

**FARKLI MAYA KÜLTÜRLERİNDEN LİPAZ ÜRETİMİ  
VE  
VERİM ARTIRIMI**

**LIPASE PRODUCTION FROM VARIOUS YEASTS  
AND  
YIELD IMPROVEMENT**

**ÖZGÜR KEBABCI  
A0183745**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ (BİYOTEKNOLOJİ) ANABİLİM DALI**  
'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Üye : Prof. Dr. Kadir Halkman

Üye : Prof. Dr. Günay KİBARER

Üye : Doç. Dr. Sumru ÇITAK

ONAY

Bu tez .../.../.... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

.../.../....

Prof. Dr.  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

**Sevgili Babam**

**ve**

**Anneme**

## Farklı Maya Kùltürlerinden Lipaz Üretimi ve Verim Artırımı

Özgür Kebabcı

### ÖZ

Bu çalışmada *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195, Yerli Suşu ve zeytinyağı imalathanesi atık toprak örneğinden izole ettiğim bir maya türünden lipaz üretimi karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Yeni izole maya kültürünün tanımlanması yapılmış ve *Candida tropicalis* olduğu saptanmıştır. Her maya kültürü için ayrı lipaz üretim optimizasyonu araştırılmıştır. Tüm maya suşlarında optimum lipaz üretim sıcaklık aralığının 20-40<sup>0</sup>C, pH aralığının 3-5 olduğu saptanmıştır. Maksimum lipaz üretim sıcaklığı tüm suşlarda 30<sup>0</sup>C'dir. Çeşitli karbon ve azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisi incelenmiş ve sonuçta besiyeri ortamındaki şekerlerin lipaz üretimini önemli ölçüde etki etmediği saptanmıştır. Ancak zeytin, ayçiçek, mısır, soya ve kanola yağlarının lipaz üretimini bir miktar artırdığı tespit edilmiştir. Azot kaynakları ilave edilen besiyeri ortamlarında en yüksek aktivite *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda 16 U/ml, *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda 11,67 U/ml, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 10,67 U/ml ve *Candida tropicalis* suşunda 10,33 U/ml olarak amonyum sülfatlı kültürlerde saptanmıştır. Sıcaklığın enzime etkisi araştırılarak optimum sıcaklık aralığının 10-60<sup>0</sup>C'lerde olduğu gözlenmiştir. Çeşitli atık ve artıkların değerlendirilmesi amacıyla besiyeri ortamlarına eklenmiş melas, zeytin kara suyu, zeytin küspesi arasından en yüksek aktivite zeytin küspesi ilave edilmiş ortamlarda saptanmıştır. En yüksek lipaz aktivitesi gösteren suş olan *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunun lipaz enzimi saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra lipaz enzimi 5,63 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzim, kaba enzim ve *Y. lipolytica* NBRC 1658 suşu farklı destek materyallerine tutuklanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Lipaz, Üretim, Optimizasyon, *Candida tropicalis*, *Yarrowia* sp.

Danışman: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

# Lipase Production From Various Yeasts and Yield Improvement

Özgür Kebabcı

## ABSTRACT

In this study, production of lipase by *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195, *Y. lipolytica* Domestic Strain and a strain isolated from olive oil mill waste soil were investigated comparatively. The new strain's identification was carried out and identified as *Candida tropicalis*. Optimization of lipase production from each yeast strain was studied. Optimum temperature range was 20-40°C and optimum pH range was 3-5 respectively and maximum lipase production for all strains were 30°C. The effect of various carbon sources as sugars and oils also investigated and it is detected that sugars have no much effect on production of lipase but oils such as olive, sunflower, corn, soya and canola oil increased the production of lipase. When the effect of various nitrogen sources studied, the maximum production of lipase was seen in medium with ammonium sulfate, and maximum lipase production was detected in this study, for *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 strain 16 U/ml, *Y. lipolytica* IFO 1195 strain 11,67 U/ml, *Y. lipolytica* Domestic Strain 10,67 U/ml and *Candida tropicalis* strain 10,33 U/ml respectively. The effect of temperature on lipase enzyme of strains was studied and optimum temperature range of the enzyme was found as 10-60°C. Various wastes added in the lipase production media, and maximum lipase production was found in the medium with olive pulp. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 strain showed the highest lipase production and selected for purification studies. After ammonium sulphate precipitation and dialysis lipase enzyme was purified 5.63 fold. Purified enzyme, crude enzyme and *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 strain was immobilized on various carriers such as k-karrageenan, sodium alginate and agar-agar.

**Key Words:** Lipase, Production, Optimization, *Candida tropicalis*, *Yarrowia* sp.

Advisor: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR, Hacettepe University, Department of Biology, Biotechnology Section

## **TEŞEKKÜR**

Bu çalışmanın gerçekleőtirilmesinde yol gösterici ve karőılaőılan güçlüklerin aőılmasında yardımcı olan Prof. Dr. Nilüfer Cihangir (tez danıőmanı), Prof. Dr. Nilüfer Aksöz (Hacettepe Üniversitesi, Biyololoji Bölümü), Prof. Dr. Kadir Halkman'a (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) ve *Yarrowia* suşlarının temininde göstermiő olduğu ilgiden dolayı Prof. Dr. Yeőim zbaő'a (Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

## SAYFA

ÖZ.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç.....	2
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Enzimoloji Tarihçesi .....	4
2.2. Endüstriyel Enzimler ve Lipaz .....	6
2.3. Lipazların Gruplandırılması .....	8
2.4. Lipazların Enzimolojik Özellikleri.....	10
2.4.1. Hücre dışı lipaz aktivitesi .....	11
2.4.2. Substrat özgüllüğü.....	11
2.5. Mikrobiyal Lipazlar .....	12
2.5.1. Psikrotrofik bakteriler .....	12
2.5.2. Küf mantarları.....	14
2.5.3. Mayalar.....	14
2.6. Maya Türlerinin Özellikleri.....	14
2.6.1. <i>Yarrowia</i> cinsi ve <i>Yarrowia lipolytica</i> türünün genel özellikleri .....	14
2.6.2. <i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 1658 ve IFO 1195 suşunun özellikleri.....	18
2.6.3. <i>Candida tropicalis</i> türünün genel özellikleri .....	18
2.7. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemleri.....	20
2.8. Lipaz Üretimini Etkileyen Faktörler.....	22
2.8.1. Karbon kaynağı .....	22
2.8.2. Azot kaynağı.....	23
2.8.3. Aktivatörler, stimulatörler ve inhibitörler.....	23
2.8.4. Yüzey-etki ajanları.....	24
2.8.5. Sıcaklık, pH ve aşılama .....	24
2.9. Lipazların Endüstriyel Uygulama Alanları.....	25
2.9.1. Deterjanlar .....	26
2.9.2. Gıda ve beslenme .....	27
2.9.3. Tekstil.....	28
2.9.4. Tıp ve farmasötik.....	29
2.9.5. Diğer.....	29
2.10. Lipazların Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu .....	31
2.10.1. Saflaştırma .....	31
2.10.2. İmmobilizasyon.....	33
3. YÖNTEM.....	39
3.1. Mikroorganizmalar .....	39
3.1.1. Mikroorganizma izolasyonu .....	39
3.1.2. Yeni izole maya suşunun tanımlanması .....	40
3.2. Mikroorganizmalarda Lipolitik Aktivite Tayini.....	40
3.2.1. Tributirinli agar besiyeriyle lipolitik aktivite tayini.....	40
3.3. Mikroorganizmalarda Lipaz Sentezi Tayini .....	41

3.4. Maya Suşlarının Özellikleri.....	42
3.4.1. Hücre morfolojisinin incelenmesi .....	42
3.4.2. Koloni morfolojisinin incelenmesi .....	42
3.4.3. Mayaların biyokimyasal testleri.....	42
3.4.3.1. Katalaz aktivitesinin tayini .....	42
3.4.3.2. Nitratı nitrite indirgeme özelliği .....	42
3.4.3.3. Amilolitik aktivite tayini .....	43
3.4.3.4. Üreaz tayini.....	43
3.5. Mayaların Üretim Koşullarının Optimizasyonu .....	43
3.5.1. Üretim ortamı .....	43
3.5.2. Aşılama ve kültürasyon.....	44
3.5.3. Üreme eğrileri .....	44
3.5.4. Hücre sayımı .....	44
3.5.5. Üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi.....	45
3.5.6. Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi .....	45
3.5.7. Üretim ortamı havalandırma hızının üremeye etkisi .....	46
3.5.8. Karbon kaynaklarının üremeye etkisi .....	46
3.5.9. Azot kaynağının üremeye etkisi.....	47
3.5.10. Çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi .....	48
3.6. Lipaz Üretim Optimizasyonu .....	49
3.6.1. Lipaz üretim ortamı .....	49
3.6.2. Aşılama ve kültürasyon.....	49
3.6.3. Lipaz aktivite tayini .....	49
3.6.4. Enzim lokalizasyonunun saptanması.....	50
3.6.5. Üretim ortamı sıcaklığının lipaz sentezine etkisi.....	50
3.6.6. Üretim ortamı pH'sının lipaz sentezine etkisi.....	50
3.6.7. Üretim ortamı aerasyon hızının lipaz sentezine etkisi .....	51
3.6.8. Karbon kaynağının lipaz sentezine etkisi.....	51
3.6.9. Azot kaynağının lipaz sentezine etkisi.....	53
3.6.10. Çeşitli atık ve artıkların lipaz üretimine etkisi .....	54
3.7. Lipazın Enzimolojik Özellikleri.....	54
3.7.1. Substrat konsantrasyonu .....	54
3.7.2. Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi .....	55
3.8. Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması .....	55
3.8.1. Kaba enzim ekstresinin hazırlanması .....	55
3.8.2. Amonyum sülfat ile çöktürme .....	55
3.8.3. Diyaliz.....	56
3.8.4. Total protein miktarının hesaplanması .....	56
3.9. İmmobilizasyon .....	57
3.9.1. Sodyum alginata tutuklama çalışmaları .....	57
3.9.2. k-Karrageenana tutuklama çalışmaları.....	57
3.9.3. Agara tutuklama çalışmaları .....	58
4. SONUÇLAR .....	59
4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu .....	59
4.2. Mikroorganizmalarda Lipolitik Aktivite Tayini .....	59
4.2.1. Tributirinli agar besiyeriyle lipolitik aktivite tayini.....	59
4.3. Mikroorganizmalarda Lipaz Aktivite Tayini .....	60
4.4. Maya Suşlarının Özellikleri.....	60
4.4.1. Hücre morfolojisinin incelenmesi .....	60
4.4.2. Koloni morfolojisinin incelenmesi.....	63



4.4.3. Maya suşlarının biyokimyasal testleri .....	65
4.4.3.1. Katalaz aktivitesinin tayini .....	65
4.4.3.2. Nitratı nitrite dönüştürme özelliği.....	65
4.4.3.3. Amilolitik aktivite tayini .....	66
4.4.3.4. Üreaz tayini.....	66
4.5. Mayaların Üretim Koşullarının Optimizasyonu .....	67
4.5.1. Üretim ortamı .....	67
4.5.2. Aşılama ve kültürasyon.....	67
4.5.3. Üreme eğrisi .....	67
4.5.4. Hücre sayımı .....	70
4.5.5. Üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi.....	70
4.5.6. Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi .....	73
4.5.7. Üretim ortamı havalandırma hızının üremeye etkisi .....	76
4.5.8. Karbon kaynağının üremeye etkisi .....	78
4.5.9. Azot kaynağının üremeye etkisi.....	87
4.5.10. Çeşitli atık-artıklar ve lipaz üretimini artıran birtakım maddelerin üremeye etkisi .....	92
4.6. Lipaz Üretim Optimizasyonu .....	97
4.6.1. Lipaz üretim ortamı .....	97
4.6.2. Aşılama ve kültürasyon.....	97
4.6.3. Lipaz sentez tayini .....	98
4.6.4. Enzim lokalizasyonunun saptanması.....	98
4.6.5. Üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi .....	99
4.6.6. Üretim ortamı pH'sının lipaz sentezine etkisi.....	101
4.6.7. Üretim ortamı havalandırma hızının lipaz aktivitesine etkisi .....	104
4.6.8. Karbon kaynağının lipaz aktivitesine etkisi .....	106
4.6.9. Azot kaynağının lipaz aktivitesine etkisi.....	114
4.6.10. Çeşitli atık-artıklar ve lipaz üretimini artıran maddelerin enzim aktivitesine etkisi .....	119
4.7. Lipazın Enzimolojik Özellikleri.....	124
4.7.1. Substrat konsantrasyonu .....	124
4.7.2. Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi .....	126
4.8. Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması .....	129
4.8.1. Kaba enzim ekstresinin hazırlanması .....	129
4.8.2. Amonyum sülfat ile çöktürme .....	129
4.8.3. Diyaliz.....	130
4.8.4. Total protein miktarının hesaplanması .....	131
4.9. İmmobilizasyon .....	131
5. TARTIŞMA.....	133
KAYNAKLAR.....	142

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 2.1. Endüstriyel enzim satışlarının dağılımı. ....	8
Şekil 2.2. Lipazların yapı ve özgüllüğü. ....	12
Şekil 2.3. YM agarda askospor görüntüsü. ....	15
Şekil 2.4. <i>Yarrowia lipolytica</i> 'nın özellikleri. ....	16
Şekil 2.5. <i>Yarrowia lipolytica</i> 'nın filogenetik ağacındaki yeri. ....	17
Şekil 2.6. <i>Candida tropicalis</i> 'in özellikleri. ....	19
Şekil 2.7. Lipazların triaçilgliserollerini hidrolizi. ....	22
Şekil 2.8. 2009 Yılına kadar uygulama alanları ile birlikte küresel enzim marketleri. ....	25
Şekil 2.9. İmmobilize hücre (agregat) komponentleri. ....	35
Şekil 2.10. Fiziksel mekanizmalarına göre immobilizasyon yöntemleri. ....	36
Şekil 4.1. Yeni izole edilen maya suşunun filogenetik analizi. ....	59
Şekil 4.2. Tributirin Agarlı besiyerinde güne bağlı lipaz aktivitesi. ....	60
Şekil 4.3. <i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 1658 suşunun mikroskop görüntüleri. ....	61
Şekil 4.4. <i>Yarrowia lipolytica</i> IFO 1195 suşunun mikroskop görüntüsü. ....	62
Şekil 4.5. <i>Yarrowia lipolytica</i> Yerli Suşunun mikroskop görüntüsü. ....	62
Şekil 4.6. <i>Candida tropicalis</i> suşunun mikroskop görüntüsü. ....	63
Şekil 4.7. YM Agar'da üretilen mayaların koloni morfolojileri. ....	65
Şekil 4.8. <i>Candida tropicalis</i> ve <i>Yarrowia</i> suşlarının üreme eğrileri. ....	68
Şekil 4.8. Devamı... <i>Candida tropicalis</i> ve <i>Yarrowia</i> suşlarının üreme eğrileri. ...	69
Şekil 4.9. Üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi. ....	71
Şekil 4.9. Devamı... Üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi. ....	72
Şekil 4.10. Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi. ....	74
Şekil 4.10. Devamı... Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi. ....	75
Şekil 4.11. Üretim ortamı aerasyon hızının üremeye etkisi. ....	76
Şekil 4.11. Devamı... Üretim ortamı aerasyon hızının üremeye etkisi. ....	77
Şekil 4.11. Devamı... Üretim ortamı aerasyon hızının üremeye etkisi. ....	78
Şekil 4.12. Farklı yağların üremeye etkisi. ....	79
Şekil 4.12. Devamı... Farklı yağların üremeye etkisi. ....	80
Şekil 4.13. Farklı mono ve disakkaritlerin üremeye etkisi. ....	82
Şekil 4.13. Devamı... Farklı mono ve disakkaritlerin üremeye etkisi. ....	83
Şekil 4.14. Farklı mono ve disakkaritlere ilave olarak %1 riviera zeytinyağının üremeye etkisi. ....	85
Şekil 4.14. Devamı... Farklı mono ve disakkaritlere ilave olarak %1 riviera zeytinyağının üremeye etkisi. ....	86
Şekil 4.15. Farklı azot kaynaklarının üremeye etkisi. ....	88
Şekil 4.15. Devamı... Farklı azot kaynaklarının üremeye etkisi. ....	89
Şekil 4.16. Azot kaynakları ve riviera zeytin yağının üremeye etkisi. ....	90
Şekil 4.16. Devamı... Azot kaynakları ve riviera zeytin yağının üremeye etkisi. ...	91
Şekil 4.17. Çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi. ....	93
Şekil 4.17. Devamı... Çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi. ....	94
Şekil 4.18. Çeşitli atık ve artıklara ilave olarak %1'lik zeytin yağı rivieranın üremeye etkisi. ....	95
Şekil 4.18. Devamı... Çeşitli atık ve artıklara ilave olarak %1'lik zeytin yağı rivieranın üremeye etkisi. ....	96
Şekil 4.19. Maya suşlarının hücre dışı ve hücre içi lipaz aktivitesi. ....	98

Şekil 4.20. Üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi. ....	99
Şekil 4.20. Devamı... Üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi. ....	100
Şekil 4.20. Devamı... Üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi. ....	101
Şekil 4.21. Üretim ortamı pH'sının lipaz aktivitesine etkisi. ....	102
Şekil 4.21. Devamı... Üretim ortamı pH'sının lipaz aktivitesine etkisi. ....	103
Şekil 4.22. Üretim ortamı aerasyon hızının lipaz aktivitesine etkisi. ....	104
Şekil 4.22. Devamı... Üretim ortamı aerasyon hızının lipaz aktivitesine etkisi. ..	105
Şekil 4.22. Devamı... Üretim ortamı aerasyon hızının lipaz aktivitesine etkisi. ..	106
Şekil 4.23. Farklı yağların lipaz aktivitesine etkisi. ....	107
Şekil 4.23. Devamı... Farklı yağların lipaz aktivitesine etkisi. ....	108
Şekil 4.24. Farklı mono ve disakkaritlerin lipaz aktivitesine etkisi. ....	109
Şekil 4.24. Devamı... Farklı mono ve disakkaritlerin lipaz aktivitesine etkisi. ...	110
Şekil 4.24. Devamı... Farklı mono ve disakkaritlerin lipaz aktivitesine etkisi. ...	111
Şekil 4.25. Mono-disakkaritlere ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi. ....	112
Şekil 4.25. Devamı... Mono-disakkaritlere ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi. ....	113
Şekil 4.26. Farklı azot kaynaklarının lipaz sentezine etkisi. ....	115
Şekil 4.26. Devamı... Farklı azot kaynaklarının lipaz sentezine etkisi. ....	116
Şekil 4.27. Farklı azot kaynaklarına ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi. ....	117
Şekil 4.27. Devamı... Farklı azot kaynaklarına ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi. ....	118
Şekil 4.28. Çeşitli atık-artıkların lipaz aktivitesine etkisi. ....	120
Şekil 4.28. Devamı... Çeşitli atık-artıkların lipaz aktivitesine etkisi. ....	121
Şekil 4.29. Çeşitli atık-artıklar ve %1 riviera zeytin yağının lipaz sentezine etkisi. . .....	122
Şekil 4.29. Devamı... Çeşitli atık-artıklar ve %1 riviera zeytin yağının lipaz sentezine etkisi. ....	123
Şekil 4.30. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi. ....	124
Şekil 4.30. Devamı... Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi. ...	125
Şekil 4.30. Devamı... Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi. ...	126
Şekil 4.31. Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi. ....	127
Şekil 4.31. Devamı... Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi. ....	128
Şekil 4.32. a) Verim ve b) Saflaştırma katsayılarının hesaplanması. ....	130
Şekil 4.33. Dana Serum Albumin standart eğrisi. ....	131
Şekil 4.34. Agar-agar, Na-Alginat ve k-Karrageenan'a tutuklama. ....	132

