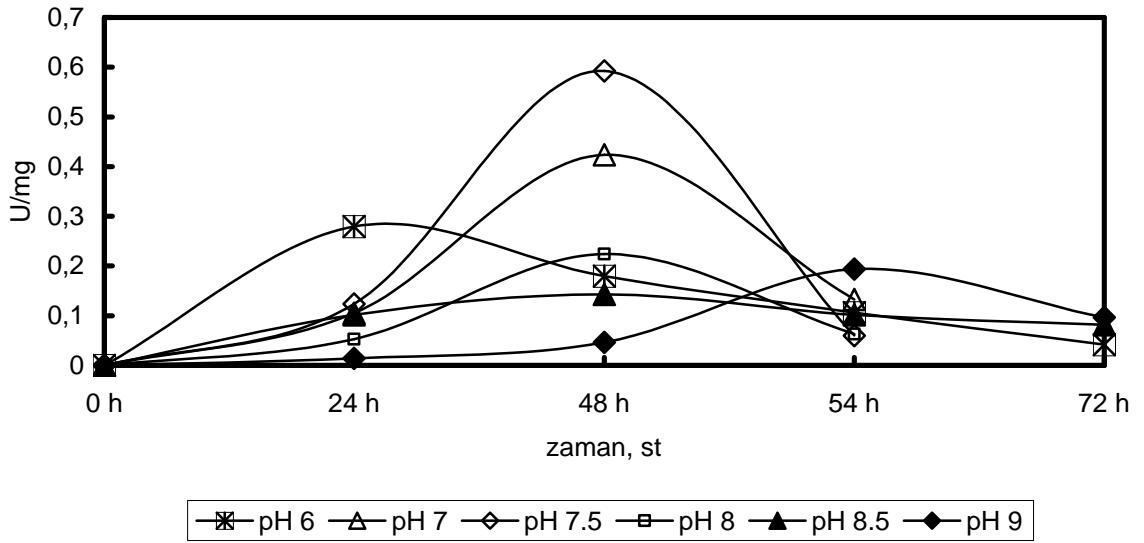
Şekil 4.35 Farklı pH değerlerinde lipaz aktivitelerinin zaman ile değişimi

T=37 °C, N=150 rpm, Karbon kaynağı; Susam (2) yağı, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



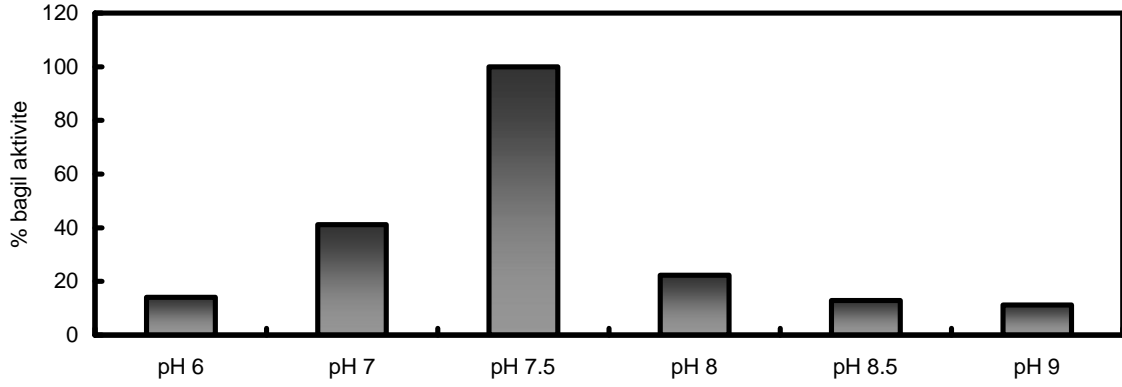
Sekil 4.36 Farkli pH degerlerinde protein derisimlerinin zaman ile degisimi degisimi

T=37 °C, N=150 rpm, Karbon kaynagi; Susam (2) yagi, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.37 Farkli pH degerlerinde spesifik lipaz aktivitelerinin zaman ile degisimi

T=37 °C, N=150 rpm, Karbon kaynagi; Susam (2) yagi, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.38 Farklı pH değerlerinde bağıl lipaz aktivitelerinin değişimi

T=37 °C, N=150 rpm, Karbon kaynağı; Susam (2) yağı, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

Deneyler sonunda ulaşılan pH değerleri incelendiğinde pH=6, 7, 7.5 ve 8 olan ortamlarda pH değerinin başlangıca göre yaklaşık 0.5 birim yükseldiği, pH=8.5 ve 9 değerlerinin ise deney sonunda pH=8.5 civarında olduğu görülmüştür. Düşük pH değerlerinde mikroorganizma aktivitesine bağlı olarak pH değerlerinde artış görülmekte, ancak artış pH=8.5 değerinde kalmaktadır. Hücre derisimleri incelendiğinde ise en yüksek hücre derisimine pH 6'da ulaşılmış; en yüksek lipaz aktivitesine ulaşılan pH değerinde (pH 7.5) ise, en düşük hücre derisimi ölçülmüştür (Çizelge 4.4).

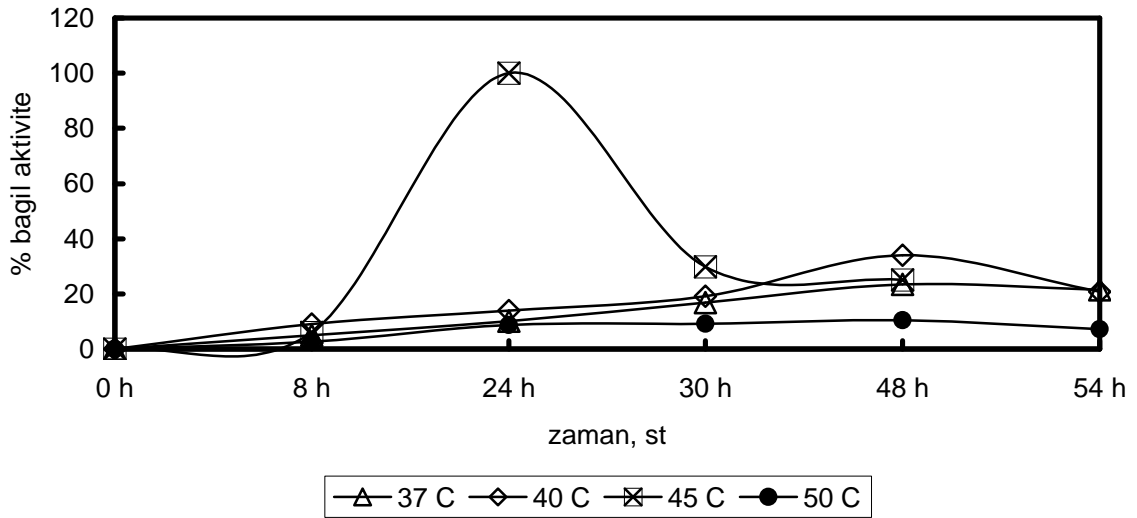
Çizelge 4.4 Ortam başlangıç pH değeri, bağıl aktivite, deney sonunda ulaşılan pH değeri ve hücre derisiminin değişimi

BASLANGIÇ pH	BAGIL AKTIVITE (%)	DENEY SONU pH DEGERI	HÜCRE DERISIMI (g/L)
6	13.8	6.65	0.944
7	40.9	7.47	0.927
7.5	100	7.96	0.723
8	21.9	8.47	0.731
8.5	12.8	8.43	0.907
9	10.9	8.49	0.789

### 4.2.3 Sicaklik Etkisi

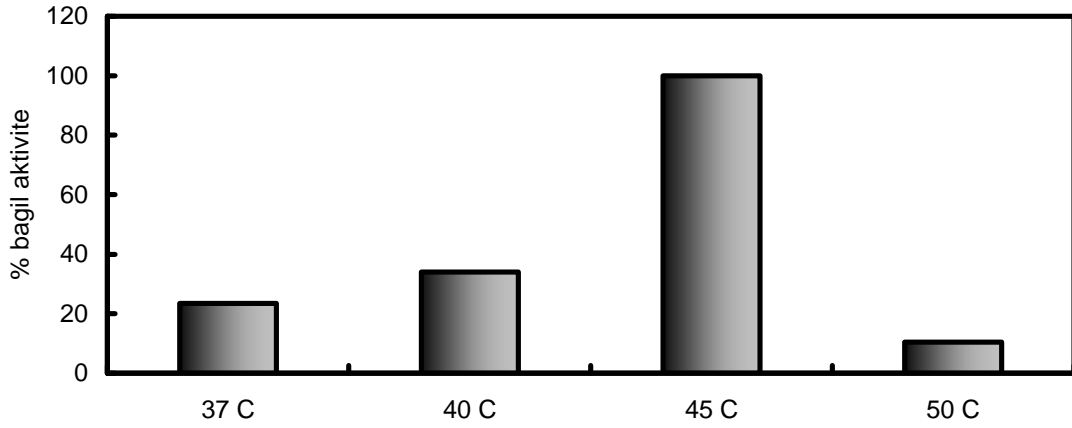
Lipaz üretiminde önemli parametrelerden biri olan sıcaklık etkisi; 37, 40, 45 ve 50 °C değerleri için incelenmiştir. Parametre içerisinde tüm deneyler pH=7.5, N=150 rpm koşullarında, karbon kaynağı olarak susam yağı (2), azot kaynağı olarak % 0.5 pepton ve % 0.3 maya özütü kullanılarak, 250 ml erlenlerde 100 ml fermantasyon ortamı içerisinde gerçekleştirilmiştir. 54 saat süresince 24 saatte bir ve önemli olabileceği düşünülen ara zamanlarda steril koşullarda 2 ml örnek alınmış ve analizler yapılmıştır. Yapılan analizler spektrofotometrik lipaz aktivitesi tayini ve deney sonunda (54. saat) hücre derisimi ölçümüdür.

Sonuçlar incelendiğinde; bağıl olarak T=45 °C'de en yüksek aktivite değerine ulaşılmıştır (Şekil 4.40). Bunu sırasıyla t=48. saatte T=40 °C, t=48. saatte T=37 °C ve t=48. saatte T=50 °C izlemektedir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39 Farklı spesifik lipaz aktivitelerinin zamana karşı değişimi

pH=7.5, N=150 rpm, Karbon kaynağı; Susam (2) yağı, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü



Sekil 4.40 Farkli bagil lipaz aktivitelerinin degisimi

pH=7.5, N=150 rpm, Karbon kaynagi; Susam (2) yagi, azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

Deney sonunda ulasilan hücre derisimleri incelendiginde; yüksek aktivite degerlerine ulasilan sicakliklarda (40 °C ve 45 °C) yüksek hücre derisimleri görölmektedir. 50 °C'de ise lipaz aktivitesinin ve hücre çoğalmasinin olumsuz etkilendigi görölmüştür (Çizelge 4.5).

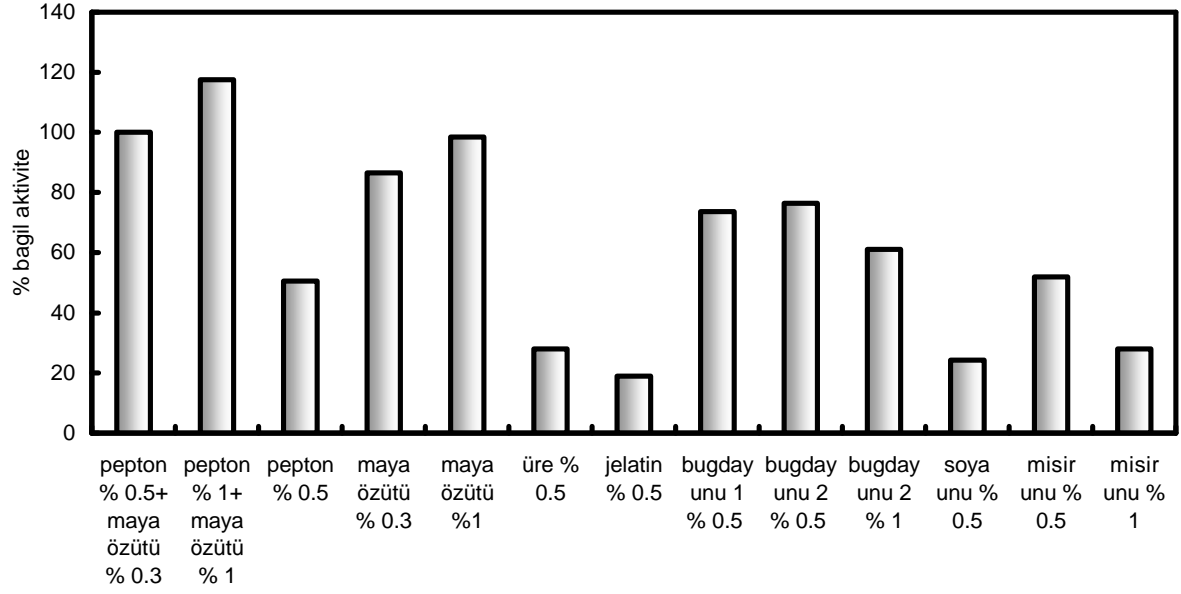
Çizelge 4.5 Sicaklikla bagil aktivite ve hücre derisiminin degisimi (t= 54 h)

SICAKLIK	BAGIL AKTIVITE (%)	HÜCRE DERISIMI (g/L)
37 °C	19.1	0.728
40 °C	33.7	1.111
45 °C	100	0.930
50 °C	10.1	0.118

#### 4.2.4 Azot Kaynaklari Etkisi

Lipaz üretimini etkileyen faktörlerden biri ortamdaki azot kaynaklarıdır. Tribütirin besi yerinde kullanılan azot kaynakları ile ulaşılan aktivite % 100 kabul edilerek, azot kaynakları etkisi bağil olarak incelenmiştir. Azot kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla, öncelikle daha önceki deneyler boyunca azot kaynağı olarak kullanılan pepton ve maya özütünün farklı derisimlerinin etkisi incelenmiştir. Bunlara ek olarak üre ve jelatin, doğal kaynak olarak; mısır unu, soya unu ve iki ayrı çeşit buğday ununun lipaz üretimine etkisi incelenmiştir. Parametre içerisinde tüm deneyler; pH=7.5, T=45 °C, N=150 rpm koşullarında, karbon kaynağı olarak susam yağı (2) kullanılarak, 250 ml erlenlerde 100 ml fermantasyon ortamı içerisinde gerçekleştirilmiştir. En yüksek lipaz aktivitesine ulaşılan 24. saatte steril koşullarda 2 ml örnek alınmış ve analizler yapılmıştır. Yapılan analizler spektrofotometrik lipaz aktivitesi tayini, Bradford protein analizi ve hücre derisimi ölçümüdür.

Sonuçlar incelendiğinde; en yüksek lipaz aktivitesine % 1 pepton ve % 1 derisiminde maya özütü birlikte kullanıldığı zaman ulaşılmıştır. Pepton ve maya özütü ayrı ayrı değerlendirilecek olursa; maya özütü kullanımının pepton kullanımına göre lipaz üretimini daha fazla katalizlediği görülmüştür. Bir sıralama yapılacak olursa; % 1 derisiminde pepton + % 1 derisiminde maya özütü kullanımını, % 1 derisiminde maya özütü, % 0.3 maya özütü, % 0.5 buğday unu 2, % 0.5 buğday unu 1, % 1 buğday unu 2, % 0.5 mısır unu, % 0.5 pepton, % 1 mısır unu, % 0.5 soya unu, % 0.5 üre, % 0.5 jelatin izlemektedir (Şekil 4.41). Hücre derisimleri ve protein miktarları değerlendirilecek olursa; % 1 pepton ve % 1 maya özütü kullanılan ortamda en yüksek hücre ve protein derisimi elde edilmiştir (Çizelge 4.6). Sonuç olarak en uygun azot kaynağının % 1 pepton ve % 1 maya özütünün birlikte kullanımı olduğu görülmektedir. Ancak elde edilecek enzimin ticari olarak kullanımı hedeflendiği için ve aktivite bakımından çok büyük bir farklılık görülmediğinden (% 17) çalışmaya % 0.5 pepton ve % 0.3 maya özütü kullanımı ile devam edilmesine karar verilmiştir.



Sekil 4.41 Çeşitli azot kaynakları içeren ortamlarda t=24. saatte bağıl lipaz aktiviteleri  
pH=7.5, T=45 °C, N=150 rpm, Karbon kaynağı; Susam (2) yağı

Çizelge 4.6 Azot kaynakları etkisi incelenen ortamların bağıl aktivite değerleri, hücre ve protein derisimleri (t= 24 h)

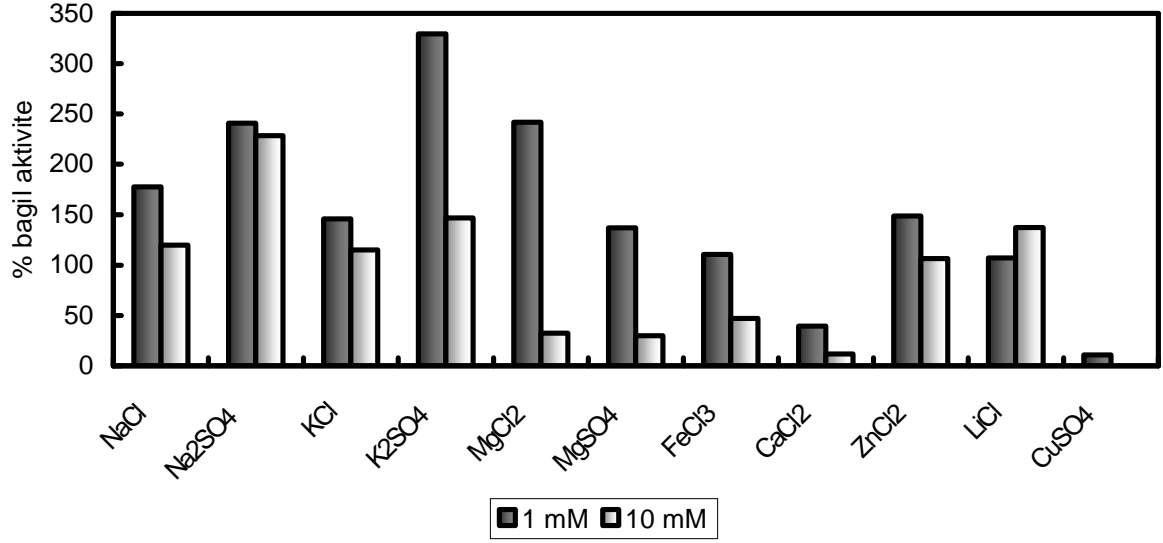
AZOT KAYNAKLARI	BAGIL	HÜCRE	PROTEIN
	AKTIVITE (%)	DERISIMI (g/L)	DERISIMI (mg/ml)
pepton % 0.5 + maya özütü % 0.3	100	0.741	0.111
pepton % 1 + maya özütü % 1	117.5	1.158	0.113
pepton % 0.5	50.6	0.550	0.049
maya özütü % 0.3	86.4	0.696	0.089
maya özütü % 1	98.5	0.678	0.053
üre % 0.5	28	0.377	0.022
jelatin % 0.5	18.9	0.359	0.030
bugday unu 1 % 0.5	73.6	0.613	0.035
bugday unu 2 % 0.5	76.3	0.568	0.061
bugday unu 2 % 1	61	0.583	0
soya unu % 0.5	24	0.610	0
misir unu % 0.5	52	0.706	0.019
misir unu % 1	28	0.550	0

#### 4.2.5 Metal İyonları Etkisi

Lipaz üretimine etkileyen faktörlerden biri olan metal iyonlarının etkisi iki ayrı derişim için incelenmiştir. 1 mM ve 10 mM derişimlerinde NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, LiCl ve CuSO<sub>4</sub> içeren lipaz üretim ortamları hazırlanarak, katkısız ortamdaki lipaz aktiviteleri % 100 kabul edilmiş ve metal iyonlarının etkisi bağıl olarak incelenmiştir. Parametre içerisinde tüm deneyler; pH=7.5, T=45 °C, N=150 rpm koşullarında, karbon kaynağı olarak susam yağı (2), azot kaynağı olarak % 0.5 pepton ve % 0.3 maya özütü kullanılarak, 250 ml erlenlerde 100 ml fermantasyon ortamı içerisinde gerçekleştirilmiştir. En yüksek lipaz aktivitesine ulaşılan 24. saatte steril koşullarda 2 ml örnek alınmış ve analizler yapılmıştır. Yapılan analizler spektrofotometrik lipaz aktivitesi tayini, Bradford protein analizi ve hücre derişimi ölçümüdür.

Sonuçlar incelendiğinde; LiCl dışındaki tüm iyonlarda 1 mM derişimde, 10 mM derişime göre daha yüksek lipaz aktiviteleri elde edilmiştir. En yüksek lipaz aktivitesi, ortamda 1 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bulunduğu zaman elde edilmiştir (% 329). Bunu sırasıyla 1 mM derişim için; MgCl<sub>2</sub> (% 241.7), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (% 241) ve NaCl (% 177.5) içeren ortamlar izlemektedir. CaCl<sub>2</sub> (% 39.4) ve CuSO<sub>4</sub> (% 10.9) içeren ortamlar haricinde 1 mM derişimdeki tüm ortamlarda katkısız kontrol grubuna göre yüksek lipaz aktiviteleri ölçülmüştür. 10 mM derişimleri için en yüksek lipaz aktivitesi, ortamda Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bulunduğu zaman elde edilmiştir (% 228.6). Daha sonra sırasıyla 10 mM derişim için; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (% 146.6), LiCl (% 137.1) ve NaCl (% 119.8) içeren ortamlar gelmektedir. 10 mM derişim için lipaz aktivitesini inhibe eden iyonları içeren ortamlar sıralanırsa; FeCl<sub>3</sub> (% 47.1), MgCl<sub>2</sub> (% 32.3), MgSO<sub>4</sub> (% 30.0), CaCl<sub>2</sub> (% 11.8), CuSO<sub>4</sub> (% 0) bulunmaktadır. Ortamlarda bulunan (SO<sub>4</sub>)<sup>-2</sup> ve Cl<sup>-</sup> iyonları açısından değerlendirme yapılacak olursa; K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> iyonları ile beraber (SO<sub>4</sub>)<sup>-2</sup> iyonlarının Cl<sup>-</sup> iyonlarına oranla olumlu etkisi olduğu her iki derişim için görülmüştür; ancak Mg<sup>+2</sup> iyonları açısından durum tam tersidir (Şekil 4.42). Hücre derişimleri ve protein miktarları değerlendirilecek olursa; LiCl içeren ortamda en yüksek hücre ve protein derişimi görülmektedir (Çizelge 4.7). Sonuç olarak biyodönüşüm ortamına en uygun metal iyonu ilavesinin 1 mM derişimde K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> olduğu görülmektedir.





Sekil 4.42 Çeşitli metal iyonları içeren ortamların t=24. saatte bagil lipaz aktiviteleri  
pH=7.5, T=45 °C, N=150 rpm, Karbon kaynagi; Susam (2) yagi,  
azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü

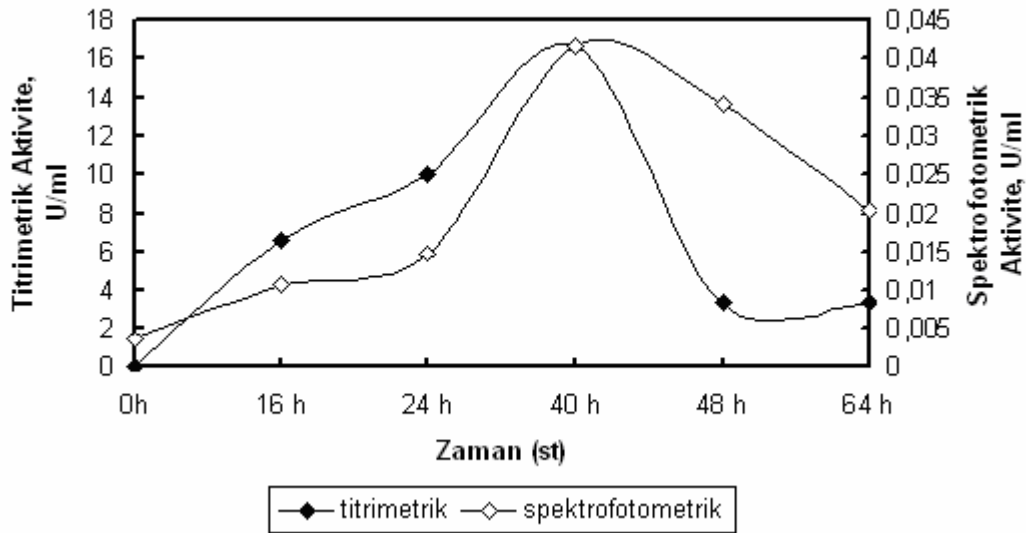
Çizelge 4.7 Metal iyonları etkisi incelenen ortamların bagil aktivite degerleri, hücre ve protein derisimleri (t= 24 h)

METAL İYONLARI	1 mM			10 mM		
	BAGIL AKTIVITE (%)	HÜCRE DERISIMI (g/L)	PROTEIN DERISIMI (mg/ml)	BAGIL AKTIVITE (%)	HÜCRE DERISIMI (g/L)	PROTEIN DERISIMI (mg/ml)
Katkisiz	100	0.522	0.177	100	0.485	0.165
NaCl	177.5	0.522	0.235	119.8	0.497	0.134
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	241.0	1.126	0.196	228.6	0.718	0.191
KCl	145.5	0.658	0.198	114.7	0.449	0.152
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	329.6	1.073	0.207	146.6	0.540	0.147
MgCl <sub>2</sub>	241.7	1.221	0.172	32.3	0.075	0.139
MgSO <sub>4</sub>	136.7	1.241	0.125	30.0	0.173	0.156
FeCl <sub>3</sub>	110.5	0.273	0.105	47.1	0.025	0.091
CaCl <sub>2</sub>	39.4	0.160	0.055	11.8	0.020	0.061
ZnCl <sub>2</sub>	148.6	0.359	0.181	106.1	0.354	0.126
LiCl	107.1	1.319	0.260	137.1	0.495	0.217
CuSO <sub>4</sub>	10.9	0.568	0.052	0	0.003	0

#### 4.2.6 Optimal Kosullarda Lipaz Üretimi

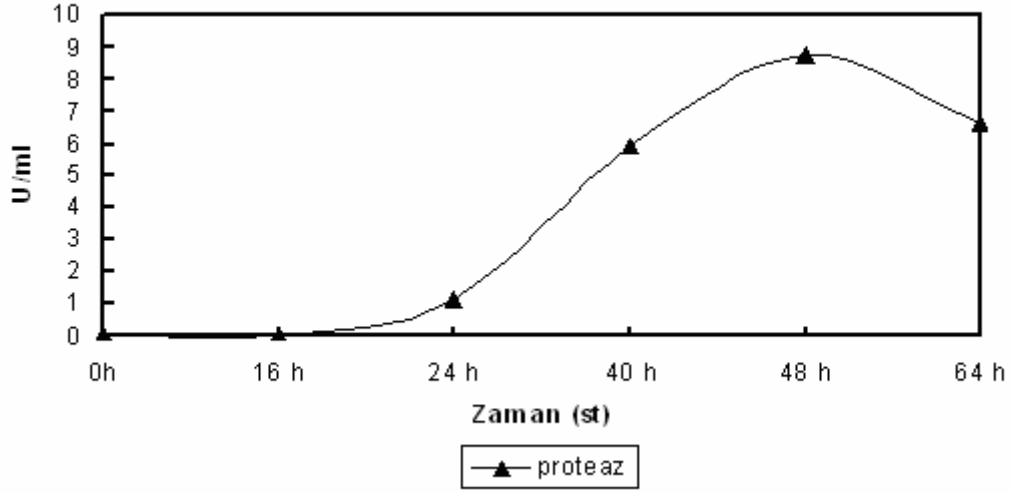
Tüm parametreler belirlendikten sonra, en yüksek lipaz aktivitesine ulaşılan lipaz üretim ortamında, (pH=7.5, T=45 °C, karbon kaynağı olarak % 1 derisimde susam yağı (2), azot kaynağı olarak % 0.5 pepton ve % 0.3 maya özütü, 1mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren ortam) 250 ml erleninde 100 ml fermantasyon ortamı içerisinde N=150 rpm koşullarında üretim yapılmıştır. 64 saat süresince kısa zaman aralıkları ile örnek alınmış, spektrofotometrik ve titrimetrik yöntemlerle lipaz aktivitesi tayini, Bradford protein tayini, hücre derisimi ölçümü ve proteaz aktivitesi analizleri yapılmıştır. Aynı zaman aralıkları için, hücre içi lipaz ve proteaz aktiviteleri tayini de yapılmıştır.