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 2.1. Bir endüstriyel tarama programının genel şeması. ....	7
Çizelge 2.2. Lipaz üreten mikroorganizmalar. ....	13
Çizelge 2.3. <i>Yarrowia lipolytica</i> 'nın eşanlamlıları. ....	15
Çizelge 2.4. Lipaz tayin metodları. ....	21
Çizelge 2.5. Lipaz Üretimini Etkileyen Faktörler. ....	24
Çizelge 2.6. Endüstriyel Lipazların Uygulama Alanları. ....	30
Çizelge 2.7. Birtakım bakteri ve fungal lipazların saflaştırma yöntemleri. ....	32
Çizelge 2.8. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri. ....	33
Çizelge 2.9. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar. ....	34
Çizelge 3.1. Sıvı yağların özellikleri. ....	52
Çizelge 4.1. <i>Yarrowia</i> suşları ve <i>Candida tropicalis</i> suşunun katalaz aktivitesi. ....	65
Çizelge 4.2. <i>Yarrowia</i> suşları ve <i>Candida tropicalis</i> suşunun nitrat redüksiyon tayini. .....	66
Çizelge 4.3. <i>Yarrowia</i> suşları ve <i>Candida tropicalis</i> suşunun nişasta hidrolizi. ....	66
Çizelge 4.4. <i>Yarrowia</i> suşları ve <i>Candida tropicalis</i> suşunun üreaz tayini. ....	66
Çizelge 4.5. Sıvı stok kültürlerdeki hücre sayıları. ....	70
Çizelge 4.6. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası saflaştırma değerleri. ....	129
Çizelge 4.7. Diyaliz sonrası saflaştırma değerleri. ....	130

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AAGR	Average Annual Growth Rate = ortalama yıllık büyüme oranı
atm	Atmosfer
BSPs	Biyokütle Destek Partikülleri
d.su	Distile su
FFA	Serbest Yağ Asiti
g	Gram
L	Litre
ml	Mililitre
O.D.	Optik yoğunluk
PDA	Patates Dekstroz Agar
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Reverse Per Minute)
SDB	Sabouraud Dekstroz Broth
SCO	Tek Hücre Yakıtı (Single Cell Oil)
SCP	Tek Hücre Proteini (Single Cell Protein)
TAG	Triaçilgliserol
TTC	2,3,5-Trifenil Tetrazolium Klorid
U/ml	Ünite/mililitre
YLL	<i>Yarrowia lipolytica</i> Lipazı
YM Agar	Katı Maya Küf Agar Besiyeri (Yeast Mold Agar)
YM Broth	Sıvı Maya Küf Besiyeri (Yeast Mold Broth)
Z.yağı	Zeytin Yağı

## 1. GİRİŞ

Biokatalizörler hakkındaki bilgimiz son 200 yılda önemli bir biçimde artış göstermiştir. Lipitler üzerinde rol oynayan enzimlere olan bilimsel ilgi uzun bir geçmişe sahiptir, öncelikle bu ilgi lipazlar üzerine yoğunlaşmıştır sonrasında ise fosfolipazlar, lipooksijenazlar ve monooksijenazlar önem kazanmıştır. Bu ilginin ana sebebi yılda ortalama 90 milyon ton yağın dünya genelinde üretimi ve besin maddesi olarak kullanılması olabilir. Bununla birlikte hayvan ve bitkilerden elde edilen yağların hepsi de insan beslenmesi için çok da uygun değildir, örneğin yüksek oranda doymuş yağ asitleri kardiyovasküler hastalıklara neden olmaktadır.

Doğadaki mevcut tüm enzimlerin içinde hidrolazlar, muhtemelen en kolay kullanıma sahip olanlardır çünkü kofaktörlere gereksinim duymazlar ve genellikle işleme koşullarında oldukça kararlı kalmaktadırlar. Bu özellikler lipazlar ve fosfolipazlar için de geçerlidir. Birçok lipaz ticari olarak üretilmektedir ve bir takım endüstriyel süreçlerde bu lipazlar kullanılmaktadır (Bornscheuer, 2000).

Lipazlar diğer adıyla triaçilgliserol hidrolazlar, trigliseritlerin gliserol ve yağ asitlerine hidrolizinden sorumlu olan enzimlerdir. Lipaz ilk olarak 1834'de Eberle ve 1856'da Bernard tarafından pankreas örneklerinde saptanmıştır. Amilaz ve proteazlar ile birlikte üç temel sindirim enzimlerinden biri olmuştur. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar lipaz üretmektedir. Lipazlar bir takım farklı hayvan dokularında pankreatik, gastrik ve pregastrik lipazlar olarak tanımlanmıştır. Bunların arasında en sıklıkla çalışılan pankreatik lipazlardır. Ancak günümüzde bakteri ve fungal lipazlara olan ilgi daha fazladır. Mikrobiyal lipazlar nispeten kararlı ve çeşitli reaksiyonların katalizini gerçekleştirme yetisindedirler ve bu nedenle endüstriyel uygulamalarda daha önemli bir yere sahip olmuşlardır (Hou, 2002).

Lipazlar, proteazlar gibi deterjan endüstrisinde kullanılmalarına rağmen sıklıkla gıda endüstrisinde özellikle süt endüstrisinde ve peynir yapımında büyük rol oynamaktadır. Ancak et ve balık endüstrisinde de fazla yağın uzaklaştırılmasında lipazlar kullanılır. Bu yaygın kullanım alanlarının dışında lipazlar tekstil, ilaç ve kozmetik endüstrisinde de kullanılmaktadır. Özellikle ilaç endüstrisinde sindirim yardımcıları ilaçlara ilave edilmektedir.

Endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılan lipazların mikrobiyal kaynaklardan tarama çalışmaları halen devam etmektedir. Hou ve Johnston, sistematik olarak 1000'den fazla mikrobiyal kültürde lipaz taraması yapmışlardır ve daha önce bildirilenlerden daha farklı lipaz aktiviteleri saptamışlardır. Bu yeni lipaz aktiviteleri pH ve termostabilitelerine göre değerlendirilmiştir. Johann ve Rozor ayrıca 6000 mikroorganizmada steroselektif ve bölgeselektif enzimler için tarama yapmışlardır (Hou, 2002).

Tüm bu araştırmaların ışığında lipazlar halen günümüzde sıklıkla çalışılan bir konudur ve yeni mikrobiyal kaynaklardan farklı özelliklere sahip yeni lipazların tanımlama çalışmaları devam etmektedir.

### **1.1. Amaç**

Bu çalışma kapsamında başlıca mayalar olmak üzere farklı fungal kültürlerden lipaz aktivite tayini yapılmış ve üretim koşulları optimize edilerek verim artırımını araştırılmıştır.

Enzim kaynakları olarak dünya mikroorganizmalarının sadece yaklaşık %2'si test edilmiştir (Hasan ve ark., 2006). Diğer bir deyişle yaklaşık %98'lik bir kısım henüz taranmamıştır. Bu nedenle araştırmacılar mevcut suşların yanısıra enzim üretiminde topraktan ve sudan yeni mikrobiyal kaynakları taramaya devam etmektedir.

*Candida*, *Endomycopsis* veya *Saccharomycopsis lipolytica* olarak da bilinen *Yarrowia lipolytica* en fazla çalışılan, klasik olmayan mayalardandır. *Y. lipolytica* insanlara patojen değildir ve Genellikle Güvenli (Generally Recognized As Safe, GRAS) endüstriyel mikroorganizmalardan olduğu kanıtlanmıştır. Zorunlu aerobik, dimorfik *Ascomycetes* olan *Yarrowia lipolytica*, organik asitler ve hücre dışı proteinler gibi büyük miktarda farklı metaboliti doğal olarak salgılamaktadır. Hidrofobik substratlarla biyodönüşüm reaksiyonlarında *Y. lipolytica*'nın kullanımını içeren birkaç yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan bazılarının biyoremediasyon, kimya ve gıda endüstrileri alanlarında patentleri alınmıştır. Örneğin, *Y. lipolytica* alkan ve yağ asidi biyodönüşümünde, aroma üretiminde, tek hücre proteininde (SCP), tek

hücre yakıtında (SCO), ve steroid transformasyonlarında kullanılabilir (Aloulou ve ark., 2007).

Geçmişte ve günümüzde *Y. lipolytica*'dan lipaz üretimi ve kullanım alanları ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Yano ve ark., 2008, Japonya'da her yıl balık atıklarının 2 milyon tonu bulunduğunu belirterek balık atıklarından lipit giderimi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Bunun yanısıra zeytinyağı imalathanelerinin atık sularında *Y. lipolytica* kullanılarak lipit giderimine yönelik çalışmalar da mevcuttur (Scioli ve Vollaro, 1997, Lanciotti ve ark., 2005, D'Annibale ve ark., 2006). *Y. lipolytica*'dan lipaz üretimi ve bu lipazın kullanımı ile ilgili çalışmaların yanısıra bunların saflaştırılması, karakterizasyonu ve genetiği üzerine de bir çok araştırma yapılmaktadır (Yu ve ark., 2007, Aloulou ve ark., 2007). *Y. lipolytica* haricinde başlıca *Rhizopus sp.* ve *Candida sp.* olmak üzere bir çok literatür mevcuttur. Özellikle bitkisel yağlar kullanılarak *Rhizopus oryzae*'den biodizel üretim çalışmaları dikkat çekmektedir (Zeng ve ark., 2006). Bir diğer çalışmada *Candida antarctica* immobilize lipazı kullanılarak gliseril ferulat sürekli üretimi çalışılmıştır. Felurik asit bitkilerde bağlı veya serbest halde bulunan ve gıda ve kozmetikte fizyolojik özelliklerinden dolayı hammadde olarak kullanılan bir maddedir (Matsuo ve ark., 2008). Fujino ve ark., 2006, *Candida utilis*'den fosfolipaz B'nin saflaştırılması ve karakterizasyonunu araştırmışlardır. *Candida rugosa* lipaz izoenzimlerinin sekansı Brocca ve ark., 2003, tarafından araştırılmıştır. Özellikle *Rhizopus sp.*, *Candida sp.*, *Aspergillus sp.* gibi fungal ve *Bacillus sp.* ve *Pseudomonas sp.* gibi bakteriyel lipazlar üzerine literatür çalışmalarına sıklıkla rastlanmaktadır.

Çalışma kapsamında *Yarrowia* suşlarının lipaz üretimi araştırıldıktan sonra besiyeri ortamına karbon ve azot kaynakları eklenerek verim artırımı araştırılmıştır, bu karbon ve azot kaynaklarına ilave olarak birtakım sanayi artık ve atıkları da besiyeri ortamına eklenerek lipaz üretiminin artırımı incelenmiştir. Sitrik asit üretiminde potent suşlar olan *Yarrowia* suşlarının lipaz üretiminde de kullanıldıkları bilinmektedir. Bu potent suşlara ilave olarak bir zeytinyağı imalathanesinden alınan toprak örneğinden izole edilen bir maya türü de çalışmaya dahil edilerek lipaz üretiminin verim artırımı çalışmaları yapılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Enzimoloji Tarihçesi

Yaşam çok iyi düzenlenmiş kimyasal reaksiyonlara bağlıdır. Bununla birlikte bu reaksiyonların pek çoğu, yaşamın devamı için kendi başlarına çok yavaş ilerlemektedir. Bundan dolayı doğa katalizörleri tasarlamıştır, bunlar günümüzde enzimler olarak adlandırılır ve yaşam için gerekli kimyasal reaksiyonları oldukça hızlandırmaktadırlar. Enzimlerin katalitik güçleri virüslerden insanlara kadar tüm yaşam formlarında hayatı kolaylaştırmaktadır. Birçok enzim organizmalardan elde edildikten sonra dışarıda da potansiyel katalitik aktivitelerini korumaktadır ve bu özelliklerinden dolayı insanoğlu ticari uygulamalar için enzimlerin katalitik güçlerinden faydalanmada fazla zaman kaybetmemiştir (Copeland, 2000).

Enzim kullanımının en eski kaynağı M.Ö. 2100 yıllarına kadar uzanmaktadır, Antik Babil'de Hammurabi'nin el yazmalarında şarap yapımının tarifinde yer almaktadır. Bu tip kaynaklara sadece Babil'de değil Roma, Yunan, Mısır, Çin ve Hindistan yazıtlarında da rastlanmaktadır. Antik yazıtlarda sirke yapımına ilişkin kaynaklar da mevcuttur ve antik yaşamda sirke sadece gıda depolamada değil tıbbi amaçlarla da uygulanmıştır (Copeland, 2000).

Antik çağlarda süt ürünleri de önemli bir yere sahip olmuştur. Peynir kesilmiş süt ile hazırlanmıştır. Bu amaçla incir ağacından elde edilen ficin ve çoklu mideye sahip hayvanların 4. odacığında elde edilen rennin (rennet) kullanılmıştır. Ficin'in enzimatik aktivitesine kaynak olarak Homeros'un Iliada'sı gösterilebilir (Copeland, 2000).

Bir diğer önemli ürün ise ekmeğindir. Ekmeğin mayalar ile muamele edilmesi iyi bilinen bir işlem olup antik çağlarda yaygın olarak kullanılmıştır. Etlerin yumuşatılması da antik çağlara kadar uzanmaktadır. Pasifik adalarındaki yerli halk papaya meyvesinin sıvısını sertleşmiş etlerde kullanmışlardır. Bu bitkideki aktif enzim proteazdır ve papain olarak bilinmektedir ve günümüzde halen etin yumuşatılmasında kullanılmaktadır.

18. ve 19. Yüzyıllarda bilim adamları enzimlerin etkilerini daha sistematik biçimde araştırmaya başlamışlardır. Fransız bilim adamı Réaumur (1683-1757) akbabaların sindirimini incelemiştir ve akbabaların midesinde etin 24 saatte sindirildiğini saptayarak olayın fiziksel değil kimyasal bir süreç olduğunu saptamıştır. Çözücü adını verdiği bu gastrik sıvılar belkide enzim özgüllüğü ile ilgili yapılmış ilk deneysel çalışmalardır. Réaumur'un çalışmaları daha sonra Spallazani (1729-1799) tarafından genişletilmiş ve bu gastrik sıvıların laboratuvar ortamlarında da etki gösterdiği saptanmıştır. 19. Yüzyılın sonlarında ise bu sıvıları saf halde elde etme çalışmalarının ilki 1897'de Bertrand tarafından gerçekleştirilmiştir. Bertrand lakkaz enzimini kısmi olarak saflaştırmıştır. Aynı zamanlarda maya özütlerinde kataliz çalışmaları yapan Kühne ile 'enzim terimi' literatüre girmiştir.

Daha sonraları bilimin hızlı gelişmesiyle birlikte enzimler ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Emil Fisher enzim ve substratı arasındaki ilişkide anahtar-kilit modelini ortaya atmıştır. 1903 yılında Victor Henri enzim kinetiğini açıklayan matematik modelini yayınlamıştır. Ancak 1913'de Michaelis ve Menten, Henri'nin çalışmasını genişleterek günümüzde Michaelis-Menten eşitliğini olarak bilinen formülü yayınlamışlardır.

1926'da James Summer ilk olarak üreaz enziminin kristalizasyonunu yapmıştır. Summer'ın kristalizasyon çalışmasını takiben 20 yılda 130'dan fazla enzim kristali elde edilmiştir. Daha sonra x-ray diffraksiyonu ve günümüzde NMR metodları ile birçok enzimin 3 boyutlu yapıları saptanmıştır. 1950'lerde amino asit sekanslarının tespit edilmesiyle hem proteinlerin hem de proteinler içinde yer alan enzimlerin yapılarının anlaşılması kolaylaşmıştır. Günümüzde NMR metodları ve magnetizasyon transfer metodları ile solusyonlardaki küçük enzim moleküllerinin 3 boyutlu yapıları ve enzim bağlarının yapıları saptanabilmektedir (Copeland, 2000).

Enzimler halen bilimsel ve ticari çalışmaların konusu olmaktadır. Birçok mikroorganizmadan tarama çalışmaları yapılarak farklı özgüllükteki enzimlerin saptanmasına ve ticari olarak kullanılan enzimlere alternatif ürünlerin elde edilmesi çalışmalarına devam edilmektedir.

## 2.2. Endüstriyel Enzimler ve Lipaz

Enzimlerin hücre dışında da katalitik aktiviteye sahip olmaları endüstriyel alanlarda kullanılabilmelerini mümkün kılmaktadır. Bugün bir çok enzim endüstriyel alanda yaygın biçimde kullanılmaktadır. Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek verimde enzim elde etmek için ya doğadan yeni izolatların eldesi yoluna gidilmekte ya da üretim koşullarının optimizasyonu sağlanmaktadır. Ticari olarak endüstriyel alanda mikrobiyal enzim üretimine ilk kez 1890'da A.B.D.'nde kurulan Japon Takamine şirketi tarafından üretilen Takadiastaz enzim preperasyonu ile başlanmıştır (Aunstrup, 1980).