Sonuçlar incelendiğinde hücre dışı enzim aktiviteleri bakımından; spektrofotometrik ve titrimetrik lipaz aktivite analizleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.43). Maksimum lipaz aktivitesine 40. saatte ulaşılmıştır. 48. saatten itibaren her iki analizde görülen lipaz aktivitesindeki düşüş, aynı saatteki proteaz aktivitesi artışı ile açıklanabilmektedir. Proteaz aktivitesi 48. saatte maksimum değerdedir ve 8.758 U/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.44).



Şekil 4.43 Optimal koşullarda hücre dışı lipaz aktiviteleri

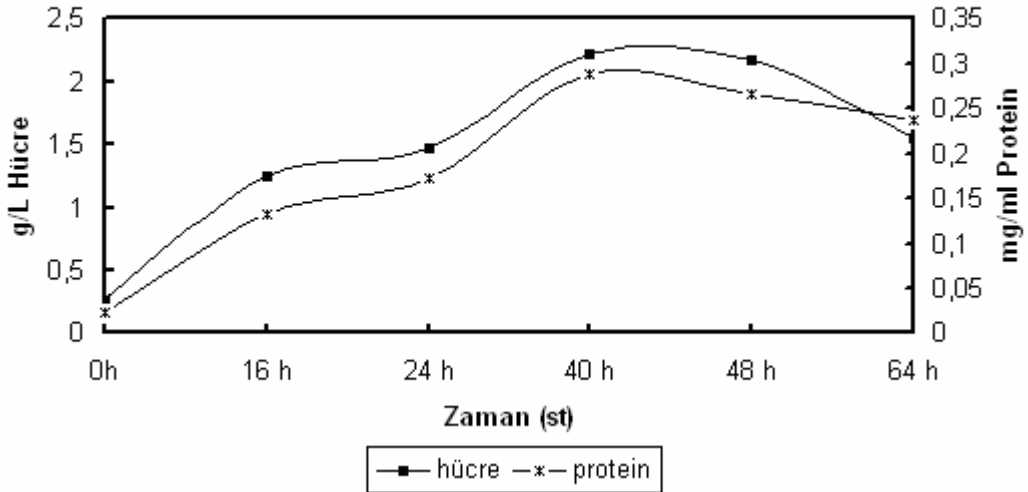
pH=7.5, T=45 °C, N=150 rpm, Karbon kaynağı; Susam (2) yağı, azot kaynağı; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü, 1mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Sekil 4.44 Optimal kosullarda hücre disi proteaz aktivitesi

pH=7.5, T=45 °C, N=150 rpm, Karbon kaynagi; Susam (2) yagi,  
azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü, 1mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

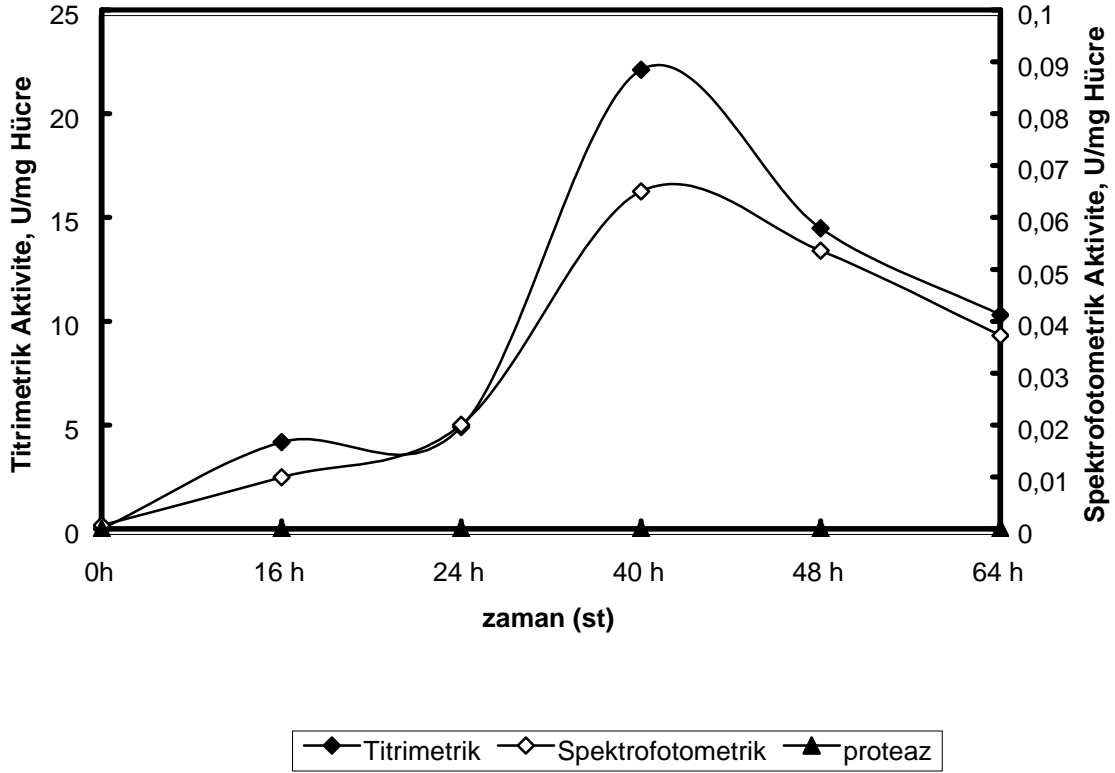
Hücre disi protein derisimi 40. saatte maksimum degerdedir (0.287 mg/ml) ve 48. saatte proteaz enziminin maksimum derisimde olmasi nedeni ile düsmektedir. Hücre derisimi 40. saatte maksimum degerdedir (2.212 g/L) (Sekil 4.45).



Sekil 4.45 Optimal kosullarda hücre disi protein ve hücre derisimleri

pH=7.5, T=45 °C, N=150 rpm, Karbon kaynagi; Susam (2) yagi,  
azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü, 1mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Hücre içi enzim aktiviteleri bakımından; spektrofotometrik ve titrimetrik lipaz aktivitesi analizleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Maksimum hücre içi lipaz aktivitesine hücre disinda olduğu gibi 40. saatte ulaşmıştır. Üretilen tüm proteaz enzimi hücre disina salgılanmıştır ve hücre içerisinde proteaz aktivitesi bulunmamıştır (Sekil 4.46).



Sekil 4.46 Optimal kosullarda hücre içi lipaz aktiviteleri ile proteaz aktivitesi

pH=7.5, T=45 °C, N=150 rpm, Karbon kaynagi; Susam (2) yagi,  
azot kaynagi; % 0.5 pepton + % 0.3 maya özütü, 1mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Hücre disı ve hücre içi enzim aktiviteleri için aynı saatte (t=40. st) elde edilen degerler karsilastirilirse; üretilen enzimin % 74'ünün hücre disina salgilandigi belirlenmiştir.

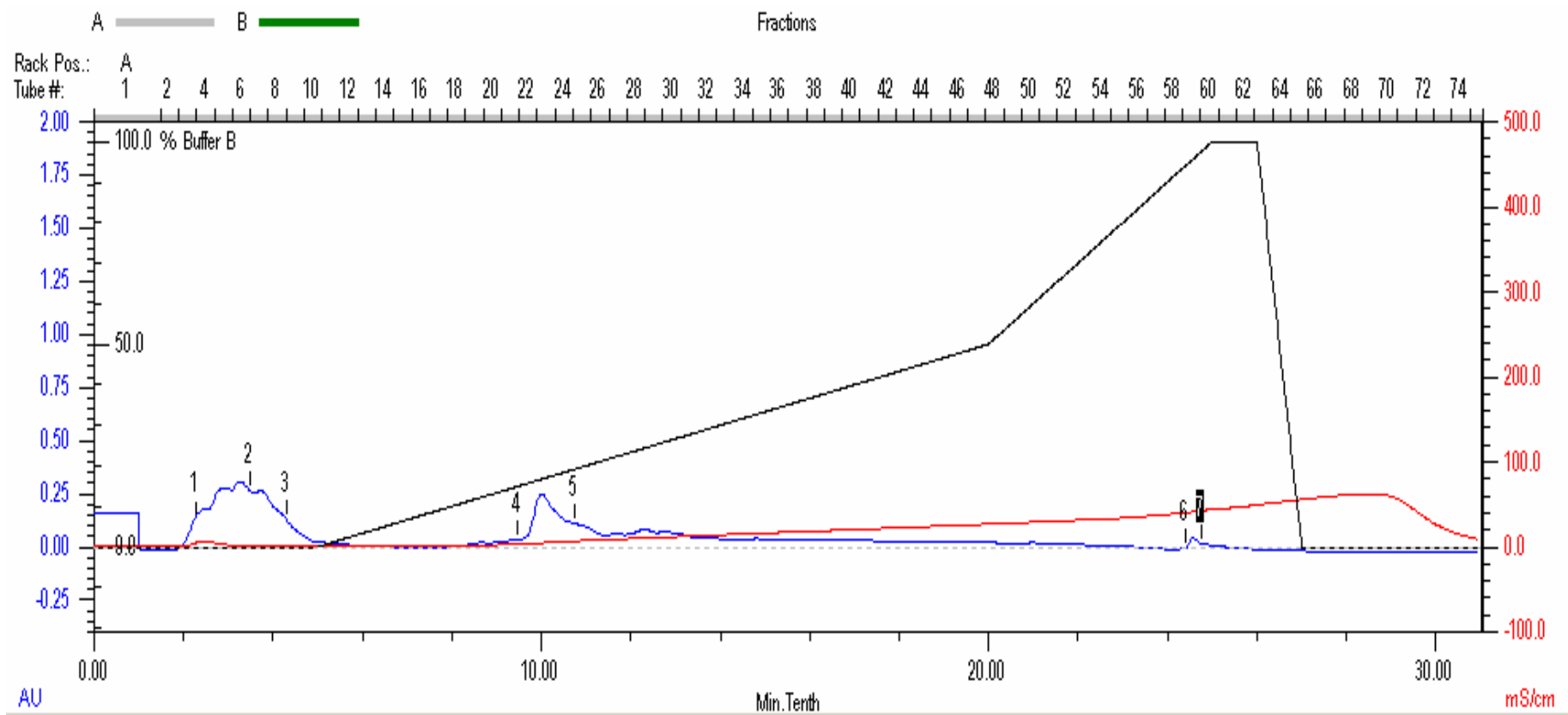
### 4.3 Lipazın Üretim Ortamından Ayrılması ve Saflastırması

Yüksek lipaz üretimi ile sonuçlanan ortam koşullarında 200 ml lipaz üretim ortamında üretim yapılmış ve lipaz aktivitesinin en yüksek olduğu 40. saatte ortam santrifüjlenerek hücrelerden arındırılmıştır. Hücrelerden ayrılmış lipaz üretim ortamı, ultrafiltrasyon tüplerinde santrifüjlenerek 5 kDa molekül ağırlığının altındaki proteinlerin ortamdan uzaklaştırılmıştır. Lipaz enzimini diğer proteinlerden ayırmak için, proteinlerin izoelektrik noktalarına göre farklı yüklenme özelliklerinden yararlanılarak BIO-RAD UNO Q1 kolon ile anyon değiştirici kromatografi yapılmıştır. Saflastırma basamaklarında ve kromatografi sonucu elde ettiğimiz protein içeren fraksiyonlara, titrimetrik yöntemle lipaz aktivitesi ve Bradford yöntemi ile protein analizi yapılmış ve saflastırma çizelgesi (Çizelge 4.8) oluşturulmuştur.