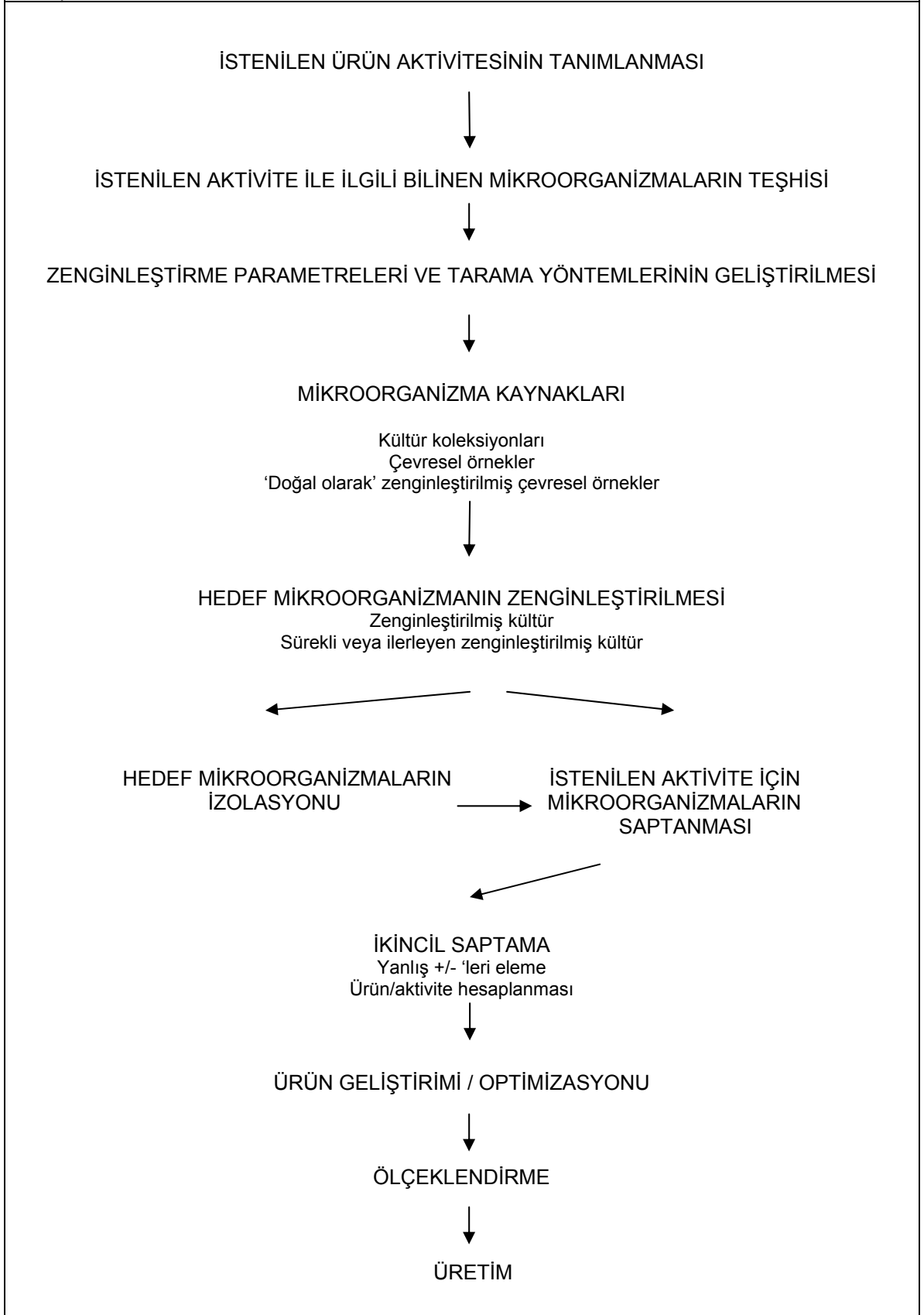
Günümüzde endüstriyel alanlarda kimyasal prosesler yerine artık daha ucuz ve pratik olan biyolojik proseslerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Özellikle enzim biyoteknolojisinin gelişimiyle başta gıda endüstrisi olmak üzere mikroorganizmaların kullanım alanları gittikçe artmaktadır. Böylelikle enzim üretimi başlı başına bir endüstri olmuştur ve bilimsel çalışmalarla desteklenerek gelişimini sürdürmektedir. Amilaz, proteaz vb birçok enzim endüstriyel boyutta üretilmektedir. Bu enzimlerden birisi de lipazdır.

Bilimsel alanda meydana gelen hızlı gelişime teknolojik gelişme de eklendiğinde bugünkü biyoteknolojik uygulamalar doğmuştur. Günümüzde bir çok biyolojik ürünün üretimi yapılmakta ve bu ürünler dünya pazarında önemli bir yer edinmektedir. Ancak elde edilmek istenen ürün için belirli bir yol izlenmesi gerekmektedir. Çizelge 2.1.'de bir endüstriyel tarama programının genel şeması görülmektedir:

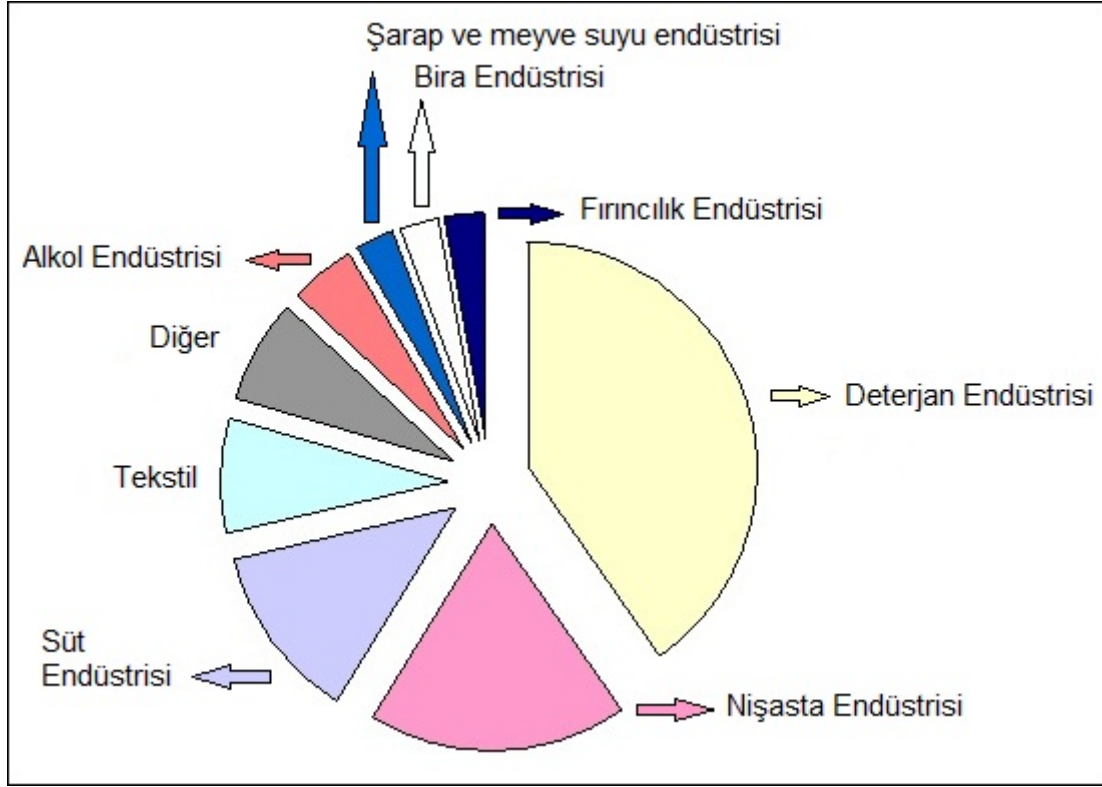
- İlgili aktivitenin belirlenmesi,
- Aktivite ile ilgili bilinen mikroorganizmaların incelenmesi,
- Zenginleştirme ve tarama protokollerinin geliştirilmesi,
- Yeni mikroorganizmalar için kaynakların saptanması ve
- Tarama metodunun geliştirilmesidir (Steele ve Stowers, 1991).

Bu yöntem ile istenilen mikroorganizma ve ürünün eldesi kolaylaşmaktadır.

Çizelge 2.1. Bir endüstriyel tarama programının genel şeması (Steele ve Stowers, 1991).



Mikroorganizmalar dünya genelinde onlarca milyar dolar değerinde yüzlerce ticari ürünün üretiminde kullanılmaktadırlar. Endüstriyel uygulamalarda enzimler önemli bir yer almaktadır. Bu nedenle son yıllarda enzimler geniş endüstriyel ölçekte üretilmektedirler, (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Endüstriyel enzim satışlarının dağılımı, (Falch, 1991).

Lipazlar (EC 3.1.1.3) triaçilgliserolester hidrolazların bir üyesidir ve öncelikle ilk olarak serbest yağ asidi, mono- ve digliserol oluşturmak için mono-, di- ve trigliserollerin hidrolizini, ikinci olarak bununla birlikte tersine gliserol ve yağ asitlerinden mono-, di- ve trigliserol sentezini ve üçüncü olarak da gliseroller ve gliserol ve yağ asitleri arasında interesterifikasyonları katalizler (Hadeball, 1991). Çok iyi bilinmektedir ki lipazlar hidrofobik yüzeylere yüksek affinite gösterirler ve kataliz esnasında tam katalitik aktivitelerini yağ/su arayüzeyinde adsorblanarak göstermektedirler.

### 2.3. Lipazların Gruplandırılması

Lipazlar trigliseritler üzerindeki hidrolitik aktivitelerine ilaveten esterifikasyon, interesterifikasyon, asidoliz, alkolozis ve amilozis reaksiyonlarını da katalizlerler (Hasan ve ark., 2009). Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda oluşmaktadır ve

bundan dolayı bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal lipazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Nerede olurlarsa olsunlar triaçilgliseridlerin gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlerini katalizlemekte görevlidirler. Karbohidraz ve proteazlar gibi lipazlarda da mikrobiyal kaynaklar daha fazla endüstriyel öneme sahiptir çünkü bitki ve hayvan lipazlarına göre daha kararlıdır ve düşük maliyette daha fazla üretilmektedirler (Vakhlı ve Kour, 2006).

Belirli uygulamaların ışığında lipazlar 4 ana gruba ayrılmaktadır (Rezanka, 1991). İlk grup daha yüksek alkoller tarafından daha yüksek yağ asitlerinin esterifikasyonunu katalizleyen esterazları içerir. Örneğin palmitik asit ve hexadecanol'den (cetylalcohol) hexadecyl palmitate'ın (cetylpalmitate) formasyonu esteraz ile katalizlenmektedir. Bir diğer örnek de *Rhizopus arrhizus* hücrelerince katalizlenen esterifikasyondur.

İkinci grup endüstriyel lipazları içermektedir. Bu enzimler (EC 3.1.1.3) triaçilgliserollerini di- ve monoaçilgliserollerin yolu ile serbest yağ asitlerine hidroliz ederler. Endüstriyel lipazlar; özellikle gıda endüstrisi olmak üzere süt endüstrisinde peynir olgunlaştırmada ve süt, yağ, peynir ve yoğurtlara ilave edilerek tat ve aroma artırımında, fırıncılık, tahıl ürünleri, şekerlik, et endüstrisinde ve balık endüstrisinde fazla yağların uzaklaştırılmasında yaygın kullanım alanlarına sahiptir. Bunların yanısıra deri endüstrisinde, ilaç endüstrisinde, deterjan endüstrisinde, diğer enzimlerle karıştırılmak suretiyle arıtım sistemlerinde kullanılmaktadır.

Üçüncü grup ester bağlarını ayıran fosfolipazları içine almaktadır. Fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin tipik kaynağı yılan zehiridir. Ancak *Leptospira pomona*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalarca da sentezlenmektedir. Fosfolipaz B<sub>1</sub> *E. coli*'den ve *Bacillus megaterium*'dan; fosforilaz C *Clostridium perfiringens*'den (ve 100 tür bakteriden daha) ve fosforilaz D *Corynebacterium pseudotuberculosis*'den sentezlenmektedir. Ancak bu lipazların endüstriyel üretimine ve uygulamalarına başlanmamıştır.

Dördüncü grup substrat olarak lipidler ile enzimleri içermektedir. Bunlar desaturazlar, hidrogenazlar, farklı oksidazlar ve peroksidazlardır.

Ayrıca lipazlar hidroliz reaksiyonundaki özgüllüklerine göre de 4 gruba ayrılmaktadır (Hou, 2002). Substrat özgül lipazlar trigliserol, digliserol, monogliserol ve fosfolipidler gibi belirli gliserol esterlerini hidroliz ederler. Bölge-selektif lipazlar TAG'deki iki dış ester pozisyon (primer ester bağları) ve bir iç pozisyon (ikincil ester bağı) arasında ayırım yapmaktadır. 1-3 bölge-selektif lipazlar tercihen *sn-1* ve *sn-3* pozisyonlarını hidroliz ederler. *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, ve *Mucor miehei* lipazları bunlardandır. *Sn-2* bölge-selektif lipazlara çok az rastlanır, örneğin bu grupta sadece *Candida antarctica* A lipazı yer almaktadır. Ancak birçok lipaz da TAG'de tüm ester bağlarını hidroliz ederler. Üçüncü grup lipazlar yağ-asidi-özgül lipazlardır. Bu tip lipazlar yağ asitlerinin uzunluğuna ve özgüllüğüne göre hidroliz ederler. Örneğin *Penicillium roquefortii* kısa zincir yağ asitlerini hidroliz ederken, *G. candidum* ise cis-9-doymamış yağ asitleri için özgüllük göstermektedir. Son grup lipazlar ise stereoselektif lipazlardır. Bunlar da TAG'deki *sn-1* ve *sn-3* pozisyonları arasında tercih yapmaktadırlar. *C. antarctica* B ve köpek gastrik lipazı *sn-3* pozisyonuna özgüllük gösterirken, *Humicola lanuginosa* ve *Pseudomonas fluorescens* lipazı *sn-1* özgüllüğü göstermektedir. Lipazlar ayrıca şiral (kiral) moleküllerin enantioizomerlerini de ayırt etmektedirler. Bu özellikleri de ilaç üretiminde büyük önem kazanmaktadır.

#### 2.4. Lipazların Enzimolojik Özellikleri

Hücre dışı lipazlar uygun koşullar altında birçok mikroorganizma tarafından üretilirler ve 4 ana sebepten çalışılmaktadırlar. İlk olarak, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Leptospira pomona* ve *Mycoplasma* spp. gibi patojen bakteri lipazları hastalıkların etiyolojisi ile ilişkilidir. İkinci olarak, bakteriyel lipazlar evsel lağımlardaki yağın veya nehir sedimentlerinin ekolojik görünümünün bozunması ile ilişkilidir. Üçüncü olarak yağ içeren süt ürünleri ve diğer gıdaların bozunmasıyla ilişkilidir ve bundan özellikle psikrofilik bakteriler sorumludur. Dördüncü olarak da başlıca fungal lipazlar olmak üzere farklı substrat özgüllüklerinden dolayı gıda ve diğer endüstrilerde birçok kullanım alanına sahiptirler (Stead, 1986).

Lipazlar serin hidrolazlardır ve katalitik kısımlarında G – X<sub>1</sub> – S – X<sub>2</sub> – G (G=glisin, S=serin, X<sub>1</sub>=histidin, X<sub>2</sub>=glutamik veya asparjik asit) sekansını içermektedirler (Aravindan, 2007). Maya lipazlarının çoğu hücre dışı, ~33 – 65 kD arasında

moleküler ağırlığa sahip monomerik glikoproteinlerdir. Bilinen lipaz üreten mayaların %50'den fazlası bunları farklı izoenzim formlarında üretmektedirler. Bu lipaz izoenzimleri sırasıyla farklı lipaz kodlayan genler tarafından üretilmektedir (Vakhlu ve Kour, 2006).

Lipaz üreten birçok maya içerisinde *Candida rugosa* ticari lipaz kaynaklarından en sıklıkla kullanılandır (Vakhlu ve Kour, 2006).

Lipazlar hidroliz, inter-esterifikasyon, alkoliz, asidoliz, esterifikasyon ve aminoliz gibi geniş ölçüde reaksiyonları katalizlemektedirler. Triaçilgliserol (TAG) içinde yağ asidi ester bağının hidrolizini katalizlerler ve serbest yağ asitleri (FFA) serbest kalır. Reaksiyon geri dönüşümlüdür ve reaksiyonun yönünü reaksiyondaki su miktarı belirlemektedir. Düşük su besiyerlerinde lipazlar esterifikasyon, transesterifikasyon ve interesterifikasyonu katalizlerler.

#### **2.4.1. Hücre dışı lipaz aktivitesi**

Lipaz üreten mayalar enzimi hücreye bağlı ve ortama salgılayarak üretirler. Çoğunlukla ekstraselüler lipaz aktivitesi besiyeri içinde substrat olarak trigliserollerini kullanan alkalın titrasyon metodu ile bulunmaktadır. Bunlar emulsiferler olarak arap sakızı, karboksimetil selüloz veya polivinil alkol ile emulsiyon içinde kullanılır. Lipazın enzim aktivitesi, yağ emulsiyonundan saniyede 1 mol yağ asitini serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır, (SI-unit).

$$1 \text{ Kat} = 1 \text{ mol FFA} \cdot \text{s}^{-1}$$

Geleneksel olarak lipaz aktivitesi :

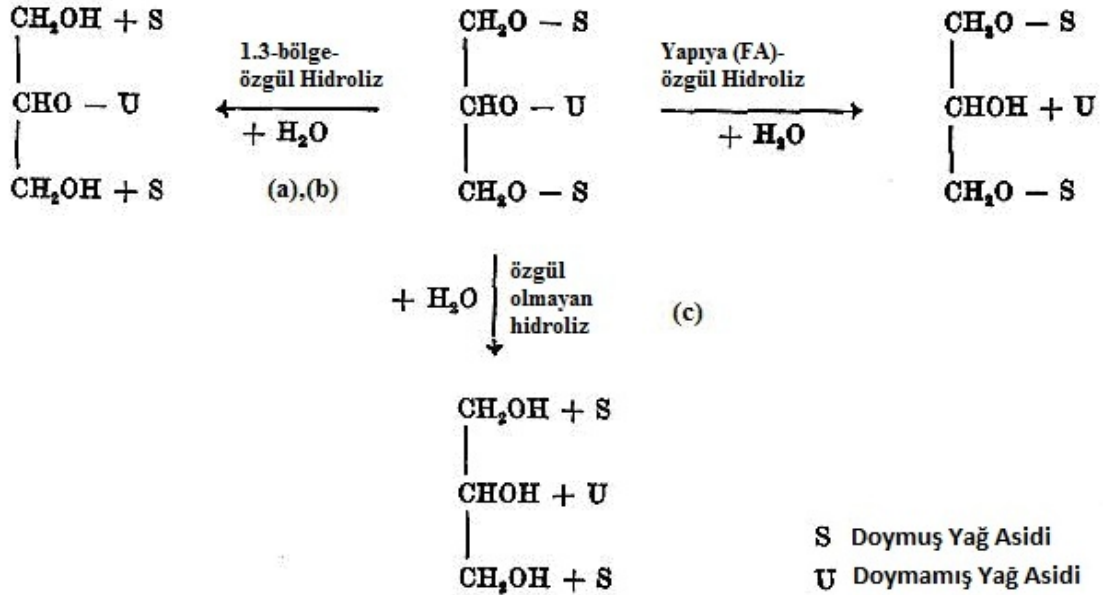
$1 \text{ LU} = 1 \text{ } \mu\text{mol FFA} \cdot \text{min}^{-1}$  , volume aktivite (LU/ml) şeklindedir (Hadeball, 1991).

#### **2.4.2. Substrat özgüllüğü**

Genellikle mikrobiyal lipazlar triaçilgliserollerini hidroliz eder. Şekil 2.1.'de lipazların pozisyon ve yapı özgüllüğü ile hidroliz arasındaki bağın farklı olasılıkları gösterilmektedir. Maya lipazları 3 tip lipazları da içermektedir. *Candida rugosa* (C.



*cylindracea*) lipazı özgül olmayan lipazdır ve bu triaçilgliserollerin 3 ester bağıını da hidroliz eder. *Candida lipolytica* (*Saccharomycopsis lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*) lipazı 1 ve 3 pozisyonundaki ester bağıının hidrolizini katalizlerken *Candida deformans* 1 veya 3 pozisyonunu katalizlemektedir.



Sekil 2.2. Lipazların yapı ve özgülüğü (Hadeball, 1991), (a) *Candida lipolytica* 1 ve 3. pozisyonundaki ester bağıının hidrolizini (b) *Candida deformans* 1 veya 3. pozisyonundaki ester bağıının hidrolizini (c) *Candida rugosa* ise özgül olmayan hidrolizi gerçekleştirir.

## 2.5. Mikrobiyal Lipazlar

Lipaz üreten mikroorganizmalar psikrotrofik bakteriler, küf mantarları ve mayalar olmak üzere üç grup altına alınabilir.

### 2.5.1. Psikrotrofik bakteriler

Bu tip bakteriler 7°C veya gelişimlerinin optimal sıcaklıklarının altında üreyebilen bakteriler olarak bilinirler. Günümüzde bu mikroorganizmalar süt endüstrisinde kullanılmalarına karşın esasen süt ürünlerinde bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar olarak bilinirler. Bu mikroorganizmaların oluşturdukları ısıya dirençli ekstraselüler lipazlar krema, tereyağı, peynir ve UHT (Ultra High Temperature) ürünlerindeki yağların bozunmasına bağlı olarak lezzet kusurları oluşumuna neden olurlar.



### 2.5.2. Küf mantarları

Lipaz üreten funguslar: *Mucor lipolyticum*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti*, *Humicola lanuginosa*, *Aspergillus niger* vs'dir.

### 2.5.3. Mayalar

Lipaz üreten mayalar: Fırıncı mayası (*Saccharomyces cerevisiae*), *Candida antarctica*, *C. auriculariae*, *C. curvata*, *C. cylindracea*, *C. deformans*, *C. foliorum*, *C. lipolytica*, *C. mogii*, *C. paralipolytica*, *C. quilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. tsukubaensis*, *C. utilis*, *Hansenula anomala*, *Mycotorula lipolytica*, *Pichia acaciae*, *Rhodotorula pilimonae*, *R. rubra*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *S. lipolytica*, *S. vinii*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Torulopsis apicola*, *T. candida*, *T. ernobii* ve *Yarrowia lipolytica* vs'dir.

Ancak adı geçen mikroorganizmalar lipaz üretiminin deneysel çalışmaları sonucunda bulunmuştur ve bunların sadece bir kısmı endüstriyel ölçekte lipaz üretiminde kullanılmaktadır.

## 2.6. Maya Türlerinin Özellikleri

### 2.6.1. *Yarrowia* cinsi ve *Yarrowia lipolytica* türünün genel özellikleri

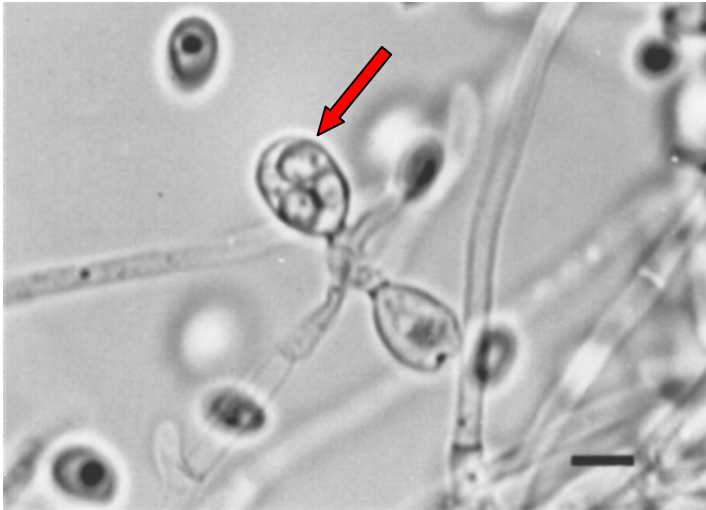
*Yarrowia* cinsinin tanımlanmasında bir takım özellikler önem kazanmaktadır. Aseksüel çoğalma dar bir kaide üzerinde çoklu-yan tomurcuklar tarafından gerçekleşir. Arada sırada artrokonidia da oluşabilmektedir. Tomurcuk hücreleri küremsi, elipsoidal ve sıklıkla çubuk şeklindedir. Gerçek hif ve yalancı hif oluşur, gerçek hif tek merkezi mikroforlu septa içerir. Aski aynı kökten türemez ve genellikle ikili hiften ortaya çıkmaktadır. Aski 1-4 askospor oluşturur ve bunlar küremsi, şapka şeklinde, yarıküremsi veya az çok köşeli olabilir. *Yarrowia* cinsi türleri şekerleri genellikle fermente edemez, nitrat asimilasyonu yapamaz. Lipaz, proteazlar ve üreaz üretirler. Koenzim Q-9 oluştururlar. Diazonyum mavi B reaksiyonu negatiftir (Kurtzman, 1999).

Anamorfu *Candida lipolytica* olan *Yarrowia lipolytica*'nın eş anlamlıları Çizelge 2.3.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. *Yarrowia lipolytica*'nin eşanlamlıları, (Kurtzman, 1999).

<b><i>Yarrowia lipolytica</i>'nin eşanlamlıları</b>	
<i>Endomycopsis lipolytica</i>	<i>Candida deformans</i>
<i>Mycotorula lipolytica</i>	<i>Candida lipolytica</i>
<i>Torula lipolytica</i>	<i>Candida paralipolytica</i>
<i>Azymoprocandida lipolytica</i>	<i>Candida petrophilum</i>
<i>Proteomyces cornealis</i>	<i>Candida pseudolipolytica</i>
<i>Pseudomonilia deformans</i>	<i>Candida oleophila</i> lizuka
<i>Monilia cornealis</i>	<i>Torulopsis petrophilum</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Saccharomycopsis pseudolipolytica</i>
<i>Candida olea</i>	

Üremeleri %5'lik malt ekstrakt agarda 25<sup>0</sup>C ve 3 günde gerçekleştirilen kültürlerde hücreler küremsi, elipsoid – çubuksu (3,0-5,0)x(3,3-15,0)µm boyutunda ve tek, ikili veya küçük kümeler halindedir. Asimilasyon besiyeri yüzeyinde ürediklerinde ince veya oldukça kalın zar tabakası oluştururlar. Dalmau plate kültüründe 25<sup>0</sup>C ve 7 günde yalancı hif ve gerçek hif gözlenmektedir. Gerçek hifin septasında tek merkezi por vardır. Aerobik üremelerinde beyaz veya kirli beyaz ve parlak-düzgün, mat-karışıktır. Koloni çevresi pürüzsüz veya lobludur. Askosporlar YM agarda 25<sup>0</sup>C'de 3-7 gün inkübasyondan sonra gözlenmektedir (Şekil 2.3). Şekil 2.4.'de *Yarrowia lipolytica*'nin birtakım asimilasyon özellikleri ve Şekil 2.5.'de filogenetik ağacındaki yeri gösterilmektedir (Kurtzman, 1999).



Şekil 2.3. YM agarda askospor görüntüsü, (25<sup>0</sup>C'de 1 hafta sonrasında).

## Asimilasyon:

Glukoz	+	N-Asetil-D-glukozamin	+
Galaktoz	v	Metanol	-
L-Sorboz	v	Etanol	+
Sukroz	-	Gliserol	+
Maltoz	-	Eritritol	+
Sellobioz	w/-	Ribitol	v
Trehaloz	-	Galaktitol	-
Laktoz	-	D-Mannitol	+
Melibioz	-	D-Glusitol	+
Raffinoz	-	$\alpha$ -Metil-D-glukozid	-
Melezitoz	-	Salisin	w/-
Inulin	-	D-Glukonat	v
Çözünür Nişasta	-	DL-Laktat	+
D-Ksiloz	-	Suksinat	+
L-Arabinoz	-	Sitrat	+
D-Arabinoz	-	Inositol	-
D-Riboz	v	Hekzadekan	+
L-Rhamnoz	-	Nitrat	-
D-Glukozamin	-	Vitamin-free	-

## İlave asimilasyon testleri ve diğer üreme özellikleri :

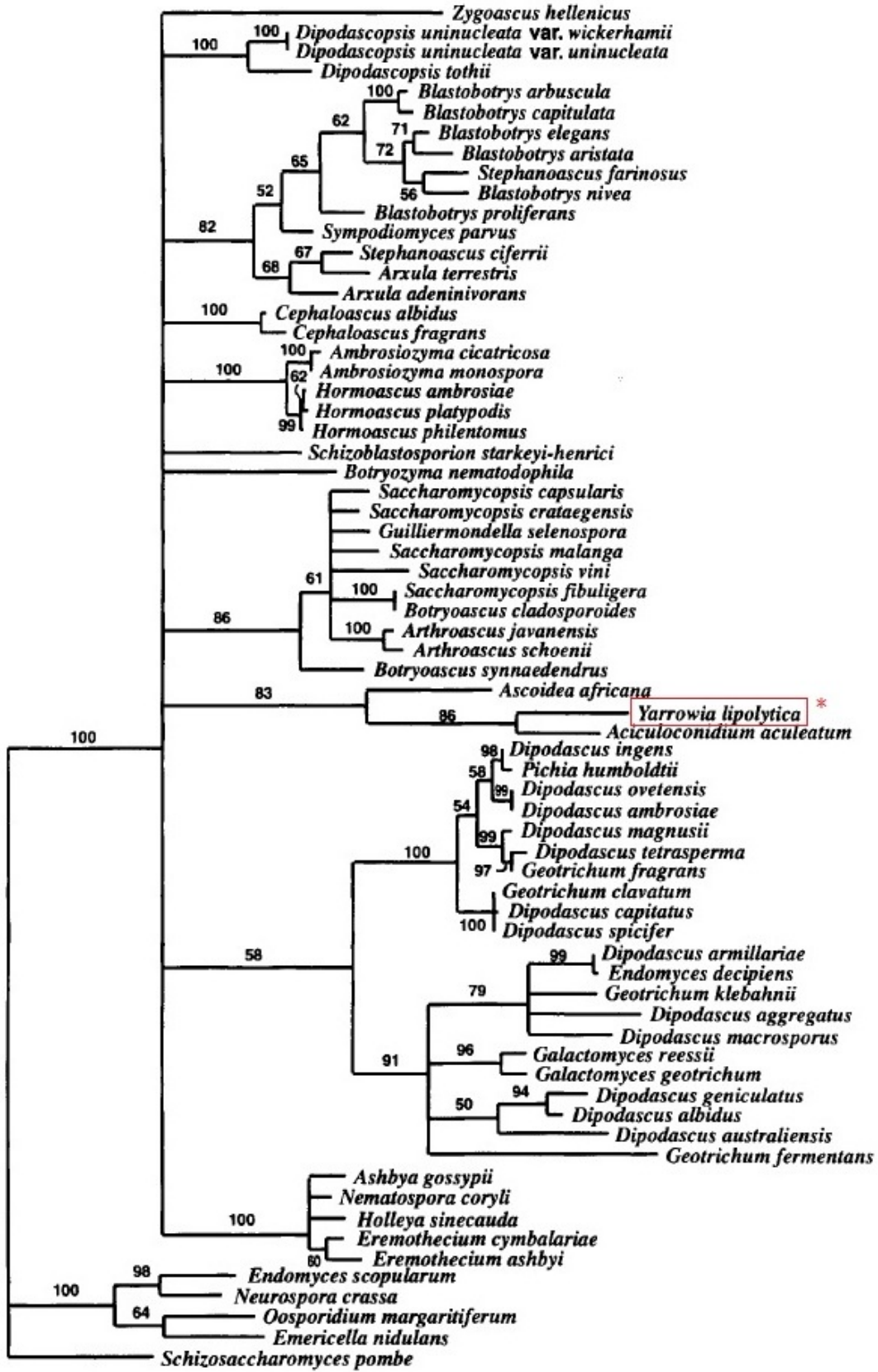
2-Keto-D-Glukonat	-	Nişasta formasyonu	-
5-Keto-D-Glukonat	-	Jelatin Sıvılaştırma	+
Sakkarat	-	37°C'de üreme	v
10% NaCl/5% glukoz			

**Co-Q:** 9 (Yamada and Kondo 1972b).

**Mol% G+C:** 49.6, CBS 599 ( $T_m$ : Stenderup and Bak 1968);  
50.2, CBS 6124 ( $T_m$ : Nakase and Komagata 1971f).

+ olumlu      v değişken  
- olumsuz    w zayıf

Şekil 2.4. *Yarrowia lipolytica*'nın özellikleri, (Kurtzman, 1999).



Şekil 2.5. *Yarrowia lipolytica*'nın filogenetik ağacındaki yeri. Filogram büyük rRNA altünitesi geninin (63-680 pozisyonları) 5' ucundaki nükleotid sapmalarından hazırlanmıştır (Kurtzman, 1999).

### 2.6.2. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 ve IFO 1195 suşunun özellikleri

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunun katalog bilgisine göre bu suşun eşanlamlıları *Candida lipolytica*, *Candida paralipolytica*, *Endomycopsis lipolytica*, *Pseudomonilia deformans*, *Saccharomycopsis lipolytica*'dir. Sitrik asit üretimi uygulamalarında kullanılan bir suştur ve diğer katalog numarası da IFO 1658'dir. Araştırmada kullanılan diğer bir suş olan *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunun da eşanlamlıları aynıdır, IFO 1195 kültür koleksiyonu numarasıyla da bilinmektedir. Bu suşun diğer katalog numaraları ise CBS599, IFO1152, NBRC1152, VKMY-47, BCRC20864 ve DBVPG6132'dir. İzolasyon orijini bozulmuş margarindir ve Hollanda'da izole edilmiştir. Rehidrasyon sıvısı her iki suş için de YM sıvı besiyeridir, katı besiyeri olarak da YM agar kullanılmaktadır (NITE, 2004).

*Yarrowia lipolytica* IFO 1195, LSU rDNA D1D2, --00119501, sekansı:

```
AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAA  
TTTCAAACCCTCGGGATTGTAATTTGAAGATTTGGCATTGGAGAAAGCTAACC  
CAAGTTGCTTGAATAGTACGTCATAGAGGGTGACAACCCCGTCTGGCTAAC  
CGTTCTCCATGTATTGCCTTATCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTC  
AAAGTGGGTGGTAAACTCCATCTAAAGCTAAATACTGGTGAGAGACCGATAG  
CGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGGTGAAAAGAAGTTTAAAAGAGAGTGAAA  
TAGTATGTGAAATTGTTGATAGGGAAGGAAATGAGTGGAGAGTGGCCGAGGT  
TTCAGCCGCCCTCGTGGGCGGTGTACTGCCGACGCCGAGTCATCGATAGC  
GAGACGAGGGTTACAAATGGGAGCGCCTTCGGGCGTTCTCCCCTAACCCCTC  
CACACTGCCACCGACGACATAATCCACCCATTTAC 'dir (NITE, 2005).
```

### 2.6.3. *Candida tropicalis* türünün genel özellikleri

*Candida tropicalis* belki de insanlardaki en önemli üçüncü patojen mayalardır. Bu tür normalde germ tübü veya klamidokonidia oluşturmaz ancak 37°C'de serumda üretildiklerinde bazı suşlarında genellikle uzunlamasına yalancı hifsel hücreler meydana getirebilirler (Kurtzman, 1999). *Candida tropicalis*, *C. albicans* gibi diploid askomiset tipi mayalardır ama genellikle konak-bağımsız ortamlardan izole edilmektedirler. *Yarrowia lipolytica* gibi *Candida tropicalis* de en iyi hidrokarbon kullanıcılarından. TTC (tetrazolium indikatör) besiyerinde üretildiklerinde tertazoliumun indirgenmesinden dolayı koyu kırmızı – bordo renginde koloniler oluştururlar. Glukoz-maya özütü-pepton besiyerinde 25°C'de 3 gün üretildiklerinde



küre şeklini andıran, tek veya ikili, (3,5-7,0)x(5,5-10,0)µm boyutunda hücreler oluştururlar. Mısır unu agar üzerinde Dalmau plate kültüründe 25<sup>0</sup>C'de 7 gün üretildiklerinde dallanmış zincirler şeklinde yalancı hif, tek veya halkalar içinde blastokonidia, septalı hif genellikle gözlenmektedir. Aerobik üremelerinde beyaz, düzgün, tereyağimsı ve yumuşak saçaklı kenarlı koloniler oluşturmaktadırlar. *Candida tropicalis* türünün özellikleri Şekil 2.6.'da özetlenmiştir (Kurtzman, 1999).

<b>Fermentasyon:</b>				(+) pozitif (-) negatif (v) değişken (w) zayıf (l) ? (s) ? (n) veri yok
Glukoz	+	Laktöz	-	
Galaktöz	+	Raffinöz	-	
Sukroz	v	Trehalöz	+/s	
Maltoz	+			
<b>Asimilasyon:</b>				
Glukoz	+	<i>N</i> -Acetyl-D-glukozamin	+	
Galaktöz	+	Methanol	-	
L-Sorboz	v	Ethanol	+	
Sukroz	v	Gliserol	v	
Maltoz	+	Erythritol	-	
Cellobioz	+/l	Ribitol	+/l	
Trehalöz	+	Galaktitol	-	
Laktöz	-	D-Mannitol	+	
Melibioz	-	D-Glukitol	+	
Raffinöz	-	$\alpha$ -Methyl-D-glukosit	v	
Melezitöz	v	Salisin	v	
Inulin	-	D-Glukonat	v	
Çözünür Nişasta	+	DL-Laktat	v	
D-Ksiloz	+	Suksinat	+	
L-Arabinöz	-	Sitrat	+/l	
D-Arabinöz	-	Inositol	-	
D-Riboz	-/l	Heksadekan	+	
L-Rhamnoz	-	Nitrat	-	
D-Glukozamin	v	Vitam in-free	v	
<b>İlave Asimilasyon Testleri ve Diğer Üreme Özellikleri:</b>				
2-Keto-D-glukonat	+	L-Lysin	+	
5-Keto-D-glukonat	+	Etilamin	+	
Sakkarat	n	D-Glukozamin (N)*	-	
D-Glukuronat	-	%50 Glukoz	+/l	
Ksilitol	+	%10 NaCl / %5 glukoz	l	
L-Arabinitol	+	Nişasta formasyonu	-	
Arbutin	+	Üreaz	-	
Propan 1,2 diol	-/l	Biotin-free	v	
Butan 2,3 diol	-	Piridoksin-free	+	
Nitrit	-	%0,1 Sikloheksimid	+	
Kadaverin	+	37 C'de üreme	+	
Kreatinin	-	40 C'de üreme	+	

\* Nitrojen kaynağı olarak D-Glukozaminin kullanımı

**Co-Q:** 9 (Yamada ve Kondo 1972a).

**Mol% G+C:** 34,9 bir suş (*Tm*: Stenderup ve Bak 1968); 34,9 , UCD-FST 60-31 (*Tm*: Meyer ve Phaff 1969); 35,0 , bir suş (*Tm*: Nakase ve Komagata 1968a); 34,4-35,4 , 3 suş (*Tm*: Nakase ve Komagata 1971f) 36,1 , CBS 94; 35,1 , CBS 6320; 35,9 , CBS 5701 (*Tm*: Meyer ve ark., 1975); 34,1 , IFO 0006; 34,4 , ATCC 750 (*Tm*: Kaneko ve ark., 1977); 33,2 , GSU 59; 34,6 , GSU 372 ve 446 (*Tm*: Ahearn ve ark., 1977); 35,6 2 suş (*Tm*: Su ve Meyer 1991).

Şekil 2.6. *Candida tropicalis*'in özellikleri, (Kurtzman, 1999).



## 2.7. Lipaz Aktivite Tayin Yöntemleri

Lipaz analizi için tek bir evrensel metod yoktur. Bir lipaz pozitif mikroorganizmanın tespit edilebilmesi için 3 faktörün birlikte çalışması gerekmektedir. Birincisi organizma üremek zorundadır, ikincisi uygun üretim koşullarında organizma lipaz üretebilmeli ve salgılayabilmelidir. Üçüncü olarak da enzimin tespit metodu yeterli duyarlılıkta olmalıdır (Hasan ve ark., 2009).