Çizelge 4.8 Lipaz enzimi saflastırma basamakları

Saflastırma Basamağı	Hacim (ml)	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflastırma Kati
Kültür üst faz	190	2532.7	25.27	100.2	100	1
Ultrafiltrasyon	5	100	1.155	86.6	3.94	0.86
Iyon Değiştirici Kromatografi	1.2	15.996	0.012	1333	0.63	13.3

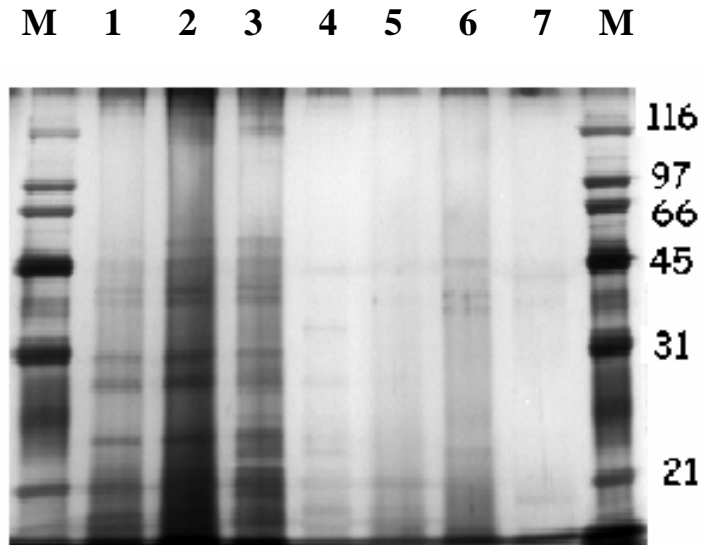
Saflastırma tablosu incelendiğinde; elde edilen hacimlerin ultrafiltrasyon ve kromatografi işlemleri sonucu azalması sebebiyle toplam aktivite ve toplam protein miktarlarında düşme görülmektedir. Ultrafiltrasyon sonrası protein miktarlarındaki artış sebebiyle de spesifik aktivitede azalma görülmektedir. Kromatografi sonrası elde edilen ürün ise yüksek spesifik aktiviteye sahiptir (1333 U/mg). Verim için toplam aktivite değerleri, saflastırma kati için ise spesifik aktivite değerleri baz alınmıştır (Çizelge 4.8).



Sekil 4.47 Anyon degistirici kromatografi sonucu elde edilen kromatogram

Kromatografi sonrası elde edilen kromatogram (Sekil 4.47) incelendiğinde, 2 numaralı fraksiyondan itibaren kolona tutunamayan ve gradyen oluşturulmadan önce kolondan ayrılarak fraksiyonlar halinde toplanan proteinler görülmektedir. 10 numaralı fraksiyondan itibaren yıkama amacıyla gradyen oluşturulmuş ve kolona tutunan proteinler kademeli olarak artan tuz gradyeniyle birlikte kolondan ayrılmıştır. Kolona tutunamayan ve ayırımı gerçekleştirilmemiş protein karışımı (1-3 aralığı) SDS-PAGE kuyularında 4 ve 5 numaralı kuyucuga yüklenmiştir. Gradyen oluşturulduktan sonra 22, 23, 24 numaralı fraksiyonlarda yer alan ve 4-5 aralığındaki protein 6 numaralı kuyucukta; 58 ve 59 numaralı fraksiyonlarda yer alan ve 6-7 aralığındaki protein 7 numaralı kuyucukta yer almaktadır. Elde edilen fraksiyonlara titrimetrik yöntemle lipaz aktivitesi analizleri yapılmış ve sadece 4-5 aralığındaki protein pikinde lipaz aktivitesi bulunmuştur. Sonuç olarak SDS-PAGE analizi sonucunda 6 numaralı kuyucukta lipaz enzimine ait protein bantı/bantları elde edilmesi beklenmektedir.

Her saflastırma basamağının sonunda ve kromatografi sonucu elde edilen protein içeren fraksiyonlara, protein dağılımlarını bulmak, lipaz enziminin saflığını göstermek ve yaklaşık molekül ağırlığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapılmıştır. Yürütme jeli için % 10'luk, yigma jeli için % 4'lük akrilamid jel hazırlanmıştır. Protein bantlarının gözlenmesi için gümüş boyama metodu uygulanmıştır.



Sekil 4.48 SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre protein dağılımları

SDS-PAGE sonuçları değerlendirildiğinde; 1 ve 2 numaralı kuyucuklara hücrelerden ayrılmış lipaz üretim ortamı farklı derisimlerde yüklenmiştir. 3 numaralı kuyucukta ultrafiltrasyon işlemi sonunda elde edilen ürün bulunmaktadır. 4, 5, 6 ve 7 numaralı kuyucuklarda ise kromatografi sonrasında protein içeren fraksiyonlar bulunmaktadır. Lipaz enzimini ifade eden protein bandı 6 numaralı kuyucukta beklenmektedir. 6 numaralı kuyucukta yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığında iki bant görülmektedir. Bu bantların lipaz enzimine ait olduğu düşünülmektedir.

#### 4.4 Saflastırılmış Lipazın Deterjan Katkı Maddeleri ile Kullanım Potansiyeli

Elde edilen kısmi olarak saflastırılmış lipazın aktivitesine deterjan katkılarının incelenmesi amacıyla, anyon değiştirici kromatografi sonrasında elde edilen, saf lipaz olduğu düşünülen fraksiyona % 1 derisimde olacak şekilde proteaz, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, EDTA ve SDS ilave edilmiş; N=100 rpm, T= 45 °C koşullarında bir saat süresince lipaz enzimi bu deterjan katkıları ile inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında lipaz aktiviteleri titrimetrik yöntemle ölçülmüş, bir saat sonrasındaki lipaz aktivitelerindeki değişim, başlangıç aktivitelerine göre bağıl olarak verilmiştir (Çizelge 4.9).

Sonuçlar incelendiğinde enzimin başlangıç aktivitesinin; proteaz ve Triton X-100 içeren ortamlarda % 75'ini, Tween 20/80 içeren ortamlarda yaklaşık yarısını, SDS içeren ortamda % 25'ini koruyabildiği görülmüştür. EDTA içeren ortamda ise bir saat sonrasında lipaz enziminin aktivitesini kaybettiği sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.9 Saflastırılmış lipaz enzimi aktivitesine deterjan katkıları etkisi

<b>Katki Maddesi (% 1)</b>	<b>% Korunan Aktivite</b>
Proteaz	75
Tween 20	50
Tween 80	50
Triton X-100	75
EDTA	0
SDS	25



## 5. TARTISMA VE SONUÇ

### 5.1 Mikroorganizma İzolasyon ve Tanımlama

Lipaz üretmek üzere kaynak olarak kullanılacak olan *Bacillus* cinsi mikroorganizmanın seçimi, yağlı fabrika atıkları ile kontamine olmuş topraktan izole edilmiş mikroorganizmalar arasından yapılmıştır. Dokuz farklı kültürden öncelikle basit boyama ile basil formunda ve spor oluşturan mikroorganizmaların seçimi hedeflenmiştir. Mikroorganizmaların basil şeklinde ve spor oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiş ve hücre duvarı yapısındaki farklılıklar temelinde dayanılarak yapılan Gram boyama işlemine geçilmiştir. Gram boyama sonucunda örneklerden altı tanesi Gram (+) olarak belirlenmiştir. *Bacillus* cinsi olduğu kesinleştirilen bu örnekler içerisinden seçim yapmak amacıyla sivi kültürlerde üretim yapılmış ve lipaz üretim kapasitesi en yüksek olan mikroorganizma lipaz kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmanın tür düzeyinde isimlendirilmesi amacıyla yapılan 16S rRNA analizleri sonucunda çalışılan iki lokus ile sonuçlar tek bir türe indirgenememiş; ancak gen bankalarında yapılan tarama sonucu çalışılan mikroorganizmaya ait bazı dizileri sadece *Bacillus* cinsleri ile yüksek uyum göstermiştir. Elde edilen sonuçlar ile çalışmada lipaz kaynağı olarak kullanılan mikroorganizmanın moleküler seviyede *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir.

### 5.2 Lipaz Üretiminde Önemli Parametreler

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

#### 5.2.1 Karbon Kaynakları Etkisi

*Bacillus* sp.'den lipaz üretimine karbon kaynakları etkisini incelemek amacıyla öncelikle ülkemizde yaygın olarak kullanılan bitkisel yağlar kullanılmıştır. Bitkisel yağlar ortama

çesitli derisimlerde eklenerek lipaz üretimi için en uygun yağ ve derisimi belirlenmiştir. Bitkisel yağların temel bileşenleri olan yağ asitleri ile literatürde sıklıkla rastlanan yağ asidi esterlerinin etkisi incelenerek, bitkisel yağların içeriğiyle bağlantılı olarak sonuçlar yorumlanmıştır. Son olarak tek basına lipaz üretimini indüklemek için yeterli olmayacağı düşünülen, ancak karbon kaynağı olarak sıklıkla kullanılan glukoz, en yüksek lipaz üretimine ulaşılan ortama üç farklı derisimde ilave edilerek etkisi incelenmiştir.

### **5.2.1.1 Bitkisel Yağların Etkisi**

Bitkisel yağ olarak zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, mısır özü yağı, iki farklı susam yağı çeşitli derisimlerde lipaz üretim ortamına ilave edilmiş ve etkileri incelenmiştir.

Zeytin yağı sonuçlarında yağ derisimi arttıkça lipaz aktivitesinin de arttığı görülmektedir. % 1.5 derisimde zeytin yağı kullanıldığında 0.049 U/ml, % 1 derisimde zeytin yağı kullanıldığında 0.036 U/ml, % 0.5 derisimde zeytin yağı kullanıldığında 0.021 U/ml lipaz aktivitesine ulaşılmıştır. Yağ derisimi arttıkça maksimum lipaz aktivitesine ulaşılan zamanın kısaldığı görülmektedir. % 1.5 derisimde zeytin yağı kullanıldığında maksimum lipaz aktivitesine 48 saatte, % 1 derisimde 54 saatte, % 0.5 derisimde 72 saatte ulaşılmaktadır. Zeytin yağı sonuçlarında lipaz aktivitesi bakımından yağ derisimi arttırımının kısa zamanda yüksek lipaz aktiviteleri ile sonuçlandığı görülmüştür.

Ayçiçek yağı etkisinin incelenmesi amacıyla % 0.5, % 1 ve % 1.5 derisimlerde zeytin yağı lipaz üretim ortamına ilave edilerek lipaz aktiviteleri ve protein derisimleri belirlenmiştir. Ayçiçek yağı sonuçlarında yağ derisimi % 1.5'e çıkarıldığında substrat inhibisyonu etkisi ile lipaz aktivitesinde düşüş görülmektedir. % 1.5 derisimde ayçiçek yağı kullanıldığında 0.041 U/ml, % 1 derisimde ayçiçek yağı kullanıldığında 0.045 U/ml, % 0.5 derisimde ayçiçek yağı kullanıldığında 0.032 U/ml lipaz aktivitesine ulaşılmıştır. Maksimum lipaz aktivitesine ulaşılan zaman bakımından incelendiğinde düşük yağ derisiminde maksimum lipaz aktivitesine ulaşılan zamanın daha kısa olduğu görülmektedir. % 1.5 derisimde ayçiçek yağı kullanıldığında maksimum lipaz aktivitesine 54 saatte, % 1 derisimde 72 saatte, % 0.5 derisimde 48 saatte ulaşılmaktadır. Ayçiçek yağı sonuçlarında en yüksek lipaz aktivitesine % 1 derisimde yağ içeren ortamda ulaşılmış; ancak bu ortamda maksimum lipaz aktivitesine ulaşılan zaman uzamıştır.

Soya yagi etkisinin incelenmesi amaciyla % 0.5 ve % 1 derisimlerde soya yagi lipaz üretim ortamına ilave edilerek lipaz aktiviteleri ve protein derisimleri belirlenmiştir. Soya yagi sonuçlarında yag derisimi arttikça lipaz aktivitesinin arttigi görülmektedir. % 1 derisimde soya yagi kullanildiginda 0.021 U/ml, % 0.5 derisimde soya yagi kullanildiginda 0.014 U/ml lipaz aktivitesine ulasilmistir. Maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zaman bakımından incelendiginde yag derisimimi arttirilince maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zamanin kisaldigi görülmektedir. % 1 derisimde soya yagi kullanildiginda maksimum lipaz aktivitesine 54 saatte, % 0.5 derisimde 72 saatte ulasılmaktadır. Soya yagi sonuçlarında lipaz aktivitesi bakımından yag derisimi arttiriminin kısa zamanda daha yüksek lipaz aktiviteleri ile sonuçlandigi görülmüştür. Zeytin yagi ve ayçiçek yagi ile karsilastirildiginda soya yagi kullanılan ortamda daha düşük lipaz aktivitelerine ulasilmistir.

Misir özü yagi etkisinin incelenmesi amaciyla % 0.5 ve % 1 derisimlerde misir özü yagi lipaz üretim ortamına ilave edilerek lipaz aktiviteleri ve protein derisimleri belirlenmiştir. Misir özü sonuçlarında yag derisimi arttikça lipaz aktivitesinin arttigi görülmektedir. % 1 derisimde misir özü yagi kullanildiginda 0.033 U/ml, % 0.5 derisimde misir özü yagi kullanildiginda 0.016 U/ml lipaz aktivitesine ulasilmistir. Maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zaman bakımından incelendiginde yag derisimi arttirilince maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zamanin oldukça kisaldigi görülmektedir. % 1 derisimde misir özü yagi kullanildiginda maksimum lipaz aktivitesine 24 saatte, % 0.5 derisimde 72 saatte ulasılmaktadır. Misir özü yagi sonuçlarında lipaz aktivitesi bakımından yag derisimi arttiriminin kısa zamanda daha yüksek lipaz aktiviteleri ile sonuçlandigi görülmüştür. Zeytin yagi ve ayçiçek yagi ile karsilastirildiginda soya yagi ve misir özü yagi kullanılan ortamlarda daha düşük lipaz aktivitelerine ulasilmistir.