Ham ve saf lipaz örneklerinde lipaz aktivitesinin tespiti için birkaç metod geliştirilmiştir. Lipaz reaksiyonunun oranı; (a) substratın, trigliseridin kaybolma oranına, (b) serbest yağ asitlerinin üretim oranına veya (c) emülsiyonun berraklaşma oranına göre tespit edilmektedir (Hasan ve ark., 2009).

Tributirin ve triolein gibi, ki bunlar besiyeri ortamını bulanıklaştırırlar, substratlar içeren petri kaplarında kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zon lipaz varlığını katı besiyerlerinde göstermektedir. Lipolitik aktivitenin katı besiyerlerinde gösterilmesinde ayrıca Victoria Blue B, Spirit Blue, Nile Blue Sulphate ve Night Blue gibi boyalar da kullanılmaktadır. Açığa çıkan yağ asitlerinin pH'ı düşürmesine göre renk indikatörlerindeki değişim sonucu belirlemektedir. Titrasyon metodunda ise ortamda açığa çıkan serbest yağ asitleri NaOH veya KOH ile titre edilerek hesaplanmaktadır. Bu metotda genellikle zeytin yağı substrat olarak kullanılmaktadır. Nefelometri metodunda uzun zincir yağ asidi olan triolein digliseritlere yıkılmaktadır, trioleinin yıkımı bulanıklıktaki azalmayla sonuçlanmaktadır. Diğer lipaz aktivite tanı metodları da çizelge 2.4.'de özetlenmiştir (Hasan ve ark., 2009).

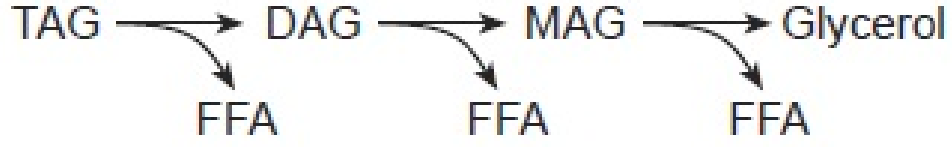
Çizelge 2.4. Lipaz tayin metotları, (Hasan ve ark., 2009).

METOTLAR*		METOTLAR*	
1.	Katı Besiyerinde Tarama Metotları	14.	Test kiti
2.	Substrat olarak yumurta sarısı kullanımı	15.	Lipoprotein Lipaz ELIZA kiti
3.	Titrimetrik Metotlar	16.	EnzChek Lipaz Substratı
4.	Nefelometri ve Türbidimetri (Bulanıklık ölçümü)	17.	Koumarin-bazlı lipaz substratları
5.	Triaçilgliserolden serbest bırakılmış gliserol	18.	MarkerGene™ floresan lipaz tayin kiti
6.	Elektrik iletkenliği	19.	QuantiChrom™ lipaz tayin kiti (DLPS-100)
7.	Wilhelmy Plaka Metodu	20.	İmmünolojik metotlar
8.	Akustik dalga iletkenliği	21.	NMR metodu
9.	Kolorimetrik metotlar	22.	Atomik Güç Mikroskopi
10.	Flurometrik metotlar	23.	Kızılötesi spektroskopi
11.	Kütle spektrometrisi	24.	Elektron mikroskopi ile tespit
12.	Kromatografik Metotlar, (HPLC ve Gaz Kromatografisi)	25.	Radyoaktif Yöntemler
13.	Yüzeyler-arası Gerilim İzleme (Interfacial tension monitoring)	26.	Yağ damlası metodu
*Hasan, 2009, 'dan özetlenmiştir.			

Thomson ve ark., 1999 ve Beisson ve ark., 2000 'de benzer biçimde lipaz tayin yöntemlerini sınıflandırmışlardır. Thomson ve ark., bunu lipolitik mikroorganizmaların tespiti ve ham-saflaştırılmış lipaz örneklerinden aktivite tayini olarak iki ana grupta toplamışlardır. Beisson ve ark., ise aynı gruplandırmayı fiziko-kimyasal metodlar ve immünolojik metodlar olarak 2 ana kısma ayırmışlardır. Elde ettikleri literature göre hidrolitik aktivitenin hesaplanması ve lipaz tespiti için 9 metot belirlemişlerdir. Bunlar:

1. Titrimetri, 2. Spektroskopi (Fotometri, Fluorimetri, Kızıl ötesi),
3. Kromatografi, 4. Radyoaktivite, 5. Yüzeyler-arası tensiometri (gerilim ölçme),
6. Turbidimetri, 7. Konduktimetri (Conductimetry=iletkenlik ölçme),
8. İmmünokimya, 9. Mikroskopi'dir.

Gruplandırma her nasıl olursa olsun lipazlar tarafından triaçilgliserollerin genel hidrolizi aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir (Şekil 2.7.).



*TAG* = *triacylglycerols*, (triaçilgliseroller)

*DAG* = *diacylglycerols*, (diaçilgliseroller)

*MAG* = *monoacylglycerols*, (monoaçilgliseroller)

*FFA* = *free fatty acids*. (Serbest Yağ Asitleri)

Şekil 2.7. Lipazların triaçilgliserolleri hidrolizi (Beisson ve ark., 2000).

## 2.8. Lipaz Üretimini Etkileyen Faktörler

Lipaz üretimini etkileyen faktörler genellikle besiyeri ortamında mikroorganizmanın gelişimine etki eden faktörlerdir (Hadeball, 1991). Bunlardan en önemlileri:

- Karbon kaynağı,
- Azot kaynağı,
- Aktivatörler, stimulatörler ve inhibitörler,
- Yüzey-etki ajanları,
- Sıcaklık, pH ve aşılama.

### 2.8.1. Karbon kaynağı

Esasen lipaz üretimi kültür ortamındaki karbon kaynağı tarafından etkilenmektedir. Lipaz üretiminde karbon substratı olarak mikrobiyal gelişme için karbohidratlar, hidrokarbonlar, gliseroller, alkoller ve yağ asitleri gibi olağan karbon kaynakları kullanılmaktadır.

Glukoz içeren besiyerinde üreyen *Candida curvata* ve *C. deformans* düşük lipaz aktivitesi gösterirken diğer taraftan glukoz *Hansenula anomala*'nın lipaz aktivitesine pozitif etki yapmaktadır. Substrat olarak kolza tohumu yağı kullanılarak

*Rhodotorula pilimanae*'den lipaz üretimi glukoz tarafından inhibe edilmektedir. Karbohidratlar ilave edilmiş besiyerinde iyi üreme gözlenir ama zayıf enzim üretimi vardır. Tetradeçane üzerinde üreyen *Torulopsis apicola* glukoz üzerinde üretilenden 3 kat daha fazla ekstraselüler lipaz üretmektedir. Lipazların biosentezinde çoğunlukla trigliseroller, çoğu durumda zeytin yağı, bazen de kolza tohumu yağı veya hurma yağı kullanılmaktadır. Kerosene (kerosin veya parafin olarak da bilinmektedir) ve zeytin yağı karışımı lipaz üretiminde en iyi sonuçları veren karbon kaynağıdır. Ancak zeytin yağının üretime negatif etkisi de bildirilmiştir (Hadeball, 1991).

### **2.8.2. Azot kaynağı**

Lipaz üretiminde kullanılan azot kaynakları mikrobiyal üreme için kullanılan azot kaynaklarıdır ve protein hidrolizat, mısır mazerasyon sıvısı, soya unu, pepton, aminoasitler, üre, nitrat ve amonyak tuzları bunlardan birkaçıdır. Organik azot kaynaklarının *Hansenula anomala* tarafından sentezlenen lipaz miktarını artırdığı bulunmuştur. *Yarrowia lipolytica* pepton, üre ve soya unu gibi azot kaynakları kullanıldığında amonyumun kullanılmasına göre genellikle daha fazla lipaz aktivitesi gösterirler. Ekstraselüler enzim sadece organik azot kaynaklarının varlığında ortaya çıkabilmektedir (Hadeball, 1991).

### **2.8.3. Aktivatörler, stimulatörler ve inhibitörler**

Karbon kaynağı lipaz sentezini stimule veya inhibe edebilir. Oleik asit, linoleik asit, elaidik asit gibi doymamış yağ asitleri *Candida lipolytica*'nın lipaz sentezinde pozitif etki yaparlar. Ancak doymuş yağ asitleri etki göstermez. Uzun zincir yağ asitleri içeren besiyerinde üretilen *Saccharomycopsis lipolytica* çok miktarda lipaz üretir. *Candida lipolytica*'nın lipaz aktivitesi B<sub>1</sub> vitamini ile stimule edilmektedir ancak biotin ve pantotenik asit tarafından inhibe edilir. Safra tuzları düşük konsantrasyonlarda aktive edici etki gösterirken, yüksek konsantrasyonlarda lipaz aktivitesini kuvvetlice inhibe etmektedir. Kolesterol *Candida rugosa* ve *C. lipolytica*'dan sentezlenen lipazın indüktörüdür. Etanol de *C. deformans* lipazını inhibe etmektedir (Hadeball, 1991).

#### 2.8.4. Yüzey-etki ajanları

Lipaz sadece yağ su yüzeyinde etkilidir ve reaksiyon hızı sıvı fazda emulsifiye lipid ve trigliserolün konsantrasyonu tarafından tespit edilemez ama her volum unit başına emulsifiye taneciklerin yüzey alanı tarafından tespit edilir. Sonuç olarak emulsiyonun tane boyutu ve stabilitesi enzimin üretimi ve aktivitesini etkilediği kadar mikroorganizmanın gelişim oranını da kuvvetlice etkilemektedir (Hadeball, 1991).

#### 2.8.5. Sıcaklık, pH ve aşılama

Lipaz üretimi için uygulanan optimum sıcaklık ve pH koşulları, genellikle üreme için uygulanan koşullarla aynıdır. *Pseudomonas fluorescens*'den lipaz üretimi sıvı kültürlerde 4-30°C arasında, en fazla 8°C'de, meydana gelir. Optimal üreme sıcaklığı 20°C'dir.

Üreme ortamının başlangıç pH'sı lipaz üretiminde etkilidir. *P. aeruginosa* için maksimum aktivite pH 7.0'de ve *P. fragi* için pH>7.0'de gerçekleşmektedir. *Pseudomonas* türlerinden lipaz üretiminde havalandırma farklı etkilere sahiptir. İlimli havalandırma yapılan sığ tabaka kültürlerinde fazla havalandırma yapılan çalkalamalı kültürlerden daha çok lipaz üretimi yapılmaktadır (Hadeball, 1991).

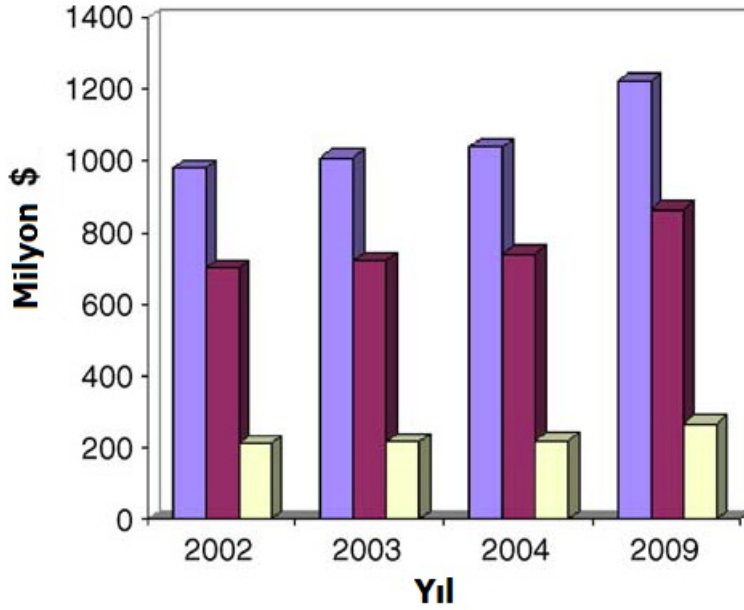
Çizelge 2.5. Lipaz üretimini etkileyen faktörler.\*

Faktörler	
C Kaynakları	Karbonhidratlar Hidrokarbonlar Gliseroller Alkoller Yağ Asitleri
N Kaynakları	Protein Hidrolizat Mısır Mazerasyon Sıvısı Soya Unu Pepton Aminoasitler Nitrat Amonyak Tuzları
Aktivatörler Stimülatörler İnhibitörler	Glukoz (Stimülatör veya İnhibitör) Doymamış Yağ Asitleri Uzun Yağ Asit Zincirleri B <sub>1</sub> Vitamini Biotin, Pantotenik Asit Safra Tuzları Kolesterol Etanol
Yüzey-etki Ajanları	
Sıcaklık ve pH Aşılama Aerasyon	

\*Hadeball, 1991'den alınmıştır.

## 2.9. Lipazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'inin karbohidrazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır ve bunların içinde lipazlar %3'lük oranda önemli bir yere sahiptir (Uhlig, 1998). Güncel bir diğer kaynağa göre lipazlar dünya enzim pazarında proteazlar ve karbohidrazlardan sonra yer almaktadır ve %5'lik enzim pazarına sahiptir (Vakhlu ve Kour, 2006). Business Communications Company Inc.'in bir raporuna göre 2004 yılında endüstriyel enzimlerin küresel pazarı 2 milyar \$ olarak hesaplanmıştır. Endüstriyel enzimlerin pazardaki büyüme miktarı (AAGR) %4 ile %5 arasındadır. 2009 yılında toplam endüstriyel enzim pazarının 2,4 milyar \$ olması beklenmektedir (Şekil 2.8.). Endüstriyel enzim pazarı teknik 'bilimsel' enzimler, gıda enzimleri ve hayvan yemi enzimleri olarak üçe ayrılmaktadır. Deterjan ve kağıt hamuru ve kağıt imalathanesi için teknik enzimler diğerlerine göre %52'lik oranla en büyük kısmı ihtiva etmektedir. Gıda sektöründe ise en büyük kısım şekerleme ve tatlandırıcı sektörleridir (Hasan ve ark., 2006).



Kaynak: Business Communications Company, Inc



Şekil 2.8. 2009 Yılına kadar uygulama alanları ile birlikte küresel enzim marketleri (milyon \$), (Hasan ve ark., 2006).

İkinci grup lipazlar içinde yer alan endüstriyel lipazlar (EC 3.1.1.3) triaçilgliserollerini di- ve monoaçilgliserollerin yolu ile serbest yağ asitlerine hidroliz ederler. Bunlar gıda endüstrisinde, peynir olgunlaştırmada, fırıncılık ürünleri tahıl ürünleri şekercilik ve yapay süt ürünleri içine katılan peynirli ve yağlı lezzetleri üretmede, et endüstrisinde, deri endüstrisinde, ilaç endüstrisinde, deterjan endüstrisinde, diğer enzimlerle karıştırılmak suretiyle arıtım sistemlerinde yaygın kullanım alanlarına sahiptir (Rezanka, 1991).

Birçok lipaz üreten mayalar içerisinde, *Candida rugosa*'dan ticari olarak üretilen lipaz en fazla sıklıkla kullanılandır (Vakhlı ve Kour, 2006).

### 2.9.1. Deterjanlar

Deterjan sanayiinde lipazlar büyük önem taşımaktadır. Özellikle uzaklaştırılması oldukça zor olan lekelerin gideriminde kullanılmaktadır. Lipitlerin ve sıvı yağların serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizinde 250<sup>0</sup>C'lik sıcaklık ve 60 barlık bir basınç uygulanmakta ve bu işlem de maliyeti artırmaktadır. Bunun yerine maliyeti düşük olduğu için mikrobiyal lipazlar kullanılmaktadır (Svendsen, 2000). *Candida lipolytica*, *C. cylindracea* ve *Pseudomonas stutzeri* lipazları deterjanlar ve yıkama-temizleme preparasyonlarının komponentleri olarak kullanılmaktadırlar.

Bir alman patentinde 70-100<sup>0</sup>C'de proteinlerin uzaklaştırılması için Henkel ve Cie, G.m.b.H. tarafından bir deterjan bileşimi yayınlanmıştır. Bileşim farklı kombinasyonlarda alkalaz (Novo Enzyme Corp.), proteaz (%0-0,1), *Candida cylindracea* (Lipase-My-Meito Sangyo Co.) (%0,05), Termozym (Novo Enzyme Corp.), α-bakteriyelamilaz (%0,1-1,0), ve yüksek sıcaklığa dayanıklı proteaz, termolizin (%0-1,0) içermektedir. Unilever Co. Tarafından yayınlanan patenti alınan bir diğer bileşimde ise *Candida cylindracea* (ağırlıkça %0,5-5) lipazı içermektedir. *Candida lipolytica* (günümüzde *Yarrowia lipolytica*), *Candida cylindracea* ve *Pseudomonas stutzeri* ATCC 19154 gibi mikrobiyal kaynaklı enzimler bitki ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha fazla tercih edilmektedir çünkü bunlar deterjan sistemlerinde daha kararlıdırlar (Seitz, 1974).

### 2.9.2. Gıda ve beslenme

Mikrobiyal lipazların hidrolitik özelliklerinden gıda endüstrisinde de yararlanılmaktadır (Rezanka, 1991). Fırıncılık ürünleri, tahıl ürünleri, şekerlik ve yapay süt ürünleri içine katılan peynirli ve yağlı lezzetleri üretmede lipazlar kullanılmaktadır. *Candida lipolytica* lipazı ve iki laktik asit üreten bakteri suşunun fermantasyonu ile elde edilen ürün kurutulur ve konsantre edilir, bu ürün peynir katkısı olarak kullanılır. *Rhizopus delemar* lipazı taze süt veya krema ile Japon yoğurdu üretiminde kullanılmaktadır. *Aspergillus* sp. lipazı pirinç lezzetini iyileştirmede ve soya fasulyesi sütünün modifikasyonunda kullanılır. *Candida* sp. veya *Rhizopus delemar* lipazı aroma yapımında, elma şarabının fermantasyonunun hızlandırılmasında, yumurta sarısı kalıntılarını beyazından uzaklaştırmada kullanılmaktadır.

Mikroorganizmal lipazların tabii formasyonu özellikle süt endüstrisi için önemlidir. Özellikle peynirlerin olgunlaştırılmasında ve lezzet ilavesinde lipazlar sıklıkla uygulanmaktadır. Peynirin lezzeti, peynirin tipine göre kompozisyonu farklılaşan sekonder mikroflora ve ağır ağır ilave edilen starter bakteri etkisinin sonucuna göre oluşmaktadır. Lezzet üretimine yol açan reaksiyonların çoğu özellikle lipaz ve proteazların ilavesiyle enzimatik olarak katalizlenir ve bu enzimler olgunlaştırmayı hızlandırmaktadır. Ancak aşırı lipoliz tat defektlerine yol açabilmektedir, buna karşın lipolizin hissedilir derecesi 'Blue-vein' peyniri veya İtalyan peyniri gibi kuvvetlice lezzetlendirilmiş peynirlerde arzu edilen seviyededir. Örneğin Pravalone ve Romano peynirinin lezzet gelişimi peynir mayası 'rennet' veya pregastrik esterazın işlevi tarafından kısa-zincir yağ asitlerinin oluşmasına dayanmaktadır. *Mucor miehei* esterazı İtalyan peynirine yeterli kalite vermede kullanılır (Stead, 1986). Blue vein peyniri imalatı süt veya lora mavi-yeşil *Penicillium roqueforti*, ve *P. glaucum* sporları ile inokule edilerek yapılır. Küfün lipolitik miçelyumu tarafından süt yağından oluşan serbest yağ asitleri önemli tat bileşikleridir. Laktonlar da 'Blue' peynirde önemli tat komponentleridir. *P. roqueforti*'den iki tip lipaz salgılanır ama sadece asit enzim peynir olgunlaştırılmasında önem taşımaktadır. Lipoliz, peynir yüzeyinde bulunabilen yüksek NaCl konsantrasyonunda inhibe olur, oysa miçelyal gelişim düşük veya yüksek NaCl konsantrasyonlarında inhibe edilebilir. *Aspergillus* sp.'den elde edilen ticari enzim preparasyonu gelişim oranını ve 'Blue' peynirin lezzet kalitesini artırmaktadır. Brie ve Camembert peynirinin beyaz küfü de (*P.*



*camemberti*) lipolitiktir ve serbest bırakılmış yağ asitlerinin oksidasyonu ile metil ketonları (karakteristik sert lezzeti oluştururlar) üretirler. Limbur ve Romadur gibi yüzeyi lekeli peynirlerde *Brevibacterium linens*'in karakteristik kırmızı-kahverengi gelişimi görülmektedir. *Candida mycoderma* lipazı ve *Debaromyces kloeckeri* lipazı Limburg peyniri olgunlaştırılmasında kullanılır. Süt florasındaki esteraz ve lipaz aktiviteleri ve starter *Streptococci* sayesinde oluşan uçucu yağ asitleri sert ve yarı sert peynirlerin lezzetinin bir kısmından, (örneğin Cheddar peyniri olgunlaştırılmasında) sorumludur.

Zayıf lipolitik aktiviteye sahip mikroorganizmalar; *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsleridir. *Propionibacterium shermani* İsviçre peyniri imalatında, *Streptococcus cremoris*, *S. lactis*, *Lactobacillus plantarum* ve *L. casei* 'Cheddar' peyniri imalatında kullanılmaktadır. *Candida cylindracea* lipazı Amerikan Cheddar peyniri, *Mucor* sp. lipazı İngiliz Cheddar peyniri imalatında uygulanmaktadır (Stead, 1986).

Lipazların doğal etkisi ayrıca et endüstrisinde de uygulanmaktadır. *Micrococcus* ve *Lactobacillus* cinsleri tütsülenmiş etin karakteristik lezzet özelliğinin kazandırılması için kullanılır. *Candida lipolytica* ve *Geotrichum candidum* gibi lipaz üreten mikroorganizmalar balık işlenmesinde fazla yağın uzaklaştırılmasında kullanılır (Rezanka, 1991).

*Candida rugosa* (veya *C. cylindracea*) lipazı serbest durumda mum yağı, hindistan cevizi yağı ve zeytin yağı hidrolizinde kullanılır. İmmobilize *Rhizopus arrhizus* lipazı ve miçel karışımı zeytin yağı hidrolizinde uygulanır.

### **2.9.3. Tekstil**

Yağların enzimatik hidrolizi ayrıca diğer endüstri dallarında da uygulanmaktadır. Lipazlar, kürklerden yağ kalıntılarının uzaklaştırılması için postun işlenmesinde kullanılır.

Bir Macar Teljes patentinde açıklandığı gibi lipazlar deri işlemede oldukça kullanışlıdır. Koyun, kuzu, ve vahşi hayvan derilerinin deoksiklorik asit varlığında

lipaz ve amilaz ile muamelesi sonucunda yağlar ve kollajen-olmayan proteinler deriye zarar vermeden uzaklaştırılabilmektedir (Seitz, 1974).

#### **2.9.4. Tıp ve farmasötik**

Lipazlar ilaç endüstrisinde de kullanım alanlarına sahiptir. Lipazların peptidlerin sentezine olan ilgisi nadir aminoasitleri içeren peptidlerin preparasyonu için de kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Lipazlar substrat olarak D-aminoasitlere etki etmektedir, bu D-aminoasitler bazı antibiyotik ve nöroaktif peptid moleküllerinin tamamlayıcıları olabilmektedir. Örneğin Penisilin G'nin öncülü olan N-fenilasetil-L-sisteril-D-valin'in formasyonu lipaz tarafından katalizlenmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın stereospesifik lipoprotein lipazı ile (R-S)-2-oxazolidinone esterlerinin rasemik karışımında R-esteri hidroliz edilir ve S-ester ayrılarak S-alkol üretilir, bu da  $\beta$ -adrenerjik blok ajanının S-izomeri için uygun ara maddedir. Elde edilen  $\beta$ -adrenerjik blok ajanı hipertansiyon ve anjina pectoris tedavisinde kullanılır. *Aspergillus niger* lipazı ile, terpen alkoller ve düz-dallı kısa zincir yağ asitlerinden terpen alkol esterleri parfüm bileşenleri sentezlenir. Ayrıca pankreoflat gibi hazmı kolaylaştırıcı ilaçların bileşiminde lipazlar vardır.

Bir Alman patentinde lokal deri inflamasyonu ile mücadele için ağırlıkça %1-5 lipaz, hyaluronidaz ve thiomukaz (thiomucase) içeren farmasötik bileşimler hazırlanmıştır ve kullanılmaktadır. Bir diğer Alman patentinde ise lipaz kalıcı saç kabartma alaşımına ilave edilmekte ve bileşimin saça penetrasyonunu kolaylaştırmaktadır (Seitz, 1974).

#### **2.9.5. Diğer**

Diğer enzimler ile karışımı yapılan lipazlar atık su arıtımında da kullanılabilir. Pozisyon özgüllüğü olan mikrobiyal lipazların kullanımı ile uygun trigliserit karışımları üretilmektedir. Kısa zincir yağ asitlerinin interesterifikasyonu ile hurma yağı sıvı yağa dönüştürülmektedir. *Candida deformans*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus niveus*, *Aspergillus niger* lipazları yağların interesterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmaktadır.

Lipazların uygulama alanlarında özellikle günümüzde tek hücre yakıtı (SCO) dikkati çekmektedir.

Çizelge 2.6. Endüstriyel lipazların uygulama alanları.\*

Uygulama Alanları	Endüstri	Mikroorganizmalar
Peynir katkısı Peynir olgunlaştırılmasında	Süt İtalyan peyniri Blue-vein peyniri Blue peyniri Camembert ve Brie peynirleri Amerikan Cheddar peyniri İngiliz Cheddar peyniri Cheddar peyniri Limburger ve Romadur peynirleri Limburger peyniri İsviçre peyniri	<i>Candida lipolytica</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>P. glaucum</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>P. camemberti</i> <i>C. cylindracea</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. casei</i> <i>Brevibacterium linens</i> <i>C. mycoderma</i> <i>Debaromyces kloeckeri</i> <i>Propionibacterium shermani</i>
Süt, krema ve Japon yoğurdu üretiminde	Süt	<i>Rhizopus delemar</i>
Tütsülenmiş etin karakteristik lezzetinin kazandırılmasında	Et	<i>Lactobacillus sp.</i>
Balıkların fazla yağlarının uzaklaştırılmasında	Et	<i>C. lipolytica</i> <i>Geotrichum candidum</i>
Aroma yapımında, Elma şarabı fermentasyonunun hızlandırılmasında, Yumurta sarısı kalıntılarının beyazından uzaklaştırılmasında	Gıda Fermen. Tek. Gıda	<i>Candida sp.</i> <i>R. delemar</i>
Mum yağı, hindistan cevizi yağı ve zeytin yağının hidrolizinde, Zeytin yağı hidrolizinde	Gıda	<i>C. cylindracea</i> <i>R. arrhizus</i>
Pirinç lezzetinin iyileştirilmesi, Soya fasulyesi sütünün modifikasyonunda	Tarım	<i>Aspergillus sp.</i>
Yıkama ve temizleme işleminde	Deterjan	<i>C. lipolytica</i> <i>C. cylindracea</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>
Penisilin G'nin öncülü olan N-fenilasetil-L-sisteril-D-valin'in formasyonunda, (R-S)-2-oxazolidinone'dan R-esterinin hidrolizi sonucunda S-esterinin ayrılmasında	İlaç	<i>P. aeruginosa</i>
Kürklerde yağ kalıntılarının uzaklaştırılması için post işlenmesinde	Tekstil	
Enzim preparasyonları içinde atık su arıtımında	Arıtım Tek.	
Terpen alkoller ve yağ asitlerinden terpen alkol esterleri sentezinde	Parfüm	<i>A. niger</i>
Yağların interesterifikasyon reaksiyonlarında		<i>C. deformans</i> <i>G. candidum</i> <i>R. neveux</i> <i>A. niger</i>

\* Farklı kaynaklardan özetlenmiştir.

## **2.10. Lipazların Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu**

### **2.10.1. Saflaştırma**

Diğer tüm enzimlerde olduğu gibi lipazlar da saflaştırılarak ve sonrasında immobilize edilerek endüstriyel ölçekte kullanılmaktadırlar. Enzim saflaştırma metodları diğer tüm enzimler gibi lipazlar için de geçerlidir. Çöktürme teknikleri (tuzlar ve alkoller ile) ve kromatografik teknikler (iyonik, hidrofobik etkileşim afinite ve moleküler eleme) iki ana saflaştırma teknikleridir (Vakhlu ve Kour, 2006).

Mikrobiyal lipazların çoğunluğu hücre dışıdır ve kültür ortamından santrifügasyon veya filtrasyon ile hücrelerin uzaklaştırılması sonucunda elde edilirler. Ön-saflaştırma aşamaları amonyum-sülfat çöktürme, ultrafiltrasyon veya organik çözücüler ile ekstraksiyon yöntemlerini içermektedir. Saflaştırma planlamalarının %80'ini öncelikle çöktürme işlemleri oluşturmaktadır ve bunların %60'ı amonyum sülfat çöktürme ve % 35'i de etanol, aseton veya genellikle hidroklorik asit kullanılarak yapılan işlemlerdir (Saxena ve ark., 2003). Ön-saflaştırma tekniklerini takiben genellikle kromatografik teknikler uygulanır. İstenilen saflığı sağlamak için bazen tek bir kromatografik yöntem yeterli olmayabilir, bu sebeple bu tekniklerin bir kombinasyonu uygulanmalıdır. Lipaz saflaştırma yöntemlerinde en sıklıkla uygulanan metod jel filtrasyonunu takiben iyon-değişim kromatografisidir (Alvaro ve Illanes, 2008). Lipazlar aktif bölgeleri çevresinde büyük hidrofobik yüzey ihtiva eden enzimlerdir ve bu nedenle de hidrofobik etkileşim kromatografisi de sıklıkla saflaştırılmalarında kullanılmaktadır. Oktil ve fenil hidrofobik matrislerin en popüler fonksiyonel gruplarıdır ancak büyük ölçekteki saflaştırma yöntemleri için oldukça pahalıdır. Konkanavalin A (concanavalin A) gibi immobilize lektinler enzim glikoprotein olduğu zaman fungal ve memeli kaynaklı lipazların saflaştırılması için afinite kromatografisi matrisleri olarak kullanılmaktadır.

Lipaz saflaştırılması için akışkan ikili faz sistemleri, tersinir misellar sistemi ve immunosaflaştmayı içeren yeni sistemler de mevcuttur. Akışkan ikili faz ve tersinir misellar sistemleri, bifazik sistemlerdeki proteinlerin ayrışma özelliklerine dayanmaktadır. Bu sistemlerdeki en önemli parametreleri pH ve akışkan fazın iyonik dayanıklılığı oluşturmaktadır. İmmünosaflaştırma antikor-antijen eşleşmesinin yüksek özgüllüğünden dolayı en seçici protein-saflaştırma

tekniklerinden biridir. Ancak bu tekniğin handikapı monoklonal antikorların çok yüksek maliyette olmasıdır (Alvaro ve Illanes, 2008).

Bir aside dayanıklı *Aspergillus niger* lipazı ham ticari çözeltilerden Bio-gel-p-100'de boyut ayrımı ve Mono-Q'de iyon-değişimi ile, *Rhizopus delemar* lipazı %3-4 geri kazanım ile saflaştırılmıştır. *R. japonicus* NR400 lipazı kromatografiyle hidroksiapatit, oktilsfaroz ve sefakril S-200 üzerinde homojen olarak saflaştırılmıştır (Aravindan ve ark., 2007). *Staphylococcus aureus* 226 lipazı öncelikle amonyum sülfat çöktürme ile ve bunu takiben hidroksiapatit, Sephadex G-200 ve Sephadex G-150 üzerinde kromatografi yöntemiyle enzimin 385 kat saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve %25 verim elde edilmiştir (Hasan ve ark., 2009).

Çizelge 2.7. Birtakım bakteri ve fungal lipazların saflaştırma yöntemleri\* (Saxena ve ark., 2003).

	Mikroorganizma	Saflaştırma Aşamaları	Gerikazanım (%) / saflaştırma oranı	Moleküler ağırlık (kDa)
B A K T E R İ	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	amonyum sülfat çöktürme ve DEAE-cellulose ve octyl-Sepharose CL-4B	21 / 3390	45
	<i>Pseudomonas spp.</i> ATCC 21808	Q-Sepharose, octyl-Sepharose ve enzim izopropanol ile ayrıştırılmıştır.	56 / 159	35
F U N G U S	<i>Bacillus spp.</i>	amonyum sülfat çöktürme, akrinol ile muamele, DEAE-Sephadex A-50, Toyopearl HW-55F ve butil- Toyopearl 650 M	9 / 7762	22
	<i>Rhizopus oryzae</i>	amonyum sülfat çöktürme, sulfopropil-Sepharose, Sephadex G-75 ve tekrar sulfopropil-Sepharose üzerinde	22 / 1260	32
	<i>Penicillium cyclopium</i> MI	Amonyum sülfat çöktürme, DEAE-Cellulose, DEAE-Sepharose ve hidroksiapatit kromatografisi ve Cellulofine GC-700 üzerinde jel filtrasyonu.	27 / 1380	11
*Saxena ve ark., 2003'den özet olarak çizilmiştir.				

### 2.10.2. İmmobilizasyon

Hareketsizleştirme, sabitleme, bağlama anlamlarına gelen immobilizasyonu hücre ve enzim olarak 2 kısma ayırmak mümkündür.

Endüstriyel uygulamaların büyük çoğunluğu sulu çözeltilerde gerçekleşmektedir ve katalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin aktivitelerini yitirmeden geri kazanımları pek mümkün olmamaktadır. Serbest enzimler reaksiyon ortamından istenilen zamanda uzaklaştırılmadıklarından reaksiyonun kontrolü de güçleşmektedir. Bunun için enzim inhibitörleri kullanılması düşünülebilse de saf olarak elde etmek istenilen ürün ortamına yeni ilaveler ürünün saf olarak elde edilmesini zorlaştırabilmektedir. Ayrıca serbest enzimler ortamdaki uzaklaştırılabilir bile tekrar kullanılmaları aktivitelerini yitirdiklerinden dolayı mümkün değildir. Sürekli enzim sistemlerinin oluşturulması için bu tür sorunların giderilmesi gerekmektedir ki bu amaçla enzim immobilizasyonu araştırmaları önem kazanmıştır.

İmmobilize enzimler ortamdaki uzaklaştırılabilirliklerinden kesikli ve sürekli sistemlerde kolaylıkla kullanılabilirler. Bu enzimlerin kullanımda aktif olarak kaldıkları süre serbest enzimlere göre oldukça fazladır. İmmobilize enzimler substrat fazında çözünmediğinden sistemin kontrolü çözünür enzimlere göre daha kolaydır (Çizelge 2.8.). Bu nedenle özellikle endüstriyel ölçekte enzim kullanımında immobilizasyon önem kazanmaktadır. İmmobilizasyonun gerçekleşmesi için bir takım taşıyıcılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunların bir kısmı çizelge 2.9. 'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.8. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri

1.	Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir, ve ürünler enzim tarafından kirlenmez.
2.	Çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır.
3.	Bir çok kez ve uzun süre kullanılabilir.
4.	Sürekli işlemlere uygulanabilir.
5.	Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
6.	Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
7.	Serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir (bazı durumlarda).
8.	Enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis and self-digestion) olasılığı azalır.

Çizelge 2.9. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar.

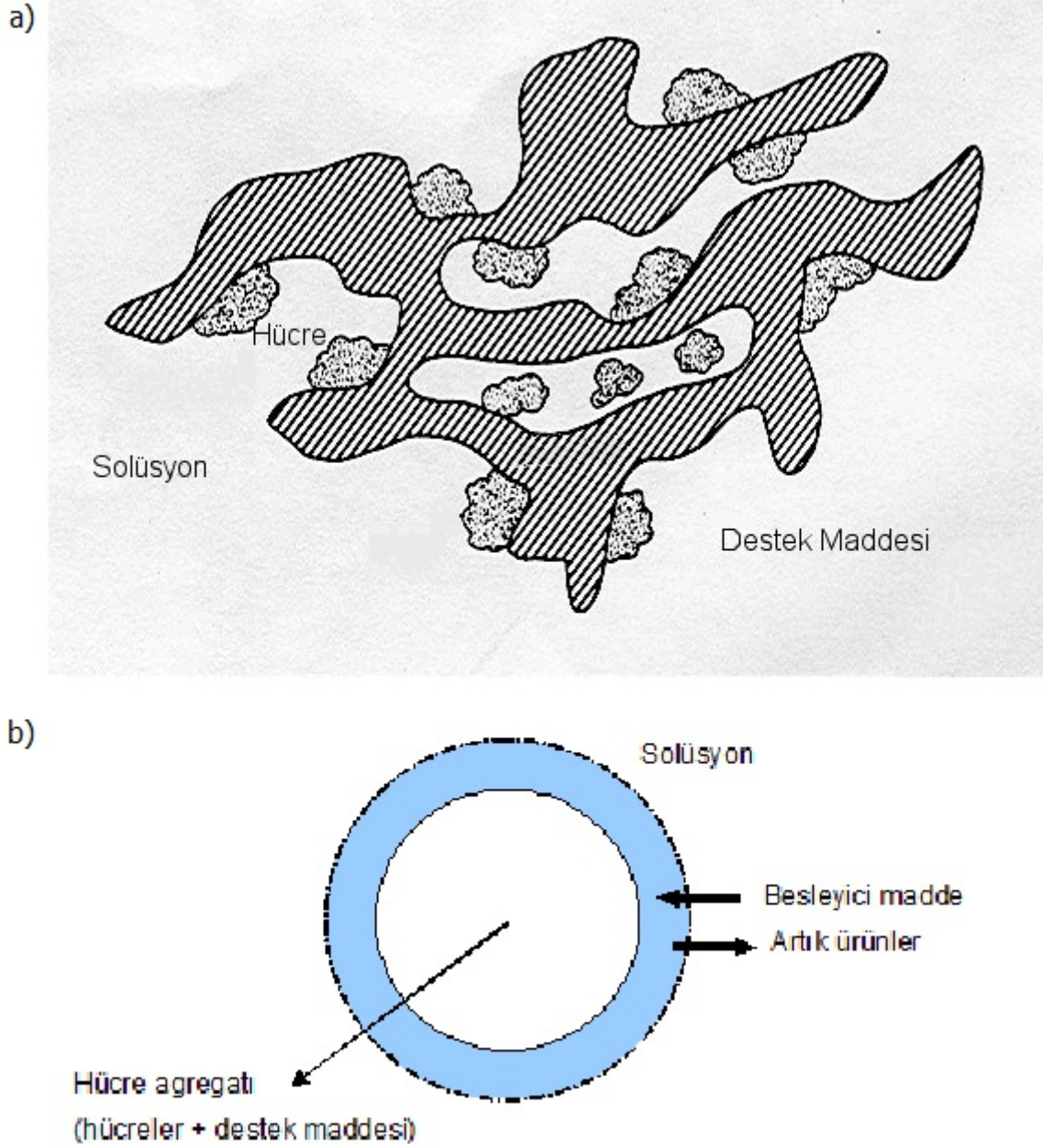
Anorganik Polimerler	Doğal Taşıyıcılar	Sentetik Polimerler
Cam	Seluloz	Polistiren Türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Aluminyum oksit	Dekstran	Naylon
Bentonit	Agaroz	Polivinilalkol
Hidroksiapatit	Karragenan	Oksiranlar
Titandioksit	Alginat	Metakrilat
Zirkonyumdioksit	Kollajen	İyon geçiştirici reçineler
Nikeloksit	Kitin	

Enzim immobilizasyonunun temel hedefi enzimlerin endüstriyel ölçekte bir çok reaksiyon döngüsünde tekrar tekrar kullanılmasını sağlamaktır. Bu yönden enzim immobilizasyonunun protokolleri ile enzim özelliklerinin gelişimi birbirleriyle yakın ilişki içindedir (Guisan, 2006). Endüstriyel alanlarda kullanılan birçok enzimler gibi lipazlar da immobilize olarak kullanılmaktadır. Lipazlar basit ve ucuz bir sol-gel yöntemiyle hidrofobik silikatların gözeneklerine etkileyici biçimde tutuklanabilmektedir. Bu enzim varlığında basit koşullarda hidrolize edilmiş alkilsilan  $[R_{Si}(OCH_3)_3]$  ve  $Si(OCH_3)_4$  karışımıyla gerçekleştirilir. Sol-gel enkapsülasyonun enzim immobilizasyonunda özellikle kolay ve etkili bir yol olduğu ispatlanmıştır (Reetz, 2006).