Susam yagi (1) etkisinin incelenmesi amaciyla % 0.5, % 1 ve % 1.5 derisimlerde susam yagi (1) lipaz üretim ortamına ilave edilerek lipaz aktiviteleri ve protein derisimleri belirlenmiştir. Susam yagi (1) sonuçlarında yag derisimi % 1.5'e çıkarildiginda substrat inhibisyonu etkisi ile lipaz aktivitesinde düşüş görülmektedir. % 1.5 derisimde susam yagi (1) kullanildiginda 0.099 U/ml, % 1 derisimde susam yagi (1) kullanildiginda 0.115 U/ml, % 0.5 derisimde susam yagi (1) kullanildiginda 0.127 U/ml lipaz aktivitesine ulasilmistir. Maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zaman bakımından incelendiginde % 1.5 yag derisiminde maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zamanin çok daha kısa oldugu

görülmektedir. % 1.5 derisimde susam yagi (1) kullanildiginda maksimum lipaz aktivitesine 24 saatte, % 1 ve % 0.5 derisimlerinde 72 saatte ulasilmaktadir. Susam yagi (1) sonuçlarında en yüksek lipaz aktivitesine % 0.5 derisimde yag içeren ortamda ulasilmis ancak bu ortamda maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zaman uzamistir. Yag derisimi % 1'e çikarildiginda lipaz aktivitesinde hafif bir düşüs, % 1.5'e çikarildiginda ise maksimum aktiviteye ulasilan zamanda oldukça kisalmanin yaninda düşüs görülmektedir. Susam yagi (1) kullaniminda % 0.5 derisimin üzerine çikildiginda substrat inhibisyonu etkisi görülmektedir. Diger yaglar ile kiyaslandiginda susam yagi (1) kullaniminda en yüksek lipaz aktivitelere ulasilmistir.

Susam yagi (2) etkisinin incelenmesi amaciyla % 0.25, % 0.5, % 0.75, % 1 ve % 1.5 derisimlerde susam yagi (2) lipaz üretim ortamına ilave edilerek lipaz aktivite ve protein derisimleri belirlenmistir. Susam yagi (2) sonuçlarında yag derisimi % 1.5'e çikarildiginda substrat inhibisyonu etkisi ile lipaz aktivitesinde düşüs görülmektedir. % 1.5 derisimde susam yagi (2) kullanildiginda 0.061 U/ml, % 1 derisimde susam yagi (2) kullanildiginda 0.154 U/ml, % 0.75 derisimde susam yagi (2) kullanildiginda 0.074 U/ml, % 0.5 derisimde susam yagi (2) kullanildiginda 0.032 U/ml, % 0.25 derisimde susam yagi (2) kullanildiginda 0.015 U/ml lipaz aktivitesine ulasilmistir. Maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zaman bakimindan incelendiginde % 1.5 yag derisiminde maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zamanin daha kısa oldugu görülmektedir. % 1.5 derisimde susam yagi (2) kullanildiginda maksimum lipaz aktivitesine 24 saatte, % 1, % 0.75 ve % 0.5 derisimlerinde 48 saatte, % 0.25 derisimde 54 saatte ulasilmaktadir. Susam yagi (2) sonuçlarında en yüksek lipaz aktivitesine % 1 derisimde yag içeren ortamda ulasilmistir. Susam yagi (2) kullaniminda % 1 derisimin üzerine çikildiginda substrat inhibisyonu etkisi görülmektedir. Diger yaglar ile kiyaslandiginda susam yagi (2) kullaniminda, susam yagi (1)'de dahil olmak üzere oldukça yüksek lipaz aktivitelere ulasilmistir.

### ***Karbon Kaynagi Olarak Bitkisel Yaglarin Karsilastirilmesi***

Karbon kaynagi olarak kullanılan bitkisel yaglar birbirleri ile kiyaslanacak olursa; aktivite ve spesifik aktivite bakimindan en uygun bitkisel yagin % 1 derisimdeki susam (2) yagi oldugu görülmektedir. Aktivite bakimindan susam (2) yagini, susam yagi (1) izlemektedir. Lipaz üretimini en az katalizleyen bitkisel yag ise % 0.5 derisimindeki misir özü yagi

olarak bulunmuştur. Bir sıralama yapılacak olursa; susam yağlarını sırasıyla zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı ve mısır özü yağı izlemektedir.

Yağ analizleri sonuçlarına göre; bitkisel yağların içeriği göz önünde tutulursa, oleik asit ve linoleik asitin bitkisel yağların temel bileşenleri olduğu ve yağ içeriğinin yaklaşık % 80'ini oluşturduğu görülmektedir. En uygun karbon kaynağı olarak belirlenen ve lipaz üretim ortamında diğer yağlara oranla lipaz üretimini çok daha fazla katalizleyen susam yağlarının içerikleri incelendiğinde, % 30-35 civarı oleik asit, % 50-55 civarı linoleik asit içerdiği görülmektedir. Zeytin yağı; % 73 oleik asit ile % 9 linoleik asit, ayçiçek yağı; % 26 oleik asit ile % 63 linoleik asit, soya yağı; % 24 oleik asit ile % 51 linoleik asit, mısır özü yağı; % 27 oleik asit ile % 56 linoleik asit temel bileşenlerinden oluşmaktadır.

Yağ içeriklerine bakılarak sonuçlar yorumlanırsa, oleik asit miktarının % 30'un altında olmaması gerektiği, ancak bununla beraber zeytin yağında olduğu gibi çok yüksek oleik asit miktarının da (düşük linoleik asit miktarı olacağı için) yetersiz olduğu düşünülmektedir.

Yağ asitlerinin lipaz üretimine etkisinin incelenmesi ile desteklenen sonuçlar; lipaz üretiminde en etkin yağ asitlerinin oleik ve linoleik asit olduğu, ancak yağ asitlerinin bitkisel yağlar ile kıyaslandığında lipaz üretimini indüklemek üzere tek başlarına yeterli olmadıkları, ancak bitkisel yağlarda olduğu gibi karışım halinde lipaz aktivitesini indükleyebildikleri belirlenmiştir. Bitkisel yağların lipaz üretimini katalizleyebilme yetenekleri ve yağ asidi içerikleri göz önünde tutulursa, lipaz üretimini en fazla katalizleyebilen yağ asitleri karışımının; % 30 üzerinde oleik asit ve % 50 civarında linoleik asit olduğu belirlenmiştir.

### **5.2.1.2 Yağ Asidi ve Esterlerinin Etkisi**

#### ***Yağ Asidi Esterlerinin Etkisi***

Yağ asidi esterlerinin etkisini incelemek üzere % 1 derisiminde triasetin, tribütirin, trioktanoat, tripalmitin, tristearin ve triolein üretim ortamına ilave edilerek lipaz aktiviteleri ve protein derisimleri belirlenmiştir.

Yag asitleri ile ulasilan maksimum lipaz aktivitelemi incelendiginde, en yuiksek lipaz aktivitesine triolein (0.046 U/ml) kullanildiginda 54 saatte ulasilmistir. Daha sonra tristearin (0.029 U/ml) kullanildiginda 48 saatte, triasetin (0.016 U/ml) kullanildiginda 48 saatte, tripalmitin (0.014 U/ml) kullanildiginda 54 saatte, tribuiterin (0.009 U/ml) kullanildiginda 54 saatte, trioktanoat (0.008 U/ml) kullanildiginda 48 saatte ulasilmistir.

Sekiz karbonlu trioktanoattan itibaren karbon sayisi arttikca lipaz enzimi aktivitesi artmaktadır. Esit sayıda karbon iieren ancak yapısında çift bag bulunduran triolein ile düz zincirden olusan tristearin karsilastirildiginda, triolein iieren ortamda enzim üretiminin daha yüksek seviyede oldugu görülmüştür. Artisin nedeni olarak, çift bagların daha zayıf oldugu için mikroorganizma tarafından daha kolay kullanılabilirdi söylenebilir. Düşük karbonlu esterler karsilastirildiginda ise iki karbonlu triasetin kullanimi ile dört karbonlu tribuiterin kullanımına göre daha yüksek lipaz aktivitesi elde edilmistir; ancak yüksek karbon sayili esterlerin kullaniminda daha yüksek lipaz aktivitelere ulasilmistir. Aktiviteler bakımından sonuçlar yorumlandiginda, yüksek karbonlu ve çift bag iieren esterler lipaz üretiminde karbon kaynagi olarak kullanabilirdi ve bitkisel yağlara oranla daha az seviyede olsa da lipaz üretimini indüklediği belirlenmistir.

### ***Yag Asitlerinin Etkisi***

Yag asitlerinin etkisini incelemek üzere bitkisel yağların iierikleri göz önünde tutularak % 1 derisiminde palmitik asit, stearik asit, oleik asit ve linoleik asit kullanilmistir. Asetik asit etkisi % 0.1 ve % 0.5 derisimleri için incelenmistir.

Yag asitleri ile ulasilan maksimum lipaz aktivitelemi incelendiginde; en yuiksek lipaz aktivitesi degerine % 0.1 asetik asit kullaniminda (0.054 U/ml) 54 saatte ulasilmistir. Daha sonra linoleik asit (0.032 U/ml) iieren ortamda 24 saatte, oleik asit (0.027 U/ml) iieren ortamda 54 saatte, palmitik asit (0.010 U/ml) iieren ortamda 54 saatte, stearik asit (0.008 U/ml) iieren ortamda 72 saatte maksimum lipaz aktivitesine ulasilmistir. % 0.5 derisimde asetik asit iieren ortamda ortam baslangiç pH'inin düşük olması sebebiyle ortamda mikroorganizma çoğalması çok düşük seviyelerde kalmis ve lipaz üretimi gercekleşmemistir.

Esit sayıda karbon içeren ancak yapısında çift bağ bulunduran oleik asit ve linoleik asit ile düz zincirden oluşan stearik asit karşılaştırıldığında; iki çift bağa sahip linoleik asit içeren ortamda enzim üretiminin daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Daha sonra tek çift bağ bulunduran oleik asit ve düz bir zincirden oluşan stearik asit bulunmaktadır. Sonuçlar bu bakımdan yağ asidi esterlerinin sonuçları ile paralellik içerisindedir. Ancak iki karbonlu asetik asit kullanımında elde edilen yüksek lipaz aktivitesi ile farklılaşmaktadır. Aktiviteler bakımından sonuçlar yorumlandığında, yağ asitlerinin, yağ asidi esterlerine göre lipaz üretimini daha çok indüklediği belirlenmiştir. Ancak bitkisel yağlar ile kıyaslandığında yağ asitleri içeren ortamların lipaz aktiviteleri düşük seviyelerdedir. Bu durumda yağ asitlerinin lipaz üretimini indüklemek üzere tek başlarına yeterli olmadıkları, ancak karışım halinde (bitkisel yağlarda olduğu gibi) lipaz aktivitesini indükleyebildikleri belirlenmiştir.

### 5.2.1.3 Karbon Kaynağı Olarak Glukozun Etkisi

Karbon kaynağı olarak glukoz, maltoz gibi şekerlerin *Bacillus* cinsinde mikroorganizmalar tarafından kullanabildiği bilinmektedir. *Bacillus licheniformis* lipaz üretiminde, karbon kaynağı olarak zeytin yağı ve mısır yağı deneyerek üretimin inhibe olduğu görülmüş ve kaynak olarak glukoz kullanılmıştır. *Bacillus alcalophilus* alkalik termofilik lipaz üretiminde, karbon kaynağı olarak soya yağı ve maltoz kullanılmıştır (Gupta vd 2004).

Ancak bu şekerler genellikle lipaz üretimini indüklemekte yetersiz kalmaktadır. Bu bilgiye dayanılarak glukoz, lipaz üretim ortamına en uygun karbon kaynağı olarak belirlenen % 1 derisiminde susam (2) yağına ilave olarak lipaz üretim ortamına, % 0.1, % 0.5 ve % 1 derisimlerinde eklenmiş ve lipaz aktivitesine etkileri incelenmiştir.

Ortama ilave edilen glukozun tüm derisimlerde lipaz aktivitesine olumsuz etki yaptığı belirlenmiştir. Glukoz içeren ortamlarda en yüksek lipaz aktivitesi, % 0.5 derisiminde glukoz ortamda ek olarak kullanıldığında belirlenmiştir (0.102 U/ml). % 1 derisimde glukoz içeren ortamda lipaz aktivitesi 0.086 U/ml, % 0.1 derisimde glukoz içeren ortamda ise 0.040 U/ml olarak bulunmuştur. Spesifik aktiviteler incelendiğinde ise protein derisimlerinden gelen farklılık nedeniyle % 1 ve % 0.5 derisimlerinde glukoz ilavesinin lipaz üretimine olumlu etki yaptığı görülmüştür.

Bu sonuçlar ışığında lipaz aktiviteleri temel alınmış ve ortama glukoz ilavesinin lipaz üretimini olumsuz etkilediği belirlenmiştir.

#### 5.2.1.4 Bazı Karbon Kaynaklarının Hücre İçi Lipaz Aktivitesine Etkisi

Lipaz üretmek üzere kaynak olarak kullanılacak mikroorganizmanın ürettiği enzimi hücre dışına salgılayabilmesi, elde edilen enzimin ticari kullanımında büyük önem taşımaktadır. Üretilen enzimin hücre içerisinde tutulması ile enzim eldesi için yapılması gereken işlem sayısı artacak ve elde edilen enzim miktarı ile hücre içerisindeki proteinlerin çok sayıda ve çeşitli olmasından dolayı enzimin saflığı düşük olacaktır. Çalışmada kullanılan *Bacillus* sp. türü mikroorganizmanın ürettiği lipaz enzimini hücre içerisinde tutma kapasitesini belirlemek amacıyla hücre içeriği elde edilmiş ve lipaz enzimi miktarları belirlenmiştir. Kullanılan bazı substratlar için hücre içi lipaz aktiviteleri incelendiğinde, hücre içerisinde tutulan lipaz aktivitelerinin hücre dışına salgılanan enzime oranla çok düşük seviyelerde kaldığı görülmüştür. Genellikle hücre dışı lipaz aktiviteleri düşük bulunan substratların kullanıldığı ortamlarda, hücre içi lipaz aktiviteleri yüksek bulunmuştur. Bunun yanında yüksek hücre dışı lipaz aktiviteleri elde edilen susam yağlarının kullanıldığı ortamlarda, bir miktar lipaz enziminin hücre içerisinde tutulduğu belirlenmiştir.

Hücre içi lipaz aktiviteleri incelendiğinde; hücre dışı lipaz aktivitesi çok düşük olan % 0.5 mısır özü yağı ile en yüksek hücre içi lipaz aktivitesi (0.011 U/mg hücre) elde edilmiştir. Bunu sırasıyla % 1 triolein (0.0084 U/mg hücre), % 1 susam yağı (1) (0.008 U/mg hücre), % 1 soya yağı (0.005 U/mg hücre), susam yağı (2) ve % 1 glukoz (0.0046 U/mg hücre), % 1 susam yağı (2) (0.004 U/mg hücre), % 0.5 susam yağı (2) (0.0036 U/mg hücre), susam yağı (2) ve % 0.5 glukoz (0.003 U/mg hücre), % 0.5 susam yağı (1) (0.002 U/mg hücre) izlemektedir. Susam yağı (2) ve % 0.1 glukoz, % 0.5 soya yağı ve % 1 tribütirin içeren ortamlarda hücre içi lipaz aktivitesi saptanmamıştır.

Hücre içi lipaz aktivitelerinin belirlenmesi ile elde edilen lipaz enziminin mikroorganizma tarafından hücre dışına salgılandığı ve az bir miktarının hücre içerisinde tutulduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile yüksek aktiviteleri, maksimum aktiviteye ulaşma zamanının kısaldığı ve hücre dışına enzim salgılanması yönleri ile izole edilen *Bacillus* sp. türü mikroorganizmanın lipaz kaynağı olarak endüstriyel öneme sahip olduğu belirlenmiştir.



### **5.2.1.5 Karbon Kaynakları Etkisi İncelenen Ortamlarda Ulaşılan Hücre Derisimleri**

Yüksek lipaz üretimi sonuçlanan ortamlarda genel olarak hücre çoğalmasının da fazla olduğu görülmektedir. Ancak düşük lipaz aktivitesi olan ortamlarda yüksek hücre derisimleri de görülmüştür. Bitkisel yağlar içerisinde en yüksek hücre derisimine aktivitesiyle paralel olarak % 1 derisimde susam yağı (2) kullanıldığında (2.489 g/L), en düşük hücre derisimine ise % 0.5 derisimde zeytin yağı kullanıldığında (0.369 g/L) ulaşılmıştır.

Yağ asitleri ve yağ asidi esterleri içeren ortamlarda, bitkisel yağlara göre daha düşük hücre derisimlerine ulaşılmıştır. Yağ asitleri içerisinde en yüksek hücre derisimine % 1 derisimde oleik asit kullanıldığında (2.489 g/L), en düşük hücre derisimine ise % 0.5 derisimde asetik asit kullanıldığında (0.050 g/L) ulaşılmıştır. Yağ asidi esterleri içerisinde en yüksek hücre derisimine triolein kullanıldığında (2.587 g/L), en düşük hücre derisimine ise triasetin kullanıldığında (0.088 g/L) ulaşılmıştır. Yağ asitleri içerisinde oleik asit ve onun esteri triolein kullanıldığında en yüksek hücre derisimlerine ulaşılması ilgi çekicidir. 18 karbonlu ve yapısında tek çift bağ taşıyan bu bileşiklerin hücre çoğalmasını indükleyici etkisi olabileceği düşünülmektedir. Glukoz içeren ortamlarda ise lipaz aktivitelerine paralel olarak hücre derisimleri değişmektedir.

### **5.2.2 pH Etkisi**

Lipaz üretimine önemli etkisi bulunan faktörlerden biri olan pH etkisi 6, 7, 7.5, 8, 8.5 ve 9 değerleri için incelenmiştir.

Lipaz aktivitesi bakımından en yüksek değerlere pH=7.5 için (0.201 U/ml) ulaşılmıştır. Daha sonra pH=7 olduğunda (0.087 U/ml), pH=8 olduğunda (0.046 U/ml), pH=6 olduğunda (0.030 U/ml), pH=8.5 olduğunda (0.027 U/ml), pH=9 olduğunda (0.024 U/ml) olarak bulunmuştur. Maksimum aktiviteye ulaşılan zamanlar bakımından değerlendirilirse, pH=6 ve 9'da 54 saatte, diğer pH değerleri için 48 saatte ulaşılmıştır. Burada lipaz üretimi için optimal değer olan pH=7.5'den uzaklaşildikçe aktivite değerlerindeki düşüş ile beraber maksimum lipaz aktivitesine ulaşma zamanı da uzamaktadır. Deney sonunda pH değerleri ölçüldüğünde tüm ortamlarda pH'in 8.5'e yaklaştığı görülmektedir. Buradan mikroorganizmanın çoğalması için optimal değer 8.5 olabileceği düşünülebilir. Hücre

derisimleri sonuçları içerisinde pH=8.5 degerinde görülen artis bu düşünceyi desteklemektedir.

Protein derisimleri bakımından, en yüksek protein miktarına pH=7.5 için (0.356 mg/ml) ulasilmistir. Daha sonra pH=9 oldugunda 0.321 mg/ml, pH=8 oldugunda 0.282 mg/ml, pH=6 oldugunda 0.279 mg/ml, pH=8.5 oldugunda 0.248 mg/ml, pH=7 oldugunda 0.204 mg/ml olarak bulunmustur. Protein miktarlari lipaz aktiviteleri ile paralellik içerisindedir. Buna bagli olarak spesifik lipaz aktivitelerinde pH=6 ve 9 degerlerinde yükselme disinda lipaz aktivitesine benzer sonuçlar elde edilmistir.

### 5.2.3 Sicaklik Etkisi

Lipaz üretiminde önemli parametrelerden biri olan sicaklik etkisi; 37, 40, 45 ve 50 °C degerleri için incelenmistir.

Lipaz aktivitesi bakımından en yüksek degerlere t=45 °C ortam sicakliginda ulasilmistir (% 100). Daha sonra t=40 °C oldugunda bagil olarak % 33.7, t=37 °C oldugunda % 19.1, t=50 °C oldugunda % 10.1 bagil lipaz aktivitesine ulasilmistir. Maksimum aktiviteye ulasilan zamanlar bakımından degerlendirilirse, t=45 °C ortam sicakliginda maksimum lipaz aktivitesine ulasilan zaman 24, diger sicakliklarda ise 48 saattir.

Çesitli sicakliklarda hücre derisimleri incelenirse en yüksek hücre derisimine 40 °C'de ulasildigi görülmüştür (1.111 g/L). Sicaklik 50 °C' ye çıkarildiginda hücre çoğalmasinin çok düşük seviyelere indigi görülmüştür (0.118 g/L).

Sonuç olarak *Bacillus* sp. türünde mikroorganizmanın çoğalması için optimum sicakligin 40 °C, lipaz üretimi için en uygun sicakligin ise 45 °C oldugu görülmüştür. 45 °C'de kısa zamanda (24 h) yüksek lipaz aktivitelerine ulasabilme yetenegi ile *Bacillus* sp. türü mikroorganizmanın lipaz kaynagi olarak endüstriyel açıdan önem tasidigi belirlenmistir.

### 5.2.4 Azot Kaynaklari Etkisi

Azot kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla, öncelikle daha önceki tüm deneyler boyunca azot kaynagi olarak kullanılan pepton ve maya özütünün farklı derisimlerinin

etkisi incelenmiştir. Bunlara ek olarak üre, jelatin; doğal kaynak olarak mısır unu, soya unu ve iki ayrı çeşit buğday ununun lipaz üretimine etkisi incelenmiştir.

Lipaz aktivitesi bakımından en yüksek değerlere % 1 pepton ve % 1 maya özütü kullanılan ortamda ulaşılmıştır (% 117.5). Diğer tüm ortamlarda lipaz aktivitesi kontrol grubuna (% 0.5 pepton ve % 0.3 maya özütü) göre düşük lipaz aktiviteleri elde edilmiştir. Pepton ve maya özütü kullanımı karşılaştırıldığında, lipaz üretimini maya özütü kullanımının daha fazla indüklediği (% 86.4), ancak lipaz üretimi için en uygun azot kaynaklarının pepton ve maya özütünün beraber kullanımı olduğu belirlenmiştir. Enzimin ticari kullanımı hedeflendiği için kontrol grubu azot kaynakları derisimi ile çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir. Doğal kaynaklar ile organik azot kaynakları kullanımı kıyaslanırsa bitkisel unlar lipaz üretimini daha fazla indüklemiştir. Lipaz üretiminin en düşük seviyede olduğu ortam ise jelatin içeren ortamdır (% 18.9).

### **5.2.5 Metal İyonları Etkisi**

Lipaz üretimine etkileyen faktörlerden biri olan iyonlarının etkisi iki ayrı derisim için incelenmiştir. 1 mM ve 10 mM derisimlerinde NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, LiCl ve CuSO<sub>4</sub> içeren lipaz üretim ortamları hazırlanarak, katkısız ortamdaki lipaz aktiviteleri % 100 kabul edilmiş ve metal iyonlarının etkisi bağli olarak incelenmiştir.

Ortama ilave edilen iyon miktarları bakımından, 1 mM iyon derisiminin, 10 mM derisimden daha yüksek lipaz aktiviteleri ile sonuçlandığı belirlenmiştir. Tüm ortamlarda iyon derisiminin 10 kat artması ile hücre çoğalmasının olumsuz etkilendiği görülmüş ve lipaz üretiminin az miktarlardaki hücre derisimlerine bağli olarak 10 mM derisimlerde düşük olduğu belirlenmiştir. Yüksek lipaz aktivitesine ulaşılan ortamlarda, yüksek hücre derisimlerine ulaşıması ile bu düşünce desteklenmektedir.

Ortamlarda bulunan (SO<sub>4</sub>)<sup>-2</sup> ve Cl<sup>-</sup> iyonları açısından değerlendirme yapılacak olursa; (SO<sub>4</sub>)<sup>-2</sup> iyonlarının Cl<sup>-</sup> iyonlarına oranla olumlu etkisi olduğu görülmüş, Cl<sup>-</sup> iyonlarının lipaz üretimini baskılayıcı yönde etkisi olabileceği düşünülmektedir.

1 mM iyon derisimleri baz alınarak değerlendirme yapılacak olursa; CaCl<sub>2</sub> (% 39.4) ve CuSO<sub>4</sub> (% 10.9) içeren ortamlarda lipaz üretiminin inhibe olduğu, bunların disındaki iyonların varlığında ise lipaz üretiminin stimüle olduğu belirlenmiştir. Derisim 10 mM'a çıkarıldığında FeCl<sub>3</sub> (% 47.1), MgCl<sub>2</sub> (% 32.3), MgSO<sub>4</sub> (% 30.0), CaCl<sub>2</sub> (% 11.8), CuSO<sub>4</sub> içeren ortamlarda lipaz aktivitesinde inhibisyon görülmektedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde *Bacillus* sp. türü mikroorganizmanın, ortamda bulunan metal iyonlarını kendi çoğalması ve lipaz üretimini arttırması bakımından verimli şekilde kullanabildiği sonucuna ulaşılmıştır.

### 5.2.6 Optimal Kosullarda Lipaz retimi

En yüksek lipaz aktivitesine ulaşılan lipaz üretim ortamında, (pH=7.5, T=45 °C, karbon kaynağı olarak % 1 derisimde susam yağı (2), azot kaynağı olarak % 0.5 pepton ve % 0.3 maya özütü, 1mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren ortam) yapılan üretim sonucunda;

Hücre içerisinde ve disında, zamana bağlı olarak lipaz aktivitesindeki değişimler ve ulaşılan değerler spektrofotometrik ve titrimetrik yöntemlerle tayin edilmiş ve lipaz aktivitelerinde zamana bağlı olarak değişimler açısından iki farklı yöntemle elde edilen sonuçlar arasındaki paralellik ortaya koyulmuştur.

Yapılan proteaz aktivitesi analizi ile, mikroorganizmanın ürettiği tüm proteaz enzimini hücre disına salgıladığı ve 48. saatte proteaz aktivitesinin maksimum değerde olduğu belirlenmiştir. Aynı saatte görülen lipaz aktivitesinde ve protein miktarındaki dssn nedeni, artan proteaz aktivitesi etkisi ile ortamda bulunan lipaz enziminin parçalanması olarak belirlenmiştir.