Cunha ve ark., 2008, 'de yüksek aktiviteye sahip YLL'yi (*Yarrowia lipolytica* lipazı) fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlanma ile immobilize etmişlerdir. Enzim oktil-agaroz ve oktadesil-boncuk destek materyallerine hidrofobik adsorpsiyon ile ve MANAE-agaroz (Amino-glioksil-agaroz) destek materyaline iyonik adsorpsiyon ile tutuklanmıştır. CNBr-agaroz ise kovalent bağlanma için destek materyali olarak kullanılmıştır. Oktil-agaroz'da %71, oktadesil-boncukta %90 ve MANAE-agaroz'da ise %97 verim elde edilmiştir. Ancak aktivite tutulumu daha düşüktür (oktil-agaroz'da %34, oktadesil-boncukta %50 ve MANAE-agaroz'da %61). Ancak kovalent bağlanma tüm enzim aktivitesinin kaybına yol açmıştır.

Hücresele immobilizasyon metotlarında immobilize hücreler agregat olarak ifade edilir. Bir agregatta üç komponent vardır. Bunlar, hücreler, katı ya da jel olan

destek materyali ve agregatı içinde bulunduran solüsyondur (Şekil 2.9.a). Mühendislik açısından bu kompleks yapı yerine agregata basit bir geometrik şekli olan (küre ya da ince film) homojen faz olarak bakılır (Şekil 2.9.b). Bu sistem çoğu literatürde mikroçevre olarak adlandırılır (Karakoç, 2004).



Şekil 2.9. İmmobilize hücre (agregat) componentleri (Karakoç, 2004).

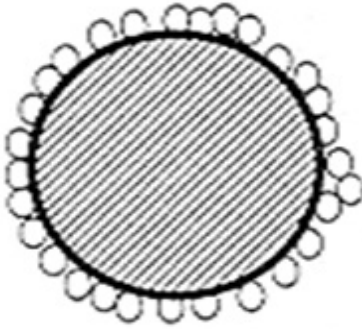
Hücre immobilizasyon yöntemlerinin seçiminde üç olgu önemlidir.

- ❖ Hücrelerin katalitik aktivitelerinin korunumu,
- ❖ İmmobilize hücrelerin uzun ömürlü olması,
- ❖ Ekonomik olmalıdır.

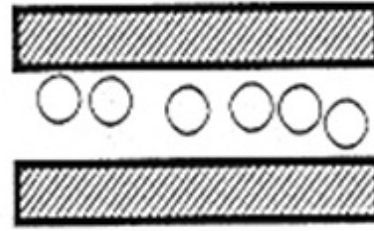


Bu olgular enzim immobilizasyon yöntemlerinde de geçerli olmalıdır. Immobilizasyon yöntemi seçimi yapılırken bütün bu faktörlerin göz önünde tutulması gereklidir. Katalitik aktivite canlı hücrelerle ilişkilidir. Immobilizasyon işlemleri sırasında canlılık kaybının minimumda tutulması sağlanmalıdır. Bu süreçte canlılık kaybı söz konusu olursa hücrelerden beklenen ürün verimi düşmektedir. Seçilen yöntem immobilize olan her bir biyokatalist için uygun olmalıdır ki istenilen aktiviteye sahip olan hücreler uzun süreli kullanılabilirsin.

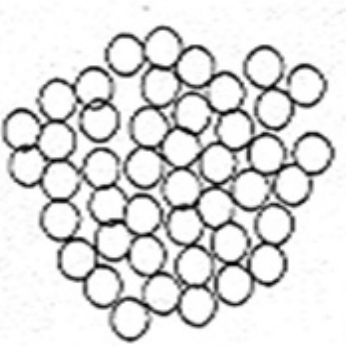
İster hücre ister enzim immobilizasyonu olsun, immobilizasyon yöntemlerini 3 ana grupta toplamak mümkündür, bunlar: (1) Suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlanma yöntemleri, (2) Çapraz bağlama yöntemleri, (3) Tutuklama yöntemleri 'dir. Bunun yanısıra immobilizasyon yöntemleri fiziksel mekanizmalarına göre 4 başlık altında incelenmektedir (Şekil 2.10.).



a) Yüzeğe bağlanma



b) Bariyerler arasında alıkoyma



c) Hücrelerin toplanması



d) Porlu matriks içine tuzaklama

Şekil 2.10. Fiziksel mekanizmalarına göre immobilizasyon yöntemleri (Karakoç, 2004).

a) Yüzeğe bağlanma (attachment)

Hücrelerin herhangi bir yolla katı destek bir yüzeğe bağlanması şeklinde olaylarının tümü yüzeğe bağlanma kategorisi içinde yer almaktadır. Doğal adsorpsiyon ve kimyasal bağlayıcılarla olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

b) Bariyer arkasında alıkoyma (containment)

Hücrenin bir bariyer arkasında alıkonusudur. Alıkoyma için kullanılacak olan bariyerler organik çözücüde dağılmış olarak bulunan hücre süspansiyonu bulduran birbirine karışmayan iki sıvı arasındaki yüzeğe ve mikrofiltrasyon ya da ultrafiltrasyonda kullanılan yarı geçirgen membranlar olabilir. Mikrokapsülleme sürecinde yarı geçirgen membranların gözenek çapları hücrelere besin girişine ve ürün çıkışına izin verirken, hücrelerin ortamdaki ayrılmasını engelleyecek şekilde hazırlanmalıdır. Bu yöntemde zar olarak, naylon, selüloz nitrat ve selüloz asetat gibi sentetik zarlarla eritrositler gibi biyolojik zarlar da kullanılmaktadır. Genellikle memeli doku kültürlerinde kontrollü ilaç salınımı için kullanılan bir yöntemdir.

c) Hücrelerin Toplanması (aggregation)

Doğal olarak mikrobiyal hücreler toplanmaya, kümeleşmeye ve folükülasyon yapı oluşturmaya eğilimlidirler. Bu reaksiyon, ortama folükülasyon ve çapraz bağlama ajanlarının ilavesiyle hızlandırılabilir. Fungus hücrelerinin doğal folükülasyonlarından olan kule tipi bioreaktörler bira üretiminde kullanılmaktadır. Bunun yanında kirli su arıtımında aktif çamur oluşumunda da doğal folükülasyon kullanılmaktadır.

d) Porlu matriks içine tuzaklama (entrapment)

Tuzaklama hücrelerin, çevrelerinde varolan ya da daha önceden sentezlenerek ilave edilen çeşitli porlu yapılar içine girmesiyle meydana gelir. Tuzaklama metodu önceden ortama ilave edilen porlu destek maddelerine göre iki başlık altında incelenir. Seramik, tuğla, cam tozu, ponza taşı gibi mikroskobik seviyede porlu partiküller ya da makroskobik seviyede porlara sahip destek maddelerinin kullanıldığı metotlardır. Makroskobik destek maddelerine "biyokitle destek partikülleri (BSPs)" (Biomass support particles) denir. Tuzaklama yöntemleri içinde yaygın olarak kullanılan bir diğer seçenek ise enzim ve hücrelerin polimer jeller içinde tutulmasıdır. Özellikle k-karrageenan, Na, Ca- alginat, poliakrilamid gibi

polisakkarit jellerin kullanımıyla yapılmaktadır. BSPs ekonomik önemi olan birçok olayda ve ürün elde edilmesi gibi endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Tuzaklama yöntemiyle alginat ve k-karrageenan diğer polimer jellere göre daha sık kullanılmaktadır. Bu jel boncukların sentez reaksiyonları basittir, mikroorganizmalara karşı toksik değildir, biyolojik bozulmaya, depolanmaya ve kültürasyon koşullarına karşı dayanıklıdır. Sünger, köpük gibi immobilizasyon matrisleri enzim ve hücre immobilizasyonlarında kullanılmaktadır. Endüstriyel önemi olan birçok maddenin üretiminde en büyük gidere neden olan basamak geri kazanım yöntemleridir. Bu işlemin maliyetini azaltabilmek için en potansiyel alternatiflerden birisi hücrelerin poliüretan köpük, sünger, çelik tel gibi inert taşıyıcılara tutuklanmasıdır. Alginat, k-karrageenan ve poliakrilamid gibi diğer destek materyalleriyle kıyaslandıklarında, bu materyallerde görülen tekniksel zorluklar ve yüksek maliyet sünger ve köpük gibi inert taşıyıcılarda görülmemektedir (Karakoç, 2004).

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Mikroorganizmalar

Tez kapsamında kullanılan *Yarrowia* suşları Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. İki *Yarrowia lipolytica* suşu; NBRC 1658 ve IFO 1195, National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center, Japonya'dan liyofilize olarak sağlanmışlardır. Diğer bir *Yarrowia lipolytica* suşu ise; Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne ait kültür koleksiyonundan, yatık kültür olarak sağlanmıştır (Yalçın, 2007). Çalışmada kullanılan bir diğer maya suşu olan *Candida tropicalis* ise zeytinyağı imalathanesi atık toprağından tarafımca izole edilmiştir.

##### 3.1.1. Mikroorganizma izolasyonu

Lağım, çöp ve yağ imalathanesi atıkları gibi yağlı ortamlar lipaz üreten mikroorganizmaların izolasyonu ve lipolitik mikroorganizmaların zenginleştirilmesi için iyi ortamlardır (Rahman ve ark., 2007). Lipaz aktivitesine sahip muhtemel bir mikroorganizmanın üretimi için Mersin ili, Tarsus ilçesinde yer alan Boltaç Zeytinyağı İmalathane'sinden üç farklı toprak örneğı alındı. Örnekler alınırken kontaminasyonu önlemek amacıyla steril koşullarda çalışıldı.

İlk olarak toprak örnekleri steril koşullar altında Petri plaklarında hazırlanmış Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Modifiye Yeast Mold Agar (YM Agar) besiyerlerine aşılandı ve inkübasyon sonrası üreyen mayalar ayrılarak saflaştırıldı.

Öncelikle funguslar için genel üretim besiyeri olan PDA kullanıldı. Daha sonra funguslar için üretim besiyeri olan YM Agar modifiye edilerek kullanıldı. YM Agar g/L'de 3 maya özütü, 3 malt özütü, 5 pepton, 10 dekstroz ve 20 agar içermektedir. YM Agar için besiyeri henüz sıvı formdayken %1 zeytinyağı eklenerek modifiye edildi ve eklenen zeytinyağı iyice homojenize edildi. Hazırlanan PDA ve YM Agar Petri plaklarına paylaştırıldı ve her iki besiyeri de katılaşımaya bırakıldı.

Topraktan fungus izolasyonu amacıyla, her toprak örneğı için ayrı olmak üzere, birinci deney tüpüne 10 ml ve diğer deney tüplerine 9'ar ml serum fizyolojik (%0.9 NaCl) hazırlandı ve 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. 10 ml serum fizyolojik içeren tüplere steril koşullarda toprak örneklerinden 1 g eklendi.

Vorteks karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra elde edilen karışımların üst kısımlarından diğer tüplere 1'er ml aktararak  $10^{-5}$  oranında seyreltme yapıldı. Her toprak örneği için ayrı olmak üzere  $10^{-1}$  –  $10^{-5}$  oranında seyreltilmiş bu tüplerden 1'er ml alınarak PDA ve YM Agar besiyerlerine yayma ekim yapıldı ve etüvde statik olarak  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Petri plaklarında karışık olarak üremiş olan mikroorganizmalar alınarak tek koloni ekim yöntemi ile yeni besiyerlerine aşılandı ve saflaştırılıncaya kadar işleme devam edildi. Petrielerde tek koloni elde edilen mikroorganizmalar da tüplere hazırlanan yatık PDA 'lara aktararak stok kültürler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

İzole edilen mayalar metilen mavisi ile boyanarak hücre morfolojileri, tek koloni ekim yöntemi ile koloni morfolojileri saptandı.

### **3.1.2. Yeni izole maya suşunun tanımlanması**

Mersin ili Tarsus ilçesi zeytinyağı imalathanesi atık toprağından izole edilen maya suşunun sırasıyla Genomik DNA izolasyon, PCR, PCR temizleme, Dizi analizi ve Filogenetik analizi RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne yaptırılarak tanımlanmıştır.

## **3.2. Mikroorganizmalarda Lipolitik Aktivite Tayini**

Mikroorganizmalarda lipolitik aktivitenin tespiti amacıyla tributirinli agar besiyeri, g/L'de 10 agar, 5 pepton ve 3 maya özütü şeklinde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri  $110^{\circ}\text{C}$ 'de 25 dakika 1 atm basınç altında sterilize edildi ve  $60^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutuldu. Sonrasında steril pipet ile %0,1 tributirin ortama eklendi ve homojenizasyonu sağlandı.

### **3.2.1. Tributirinli Agar besiyeriyle lipolitik aktivite tayini**

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195 ve *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve topraktan izole edilen *Candida tropicalis* suşunda lipolitik aktivite tespiti amacıyla Tributirinli Agar besiyerleri hazırlandı. Öncelikle 100 ml distile suya 1 g agar, 0,5 g pepton ve 0,3 g maya özütü eklenerek karıştırıldı.  $110^{\circ}\text{C}$ 'de 25 dakika 1 atm basınç altında sterilizasyon sonucunda besiyeri  $60^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutuldu. Sonrasında steril pipet ile 0,1 ml tributirin ortama eklendi ve homojenizasyonu sağlandı. Daha önceden steril edilen tüplere 7'şer ml dağıtılarak dik durumda soğumaya bırakıldı.

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 0,1 ml alınan örnekler ayrı ayrı Tributirinli Agar besiyerlerine aşılandı. 30<sup>0</sup>C'de 3 güne kadar inkübe edilerek berraklık zonuna göre değerlendirme yapıldı.

Mikroorganizma lipaz pozitif ise besiyerinde berraklık oluşmakta negatif ise herhangi bir değişim gözlenmemektedir. Lipolitik aktivitenin değerlendirilmesinde berraklık derinliği mm cinsinden 1. günden sonra ölçüldü ve 3. güne kadar devam edildi (Sztajer ve ark., 1988).

### 3.3. Mikroorganizmalarda Lipaz Sentezi Tayini

Mikroorganizmalarda lipaz aktivite tayininde titrasyon yöntemi kullanıldı. Kültür ortamı filtratının enzim kaynağı olarak kullanıldığı lipaz aktivite tayininde değerler formülde yerine konularak lipaz aktivite miktarı ünit aktivite olarak saptandı. 1 ünite lipaz aktivitesi uygun koşullar altında 1 µmol yağ asidini açığa çıkaran aktivite olarak tanımlandı.

Kültür ortamı filtratı enzim kaynağı olarak kullanıldı ve aktivite tayini 4 basamakta gerçekleştirildi (Sugihara ve ark., 1991).

1. İnkübasyon ortamına 1 ml riviera zeytinyağı, 4,5 ml 50mM pH 5,6 asetat tamponu, 0,5 ml 0,1M CaCl<sub>2</sub> ve 1 ml filtrat eklendi. Kör tüpüne ise filtrat yerine d.su ilave edildi. Enzim kaynağı olarak üretim sonrasında Whatman no:1 filtre kağıdından süzülerek elde edilen süpernatant kullanıldı.
2. Karışım orbital çalkalamalı ortamda 30<sup>0</sup>C'de 200 rpm hızda 30 dakika inkübe edildi.
3. Ortama 20 ml etanol eklenerek reaksiyon durduruldu.
4. Ortam 50mM KOH ile pH 10,5'e kadar titre edildi. Değerler aşağıdaki formülde yerine konularak açığa çıkan yağ asidi miktarı ünit aktivite olarak hesaplandı.

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

30

### **3.4. Maya Suşlarının Özellikleri**

#### **3.4.1. Hücre morfolojisinin incelenmesi**

Yeni izole edilen *Candida tropicalis* ve *Yarrowia* suşlarının hücre morfolojilerinin incelenmesi amacıyla yatık stok kültürlerden alınan örnekler lam üzerine alınarak preparat hazırlandı. Kurutma sonrasında metilen mavisi ile 5 dakika boyama yapıldı ve tekrar kurutuldu. Sonrasında örneklere immersiyon yağı damlatıldı ve mikroskopta 100'lük objektifte inceleme sonrasında hücre morfolojileri saptanarak fotoğrafları çekildi.

#### **3.4.2. Koloni morfolojisinin incelenmesi**

Yeni izole maya *Candida tropicalis* ve *Yarrowia* suşlarının koloni morfolojilerinin incelenmesi amacıyla petri plaklarına YM Agar besiyerleri hazırlandı. Her maya örneği tek koloni ekim yöntemiyle YM Agar besiyerlerine ekildi ve 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oluşan tek koloniler koloni mikroskopunda incelenerek koloni morfolojileri saptandı ve fotoğrafları çekildi.

#### **3.4.3. Mayaların biyokimyasal testleri**

##### **3.4.3.1. Katalaz aktivitesinin tayini**

Mayaların katalitik aktivitesini incelemek amacı ile SDB besiyeri hazırlandı ve 121°C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. Hazırlanan besiyerlerine öze ile ekim yapıldı ve 48 saat 30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bir test tüpüne 1 ml %3'lük hidrojen peroksit ve üzerine de 1 ml sıvı kültür eklenerek meydana gelen hava kabarcıklarına göre katalitik aktivite yorumlandı.