Zaman içerisinde hücre derisimi ölçümleri ile mikroorganizma çoğalma eğrisi belirlenmiş ve 40. saate kadar mikroorganizmanın çoğaldığı, 48. saatten itibaren ise artan enzim aktiviteleri ile olusan metabolik atıklara bağlı olarak hücre çoğalmasında azalma olduğu görülmüstür.

### **5.3 Lipazın Üretim Ortamından Ayrılması ve Saflaştırılması**

Lipaz enzimi saflaştırılması üç basamakta gerçekleştirilmiştir. Öncelikle hücreler ortamdan ayrılmıştır. Bu basamakta spesifik lipaz aktivitesi 100.2 U/mg'dir. İkinci basamakta ultrafiltrasyon yapılmış ve 5 kDa'dan küçük molekül ağırlığındaki proteinler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu basamakta spesifik lipaz aktivitesi 86.6 U/mg'dir. İki basamak arasında görülen spesifik aktivitedeki düşüşün nedeni zamanla azalan lipaz aktivitesi ve ultrafiltrasyon sonrası protein miktarındaki derişme olarak düşünülmektedir. Saflaştırma için yapılan son işlem anyon değistirici kromatografidir. Kromatografi sonrası elde edilen ürün çok düşük protein derişimleri sebebiyle yüksek spesifik aktiviteye sahiptir (1333 U/mg).

SDS-PAGE sonuçları incelendiğinde, lipaz enziminin bulunması beklenen 6 numaralı kuyucukta 40 kDa molekül ağırlığında iki bant, 45 kDa molekül ağırlığında tek bir bant ve 20 kDa molekül ağırlığında bir bant görülmektedir. Lipaz aktivitesi bulunmayan diğer kuyucuklar ile kıyaslandığında, sadece 6 numaralı kuyucukta bulunan yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığındaki iki bantın lipaz enzimine ait olduğu düşünülmüştür. SDS-PAGE sonuçlarına göre enzimin kısmi olarak saflaştırıldığı belirlenmiştir.

Enzimin saflığını arttırmak üzere izoelektrik noktalarına göre ayırma ek olarak molekül ağırlıklarına göre ayırım yapılan yöntemler de kullanılarak saf lipaz elde edilebilir.

### **5.4 Saflaştırılmış Lipazın Deterjan Katkı Maddeleri ile Kullanım Potansiyeli**

Kısmi olarak saflaştırılmış lipaz, % 1 derişiminde deterjan katkıları ile (proteaz, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, EDTA ve SDS) N=100 rpm, T= 45 °C koşullarında bir saat süresince inkübe edilmiş ve bir saat sonunda korunan lipaz aktivitesi bağıl olarak belirlenmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, enzimin EDTA varlığında tamamen inhibe olduğu görülmüştür. SDS içeren ortamda enzim aktivitesini büyük ölçüde kaybetmektedir (% 75). Tween 20 ve 80 içeren ortamlarda lipaz aktivitesinin yarısı, proteaz ve Triton X-100 içeren ortamlarda ise lipaz aktivitesinin % 75'i korunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile lipaz enzimi aktivitesinin deterjan katkılarını büyük ölçüde tolere edebildiği belirlenmiştir.

Lipaz üretiminde önemli olan parametrelerin incelenmesi literatürde ulaşılan bilgiler ile kıyaslanırsa;

Literatürde karbon kaynağı olarak bitkisel yağların kullanımı ile yüksek lipaz aktivitelerine ulaşılan çalışmalar yer almaktadır (Lee vd. 2001, Kumar vd. 2005, Kambourova vd. 2003). Bu yüksek lisans çalışmasında da bitkisel yağ kullanımı ile yağ asitleri ve yağ asidi esterleri ile ulaşılandan daha yüksek lipaz aktivitelerine ulaşılmıştır. Literatürde rastlanmayan ancak ülkemizde ticari olarak kullanılan susam yağı ile en yüksek lipaz aktivitelerine ulaşılmıştır. Literatürde karbon kaynağı olarak bitkisel yağların kullanımı ile ilgili bilgiler, kaynaklarının birbirleri ile karşılaştırılması ile sınırlıdır. Bu çalışmada lipaz üretimi için en uygun karbon kaynağının seçilmesinin yanı sıra, yağların derisimlerindeki değişimler ile lipaz üretiminin farklı derecelerde indüklenebildiği belirlenmiştir. Literatürde karbon kaynağı olarak yağ asidi esterleri kullanımı ile lipaz üretiminin indüklendiği çalışmalar yer almaktadır (Dharmsthiti vd. 1999, Kim vd. 2002, Nawani vd. 2000). Çalışmamızda da yağ asidi esterleri kullanımı ile lipaz üretiminin indüklendiği belirlenmiştir. Karbon kaynakları etkisi parametresi içerisinde bitkisel yağlara ve yağ asidi esterlerine ek olarak literatürde yer almayan, ancak lipaz üretimini indükleyebileceğini düşündüğümüz yağ asitlerinin etkisi incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde yağ asitlerinin, yağ asidi esterlerine göre daha düşük seviyede olsa da lipaz üretimini indüklediği belirlenmiştir.

Bu yüksek lisans çalışması, *Bacillus* sp.'den lipaz üretiminde ülkemize özgü bitkisel yağların kullanımı, yağ derisiminin lipaz üretiminin indüklenmesi bakımından çok etkili olduğunun belirlenmesi ve yağ asitlerinin de lipaz üretiminde kaynak olarak kullanılabilmesinin gösterilmesi bakımından da önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*,72; 248-254.
- Cernia, E., Deflini, M., Cocco, E.D., Palocci, C. and Soro, S. 2002. Investigation of lipase catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: use of NMR spectroscopy methods to study substrate-enzyme interaction. *Bioorganic Chemistry*,30; 276-284.
- Chaplin, M.F. and Bucke, C. 1990. *Enzyme technology*. Cambridge University Press, 40-72.
- Castro-Ochoa, L.D., Gomez, C.R., Alfaro, G.V., Ros, R.O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*,37; 648-654.
- Dharmstithi, S. and Luchai ,S. 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. *THL027*. *FEMS Microbiology Letters*,179; 241-246.
- Ghanem, E.H., Al-Sayed, H., Saleh, K.M. 2000. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*,16; 459-464.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbial Biotechnology*,64; 763-781.
- Hasan, F., Aamer, A.S., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*,39; 235-251.
- Hung, T., Gridhar, R., Chiou, S. and Wu, W. 2003. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,26; 69-78.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22; 307-313.
- Kanwar, S.S., Ghazi, I.A., Chimni, S.S., Joshi, G.K., Rao, G.V., Kaushal, R.K., Gupta, R., Punj, V. 2006. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallolipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein Expression and Purification*,46; 421-428.

- Kim, H.K., Choi, H.J., Kim, M.H., Sohn, C.B. Oh, T.K. 2002. Expression and characterization of Ca<sup>2+</sup>-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochimica et Biophysica Acta*,1583; 205-212.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Shamsheer, S.K. and Gupta, R. 2005. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*,41; 38–44.
- Kuske, R.C., Banton, K.L., Adorada, D.L., Stark, P.C., Hill, K.K. and Jackson, P.J. 1998. Small-Scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2463-2472.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)*,227; 680-685.
- Lee, D., Kim, H., Lee, K., Kim, B., Choe, E., Lee, H., Kim, D., Pyuna, Y. 2001. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*,29; 363-371.
- Lima, V.M.G., Kriegera, N., Mitchell, D.A., Barattic, J.C., Filippis, I. Fontanae, J.D. 2004. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,31; 53-61.
- Moon, S.H. and Parulekar, S.J. 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-back cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering*,37(5); 467-483.
- Nawani, N., Kaur, J. 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*,206; 91-96.
- Nthangeni, M.B., Patterton H.G., Tondera, A., Vergeerc, W.P., Litthauera, D. 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on: *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology*,28; 705-712.
- Rocha, J.F., Soto, J.O., Hernandez, M.C. and Garcia, M.M. 2005. Determination of the hydrocarbon-degrading metabolic capabilities of tropical bacterial isolates. *International Biodeterioration and biodegradation*,55; 17-23.
- Ruiz, C., Pastor, J., Diaz, P. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. *Letters in Applied Microbiology*,37; 354-359.
- Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. and Gulati, R. 1999. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*,77; 101-115.



Schlieben, N.H., Niefind, K. and Schomburg, D. 2004. Expression, purification, and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. Protein Expression and Purification ,34; 103–110.

Sekhon, A., Dahiya, N., Tiwari, R.P., Hoondal G.S. 2005. Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1. J. Basic Microbiology,45; 147-154.

Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F., Chen, S. 2001. Optimization of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification and Characterization. Protein Expression and Purification,22; 388-398.

Sharma, R., Chistib, Y. and Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. Biotechnology Advances,19; 627–662.

Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Gupta, L.K. and Gupta, J.K. 2002 .Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. Process Biochemistry,37; 1075–1084.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Ulasim Tarihi Kasim 2006)

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> (Ulasim Tarihi Ekim 2006)

<http://textbookofbacteriology.net> (Ulasim Tarihi Nisan 2005)

<http://www.au-kbc.org/> (AU-KBC Research Centre) (Ulasim Tarihi Nisan 2005)

## EKLER

- EK1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler
- EK 2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri Ve Kullanılan Miktarlar
- EK3 *p*-Nitrofenil (PNF) Kalibrasyon Grafiği
- EK4 Spektrofotometrik Aktivite Örnek Hesabi
- EK5 Titrimetrik Aktivite Örnek Hesabi
- EK6 Proteaz Kalibrasyon Grafiği
- EK7 Proteaz Aktivitesi Örnek Hesabi
- EK8 Kuru Hücre Kalibrasyon Grafiği
- EK9 Protein (BSA) Kalibrasyon Grafiği
- EK10 16S rRNA Analizleri
- EK11 Bitkisel Yağların Yağ Asitleri Analizi

**EK 1. DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL VE  
BİYOKİMYASAL MADDELER**

<i><b>Kimyasal/Biyokimyasal</b></i>	<i><b>Firma</b></i>	<i><b>Katalog No</b></i>
Agar	Scharlau	07.004
Akrilamid	BioRad	161-0148
Ammonium Persulfate	BioRad	161-0700
Asetik Asit	Merck	1.00056
Aseton	Merck	1.00013
Bakir Sülfat	AppliChem	A3880
BSA	Sigma	A9647
Coomassie Blue	Sigma	B0770
Çinko Klorür	Merck	1.08816
Demir (III) Klorür	Merck	1.03943
EDTA	Sigma	E9884
Etanol	Merck	1.11727
Fosforik Asit	Merck	1.00573
Gliserol	Sigma	G5516
Glukoz	Merck	1.04074
Hidroklorik Asit	Merck	1.00314
Jelatin	Sigma	G9391
Kalsiyum Klorür	AppliChem	A4689
Kazein	Sigma	C5890
Linoleik Asit	Sigma	SL1376
Lityum Klorür	Merck	1.05679
Magnezyum Klorür	Fluka	63065
Magnezyum Sülfat	Merck	1.05886
Maya Özütü	Scharlau	07-079
NücleoSpin Tissue	Macherey-Nagel	740952.50
Oleik Asit	Sigma	O1630
Palmitik Asit	Sigma	P5585
Pepton	Fluka	70171

---

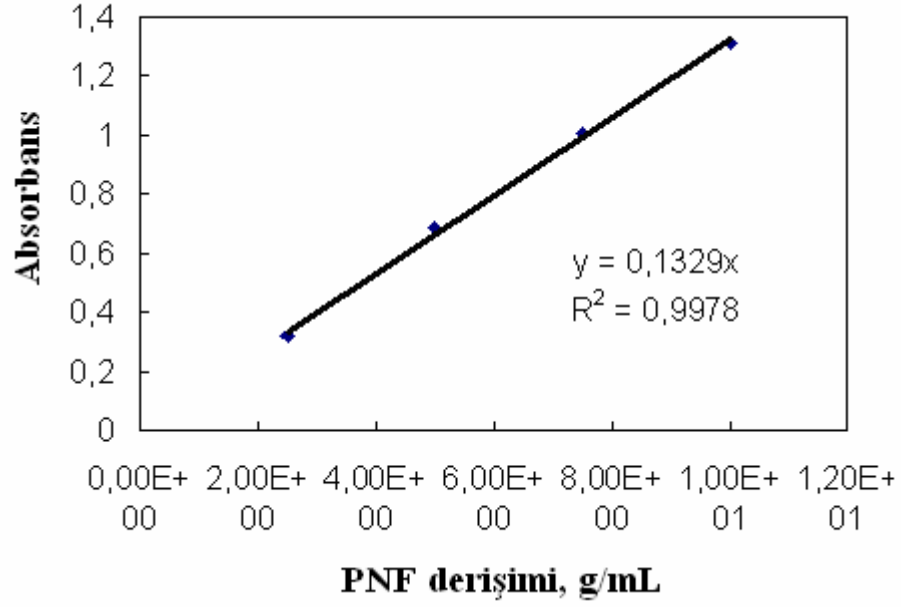
Potasyum Klorür	Scharlau	PO0200
Potasyum Sülfat	Merck	1.05153
Proteaz	Sigma	P5380
P-Nitro Fenil Palmitat	Sigma	N2752
SDS	BioRad	161-0302
Silver Stain Kit (ProteoSilver)	Sigma	025K6146
Sodyum Fosfat Mono Bazik	Sigma	S0751
Sodyum Fosfat Dibazik Dodeka Hidrat	Fluka	71649
Sodyum Hidroksit	Scharlau	SO0420
Sodyum Karbonat	Scharlau	SO0116
Sodyum Klorür	AppliChem	A2942
Sodyum Sülfat	Merck	1.06643
Sodyum Tetra Borat	Sigma	S6940
Stearik Asit	Sigma	17,536-6
TCA	Merck	1.00810
Temed	BioRad	161-0801
Triasetin	Sigma	S5376
Tribütirin	Sigma	T8626
Trioktanoat	Sigma	T9126
Triolein	Sigma	T7752
Tripalmitin	Sigma	ST5888
Tristearin	Sigma	T5016
Trisma Base	Sigma	T6066
Triton X-100	Sigma	T8787
Tween 20	Applichem	A4974
Tween 80	Merck	8.22187
Üre	Merck	1.08488

---

## EK 2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN BİLESENLERİ

Bileşenler	Kullanılan Miktarlar
Distile Su	36.7 µl
10x PCR Tamponu	5 µl
dNTP Karisimi	1 µl
Primer Karisimi	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
Taq DNA Polimeraz	0.3 µl
DNA Kalip	2 µl
Toplam Miktar	50 µl

**EK 3. *p*-NİTROFENİL (PNF) KALİBRASYON GRAFIGI**



#### EK 4. SPEKTROFOTOMETRİK AKTIVİTE ÖRNEK HESABI

Bir ünite enzim (U), 1 dakikada 1 µmol PNF üretimi için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Lambert Beer Kanunu:

$$A = \epsilon bC$$

$$\epsilon = 13290 \text{ L/mol cm (EK 2)}$$

$$b = 1 \text{ cm}$$

Aktivite tayininde kullanılan enzim hacmi: 1 ml

$$V_T (\text{Toplam Hacim}) = 4 \text{ ml}$$

$$t = 5 \text{ dk}$$

$$A = \epsilon b C = 13290 \text{ L/(mol cm)} * 1 \text{ cm} * (1 \text{ mol}/106 \text{ µmol}) * (103 \text{ ml}/1\text{L}) (1/V_T \text{ ml})$$

$$A/5 = 13290/103 * 4 \text{ µmol}$$

$$0.06 * A = \text{µmol/dk}$$

$$0.06 * A = U$$

## EK 5. TITRİMETRİK AKTİVİTE ÖRNEK HESABI

Bir ünite enzim (U), zeytinyagından dakikada 1 mikrosdeger yag asiti hidrolizleyen (açığa çıkaran) enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

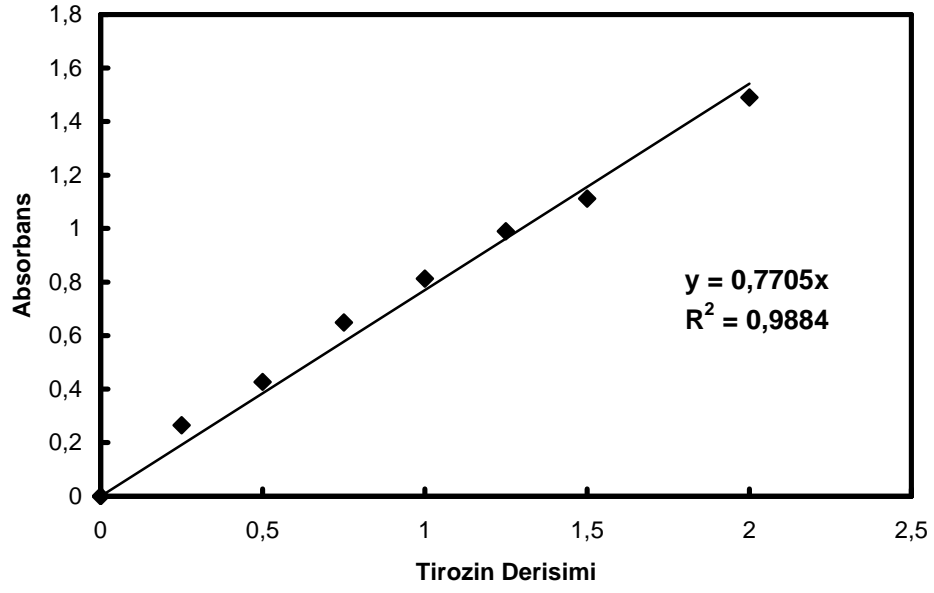
$$\text{U/ml enzim} = (\text{Örnek için harcanan ml NaOH} - \text{Kör için harcanan ml NaOH}) * [\text{NaOH}] * 1000 * 1 * 1 / (\text{ml enzim}) * 30 \text{ dk}$$

$$\text{U/ml enzim} = (\text{Örnek için harcanan ml NaOH} - \text{Kör için harcanan ml NaOH}) * 0.1 * 1000 * 1 * 1 / (0.1 \text{ ml enzim}) * 30 \text{ dk}$$

$$\text{U/ml enzim} = (\text{Örnek için harcanan ml NaOH} - \text{Kör için harcanan ml NaOH}) * 33.3$$



## EK 6. PROTEAZ KALIBRASYON GRAFIGI



## EK 7. PROTEAZ AKTIVİTESİ ÖRNEK HESABI

Bir ünite enzim (U) dakikada 4 nmol tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$U/ml \text{ enzim} = (\mu\text{mol/ml} * F * 1000\text{nmol}) / (4 * 20 \text{ dk} * 1\mu\text{mol})$$

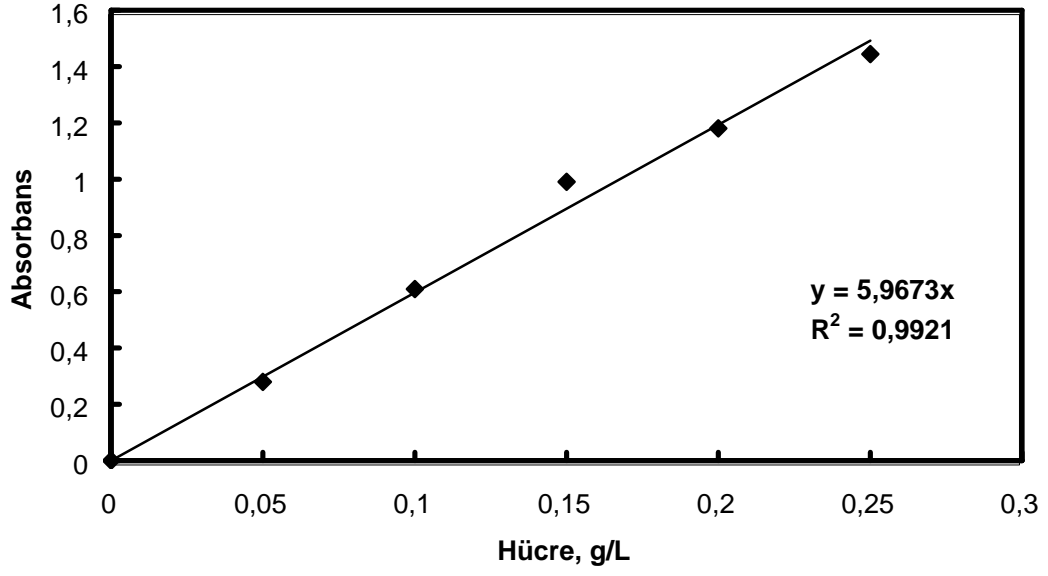
F= Seyrelme Faktörü

$$F=1$$

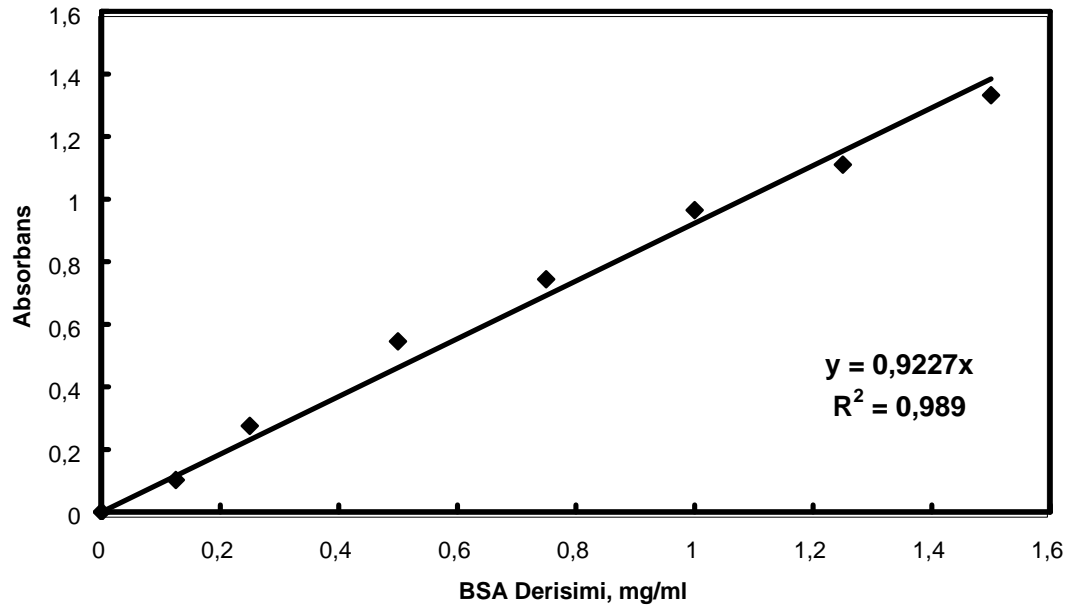
$$U/ml \text{ enzim} = (A / 0,7705 \mu\text{mol} / (1 \text{ ml enzim}) * F * 1000\text{nmol}) / (4 * 20 \text{ dk} * 1\mu\text{mol})$$

$$U/ml \text{ enzim} = A * 16.22$$

## EK 8. KURU HÜCRE KALIBRASYON GRAFIGI

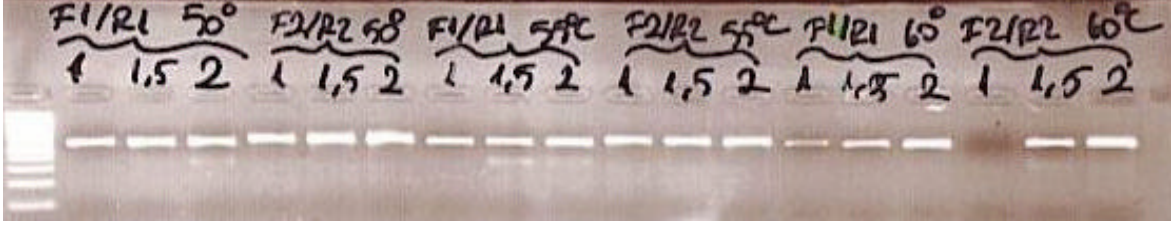


## EK 9. PROTEIN (BSA) KALIBRASYON GRAFIGI



## EK 10. 16S rRNA ANALIZLERİ

PCR Optimizasyonu:



DNA Sekans Analiz Sonuçları:

F1

AGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGATATGCGTAGAGATGTGGAGGAA  
CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAG  
CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA  
GTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC  
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG  
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGT

F2

CAGATGGGAGCTTGCTCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG  
TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT  
GGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTA  
CAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  
AACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA  
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGC  
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGT  
ACCTAAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
ACGTGGCAAGCGTCGTCCGGAAT

## EK 11. BITKİSEL YAĞLARIN YAĞ ASİTLERİ ANALİZİ

### Esterleştirme Metodu:

Anonymus, 1987. Standart Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivates, International Union of Pure and Applied Chemistry, 7 th ed., Blackwell Scientific Publications, IUPAC Method 2.301.

Gaz Kromatografisi : ThermoQuest 2000  
Dedektör : FID  
Kolon : Fused Silica Kapillar Kolon Teknoroma TRB-WaxOmega (30mX0.25mm I.D. ve 0.25 µ film kalınlığı)  
Tasiyici Gaz : He, 80 kPa  
Split Oranı : 1:85  
Enjeksiyon Blogu : 250 °C  
Kolon : 205 °C  
Dedektör : 250 °C

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0
Susam yağı (1)	7.163	0.130	3.733	31.716	55.733	0.065	0.333	0.209	0.918
Susam yağı (2)	5.959	0.108	3.632	35.995	53.032	0.115	0.297	0.189	0.673
Ayçiçek yağı	6.024	0.086	3.388	26.157	63.335	0.075	0.143	0.128	0.663
Soya yağı	13.798	0.136	3.396	25.059	51.208	5.623	0.313	0.248	0.219
Misirözü yağı	12.199	0.172	1.822	27.679	56.777	0.859	0.296	0.194	-
Zeytin yağı	12.312	0.815	2.698	73.383	9.207	0.638	0.454	0.325	0.168

## ÖZGEÇMİS

20.04.1981 tarihinde İzmir’de doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini İzmir’de tamamladı. 1998 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2004 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 2004 yılında, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek lisans öğrenimine başladı.

Biyoteknoloji Enstitüsü Proteomibilim Birimi’nde 15.06.2006 tarihinden bu yana Biyolog olarak görev yapmaktadır.

### **Yayınları:**

Marul, B., Takaç, S., Dönmez, G. 5-8/09/2006. *Bacillus* Türü Mikroorganizmalardan Lipaz Üretiminde Karbon Kaynakları ve pH’in Etkisi, 7. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı, BT 05.