##### **3.4.3.2. Nitratı nitrite indirgeme özelliği**

Mayaların nitrat redüksiyonunu incelemek amacıyla nitratlı buyyon besiyeri hazırlandı. Besiyeri içeriği litrede 3 g et özütü, 10 g pepton, 1 g potasyum nitrat (KNO<sub>3</sub>) olarak hazırlandı. Hazırlanan besiyeri tüplere 10'ar ml içecek şekilde paylaştırıldı ve her tüpe gaz oluşumunu incelemek amacı ile Durham tüpleri yerleştirildi ve 121°C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası yatık maya kültürlerinden öze ile sıvı besiyerlerine ayrı ayrı aşılama yapıldı. 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

Mayanın metabolizması sonucu ortamda nitrit varlığını incelemek amacıyla sülfanilik asit çözeltisi ve  $\alpha$ -Naftilamin çözeltisi hazırlandı. İnkübasyon sonrasında kültür ortamına öncelikle 1 ml sülfanilik asit çözeltisi damlatıldı. Ardından 1 ml  $\alpha$ -Naftilamin çözeltisi eklenerek renk oluşumuna göre sonuç alındı.

#### **3.4.3.3. Amilolitik aktivite tayini**

Amilolitik aktivite tayini için Petri kaplarına nişastalı katı besiyeri hazırlandı. Besiyeri içeriği litrede 3 g et özütü, 5 g pepton, 15 g agar ve 1 g nişastadır. Yatık maya kültürlerinden petrilere ayrı ayrı ekim yapıldı. 48 saat 30<sup>0</sup>C'de inkübe edildi ve üreme sonrasında ortama lügol ayırıcı eklendi ve sonuca göre yorumlandı.

#### **3.4.3.4. Üreaz tayini**

Mayaların üreaz aktivitesinin incelenmesi amacıyla üreli besiyeri hazırlandı. 1 g pepton, 1 g glukoz, 5 g NaCl, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,012 g fenol kırmızısı ve 20 g agar 900 ml distile su içinde çözdürüldü. 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. 29 g üre 100 ml distile su içinde eritilerek milipor filtreden geçirilerek sterilize edildi ve 900 ml içeriğe eklendi. Üreli besiyerinden 10'ar ml içeren iki tüp hazırlandı. Yatık stok kültürlerinden alınan mayalar tüplere aşılandı ve 30<sup>0</sup>C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında indikatör madde olan fenol kırmızısındaki renk değişimine göre sonuç yorumlandı.

### **3.5. Mayaların Üretim Koşullarının Optimizasyonu**

#### **3.5.1. Üretim ortamı**

Lipaz üretim ortamı olarak Hatzinikolaou ve ark, 1996, tarafından önerilen besiyeri ortamı g/L'de 12 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 0,3 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,25 CaCl<sub>2</sub> , 0,005 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,015 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,03 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 1 pepton olacak şekilde hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1 ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında gerçekleştirildi.



### 3.5.2. Aşılama ve kültürasyon

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* sıvı stok kültürleri 150 ml'lik erlenmeyerlerde 50 ml üretim ortamı olacak biçimde hazırlandı. Besiyeri ortamı olarak Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) besiyeri seçildi. Daha önce katı yatık stok olarak hazırlanan mayalardan sıvı stok ortamlarına ekim yapıldı ve 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 48 saat inkübe edildi.

Bu maya kültürlerinden daha sonra lipaz üretimi araştırılacak olan üretim besiyerine 1 ml aşılama yapılacağından eşit miktarda ekilmesi amacıyla sıvı stok kültürlerinde hücre sayımı gerçekleştirildi.

### 3.5.3. Üreme eğrileri

Mayalarda üreme eğrilerinin tespiti için lipaz üretim besiyerleri hazırlandı, pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. Sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 1-10 gün aralığında gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örneklerin optik yoğunlukları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve üreme ortamları Whatman no:1 filtre kağıdından süzülerek 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutma sonrasında biyokütle ağırlıkları saptandı. Elde edilen veriler grafiklenerek üreme eğrisi saptandı.

### 3.5.4. Hücre sayımı

Sıvı stok kültür için 150 ml'lik erlenmeyerlerde 50 ml üretim ortamı içerecek şekilde SDB besiyerleri hazırlandı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Daha sonra yatık PDA kültürlerinden *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* ile aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 48 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında her bir sıvı mikroorganizma stok kültüründe hücre sayımı yapıldı.

Bu amaçla petride katı PDA'lar hazırlandı. Öncesinde seri sulandırım yapmak amacıyla her tüpte 9 ml serum fizyolojik (%0,9 NaCl) içeren ortam hazırlandı ve tüpler 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Her mikroorganizma için ayrı olmak üzere *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile ilk tüplere 1'er ml ekildikten sonra 10<sup>-8</sup> oranında seyreltme yapıldı. Seyreltilen son tüplerden 1'er ml alınarak petride hazırlanmış PDA besiyerlerine yayma yöntemiyle ekildi ve statik etüvde 30<sup>0</sup>C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan koloniler sayılarak ana stok kültürlerdeki hücre sayıları tespit edildi.

### **3.5.5. Üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi**

Üretim ortamı sıcaklığının mikrobiyal üremeye etkisini araştırmak için Hatzinikolaou ve ark, 1996, tarafından önerilen lipaz üretim ortamı hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 10 – 40<sup>0</sup>C aralığında 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örnekler tartılarak kuru ağırlıkları hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi.

### **3.5.6. Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi**

Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisini incelemek için Hatzinikolaou ve ark, 1996, tarafından önerilen lipaz üretim ortamı hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 3 - 9 aralığında ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 3 - 9 pH

aralığında 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30°C'de 48 saat kurutulan örneklerden mayaların kuru ağırlığı ölçüldü. Elde edilen veriler grafiklendi.

### **3.5.7. Üretim ortamı havalandırma hızının üremeye etkisi**

Üretim ortamı aerasyon "havalandırma" hızının üremeye etkisini incelemek için lipaz üretim ortamı hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121°C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65°C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30°C'de 100 – 250 rpm aralığında döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30°C'de 48 saat kurutulan örneklerin kuru ağırlığı hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi.

### **3.5.8. Karbon kaynaklarının üremeye etkisi**

Farklı karbon kaynaklarının lipaz üretimine ve üremeye etkisini araştırmak amacıyla hazırlanan lipaz üretim besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 110°C'de 1 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi.

Öncelikle karbon kaynağı olarak farklı yağların lipaz üretimine ve üremeye etkisi araştırıldı. Bu nedenle lipaz üretim besiyerinin sterilizasyonu sonrasında otoklav sıcaklığı 65°C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera, %1 zeytinyağı sızma, %1 ayçiçek yağı, %1 mısır yağı, %1 soya yağı ve %1 kanola yağı ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30°C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30°C'de 48 saat kurutulan örneklerden mayaların kuru ağırlığı hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi.

Karbon kaynağı olarak şekerlerin lipaz üretimine etkisini araştırmak amacıyla tekrar lipaz üretim ortamı hazırlandı ve besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 glukoz, %1 galaktoz, %1 fruktoz (monosakkaritler) ve %1 laktoz, %1 maltoz ve %1 sukroz (disakkaritler) ilave edildi. Besiyerleri otoklavda 110<sup>0</sup>C'de 1 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerde mayaların kuru ağırlığı hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi.

Daha sonra %1 zeytin yağına ilave olarak şekerlerin üremeye etkisi araştırıldı. Lipaz üretim besiyeri hazırlanarak pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 glukoz, %1 galaktoz, %1 fruktoz, %1 laktoz, %1 maltoz ve %1 sukroz ilave edildi. Besiyerleri otoklavda 110<sup>0</sup>C'de 1 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerden mayaların kuru ağırlığı hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi.

### **3.5.9. Azot kaynağının üremeye etkisi**

Azot kaynaklarının üremeye etkisinin tespiti amacıyla 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde hazırlanan lipaz üretim besiyerlerine %1 proteose peptone no:3, %1 pepton, %1 maya özütü, %1 kazein, %1 üre, %1 amonyum sülfat, %1 amonyum oksalat, %1 amonyum nitrat ve %1 amonyum karbonat eklendi ve pH'ları 4,5'a ayarlanarak 110<sup>0</sup>C'de 1 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi. Besiyerlerinin sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir

besiyerine %1 riviera zeytin yağı eklendi. Her bir besiyerine önceden hazırlanmış sıvı stok kültürleri olan *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195, Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşundan 1'er ml aşılılarak 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm hızda 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerleri Whatman no:1 kağıdından süzülerek süpernatantları elde edildi. 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerden mayaların kuru ağırlığı ölçüldü. Elde edilen değerler grafiklendi.

Ayrıca karbon kaynağı olarak besiyerine konulan %1'lik riviera zeytin yağı olmaksızın sadece azot kaynaklarının lipaz üretimine ve üremeye etkisi araştırıldı. 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde hazırlanan lipaz üretim besiyerlerine %1 proteose peptone no:3, %1 pepton, %1 maya özütü, %1 kazein, %1 üre, %1 amonyum sülfat, %1 amonyum oksalat, %1 amonyum nitrat ve %1 amonyum karbonat eklendi ve pH'ları 4,5'a ayarlanarak 110<sup>0</sup>C'de 1 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerden mayaların kuru ağırlığı hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi.

### **3.5.10. Çeşitli Atık ve Artıkların Üremeye Etkisi**

Çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisinin tespiti amacıyla 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde hazırlanan lipaz üretim besiyerlerine ayrı ayrı %1 zeytin kara suyu, %1 zeytin küspesi, %1 melas, ve %1 kızartma yağı, ayrıca lipaz üretimini artırdığı belirtilen %1 gaz yağı (kerosene) ve %1 dekstrin de eklendi. Ayrıca bir diğer besiyerlerine (kızartma yağı ve gaz yağı hariç) bu atık ve artıklara ilave olarak %1 riviera zeytin yağı eklendi ve pH'ları 4,5'e ayarlanarak 110<sup>0</sup>C'de 1 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi. Her bir besiyerine önceden hazırlanmış sıvı stok kültürleri olan *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195, Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşundan 1'er ml aşılılarak 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm hızda 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerleri Whatman no:1 kağıdından süzülerek süpernatantları elde edildi. Süpernatantlar kullanılarak enzim sentez tayini yapıldı. 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerden mayaların kuru ağırlığı ölçüldü. Elde edilen değerler grafiklendi.

### 3.6. Lipaz Üretim Optimizasyonu

Topraktan yeni izole edilen maya kültürü olan *Candida tropicalis* ve *Yarrowia lipolytica* kültürlerinin lipaz üretim optimizasyonları araştırıldı. Sıcaklık, pH ve lipaz üretim koşulları optimize edilerek sonuçlar değerlendirildi.

#### 3.6.1. Lipaz üretim ortamı

Lipaz üretim ortamı olarak Hatzinikolaou ve ark., 1996, tarafından önerilen besiyeri ortamı kullanıldı. İçeriği g/L'de 12 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 0,3 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,25 CaCl<sub>2</sub> , 0,005 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,015 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,03 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 1 pepton olan besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1 ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında gerçekleştirildi.

#### 3.6.2. Aşılama ve kültürasyon

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* sıvı stok kültürleri 150 ml'lik erlenmeyerlerde 50 ml üretim ortamı olacak biçimde hazırlandı. Besiyeri ortamı olarak Sabouraud Dekstroz Broth besiyeri seçildi. Daha önce katı yatık stok olarak hazırlanan mayalardan sıvı stok ortamlarına ekim yapıldı ve 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 48 saat inkübe edildi.

Sıvı stok maya kültürlerinden daha sonra lipaz üretimi araştırılacak olan lipaz üretim besiyerine 1 ml aşılama yapılacağından sıvı stok kültürlerinde hücre sayımı gerçekleştirildi.

#### 3.6.3. Lipaz aktivite tayini

Kültür ortamının filtratı enzim kaynağı olarak kullanılan lipaz aktivite tayini yöntemi 4 basamakta gerçekleştirildi (Sugihara ve ark., 1991) ve sonuçlar hesaplanarak grafiklendi.

#### **3.6.4. Enzim lokalizasyonunun saptanması**

Lipaz enziminin hücre-içi ve hücre-dışı özelliği araştırıldı. Bu amaçla 250 ml'lik erlenmeyerde 100 ml lipaz üretim besiyeri hazırlandı. 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Stok kültürden 1 ml aşılama yapılarak 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel hızda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültürlerden 10'ar ml alınarak 7200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Mayaların biyokütleleri ve süpernatantlar ayrı ayrı elde edildi. Mayalar 0,1M pH 7,0 fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı ve aynı tampon içinde süspanse edildi. Maya süspansiyonu, ultrasonik hücre parçalayıcısının standart ucuyla 90 kc hızda 40 dakika muamele edilerek hücreler parçalandı. Santrifügasyon ile hücre parçalarından arındırılarak üstteki sıvıda hücre içi enzim aktivitesi araştırıldı.

Daha önce yapılan santrifügasyon sonrasında elde edilen süpernatanda hücre dışı enzim aktivitesi saptanarak karşılaştırma yapıldı. Sonuçlar grafiklendi.

#### **3.6.5. Üretim ortamı sıcaklığının lipaz sentezine etkisi**

Lipaz sentezinin üretim ortamı sıcaklığında belirlenmesi için lipaz üretim ortamı hazırlandı. Besiyerinin pH 'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm. basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 10 – 40<sup>0</sup>C aralığında 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, elde edilen süzüntülerde lipaz aktivitesi araştırıldı ve elde edilen veriler grafiklendi.

#### **3.6.6. Üretim ortamı pH'sının lipaz sentezine etkisi**

Üretim ortamı pH'sının lipaz sentezine etkisini araştırmak amacıyla lipaz üretim ortamı hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 3 – 9 aralığında ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica*

IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 3 – 9 pH aralığında 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, elde edilen süzüntülerde lipaz aktivitesi araştırıldı ve elde edilen veriler grafiklendi.

### **3.6.7. Üretim ortamı aerasyon hızının lipaz sentezine etkisi**

Üretim ortamı havalandırma hızının lipaz sentezine etkisini incelemek için lipaz üretim ortamı hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 100 – 250 rpm aralığında döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, elde edilen süzüntülerde lipaz aktivitesi araştırıldı. Elde edilen veriler grafiklendi.

### **3.6.8. Karbon kaynağının lipaz sentezine etkisi**

Farklı karbon kaynaklarının lipaz üretimine ve üremeye etkisini araştırmak amacıyla hazırlanan lipaz üretim besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi.

Öncelikle karbon kaynağı olarak farklı yağların lipaz üretimine ve üremeye etkisi araştırıldı. Bu nedenle lipaz üretim besiyerinin sterilizasyonu sonrasında otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera, %1 zeytinyağı sızma, %1 ayçiçek yağı, %1 mısır yağı, %1 soya yağı ve %1 kanola yağı ilave edildi. Çizelge 3.1.'de bu yağların bir takım özellikleri verilmektedir. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1



kağıdından süzüldü, süzüntülerde lipaz aktivitesi araştırıldı. Elde edilen veriler grafiklendi.

Çizelge 3.1. Sıvı yağların özellikleri (100 g'da gram olarak).

Yağlar	Doymamış Yağ		Doymuş Yağ	Trans Yağ Asitleri	Protein	Karbonhidrat
	Tekli	Çoklu				
Zeytin Yağı Riviera	10,5*	1,5*	2*	-	-	-
Zeytin Yağı Sızma	10*	1,5*	2,5*	-	-	-
Ayçiçek Yağı	87-91		9-13	-	-	-
Mısır Yağı	85,5		14,5	-	-	-
Soya Yağı	23	62	15	-	-	-
Kanola Yağı	62	27	11	-	-	-

\*14 gramda, - yok

Karbon kaynağı olarak şekerlerin lipaz üretimine etkisini araştırmak amacıyla tekrar lipaz üretim ortamı hazırlandı ve besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 glukoz, %1 galaktoz, %1 fruktoz, %1 laktoz, %1 maltoz ve %1 sukroz ilave edildi. Besiyerleri otoklavda 110<sup>0</sup>C'de 1 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, süzüntülerde lipaz aktivitesi araştırıldı. Elde edilen veriler grafiklendi.

Daha sonra %1 zeytin yağına ilave olarak şekerlerin lipaz üretimine etkisi araştırıldı. Lipaz üretim besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 glukoz, %1 galaktoz, %1 fruktoz, %1 laktoz, %1 maltoz ve %1 sukroz ilave edildi. Besiyerleri otoklavda 110<sup>0</sup>C'de 1 atm basınç altında 25 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her

bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30°C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzülür, süzöntülerde lipaz aktivitesi araştırıldı. Elde edilen veriler grafiklendi.

### **3.6.9. Azot kaynağının lipaz sentezine etkisi**

Azot kaynaklarının lipaz üretimine ve mikrobiyal üremeye etkisinin tespiti amacıyla 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde hazırlanan lipaz üretim besiyerlerine %1 proteose peptone no:3, %1 pepton, %1 maya özütü, %1 kazein, %1 üre, %1 amonyum sülfat, %1 amonyum oksalat, %1 amonyum nitrat ve %1 amonyum karbonat eklendi ve pH'ları 4,5'a ayarlanarak 110°C'de 1atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Besiyerlerinin sıcaklığı 65°C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine %1 riviera zeytin yağı eklendi. Her bir besiyerine önceden hazırlanmış sıvı stok kültürleri olan *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195, Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşundan 1'er ml aşılansarak 30°C'de 150 rpm hızda 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerleri Whatman no:1 kağıdından süzülerek süpernatantları elde edildi. Süpernatantlar kullanılarak enzim aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerler grafiklendi.

Ayrıca karbon kaynağı olarak besiyerine konulan %1'lik riviera zeytin yağı olmaksızın sadece azot kaynaklarının lipaz üretimine ve üremeye etkisi araştırıldı. 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde hazırlanan lipaz üretim besiyerlerine %1 proteose peptone no:3, %1 pepton, %1 maya özütü, %1 kazein, %1 üre, %1 amonyum sülfat, %1 amonyum oksalat, %1 amonyum nitrat ve %1 amonyum karbonat eklendi ve pH'ları 4,5'a ayarlanarak 110°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30°C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzülür, süpernatantlar kullanılarak enzim aktivite tayini yapıldı. Elde edilen veriler grafiklendi.

### 3.6.10. Çeşitli atık ve artıkların lipaz üretimine etkisi

Çeşitli atık ve artıkların lipaz üretimine etkisinin tespiti amacıyla 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde hazırlanan lipaz üretim besiyerlerine ayrı ayrı %1 zeytin kara suyu, %1 zeytin küspesi, %1 melas, ve %1 kızartma yağı, ayrıca lipaz üretimini artırdığı belirtilen %1 gaz yağı (kerosene) ve %1 dekstrin de eklendi. Ayrıca bir diğer besiyerlerine (kızartma yağı ve gaz yağı hariç) bu atık ve artıklara ilave olarak %1 riviera zeytin yağı eklendi ve pH'ları 4,5'a ayarlanarak 110<sup>0</sup>C'de 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Her bir besiyerine önceden hazırlanmış sıvı stok kültürleri olan *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195, Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşundan 1'er ml aşılılarak 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm hızda 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerleri Whatman no:1 kağıdından süzülerek süpernatantları elde edildi. Süpernatantlar kullanılarak enzim sentez tayini yapıldı. 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerden mayaların kuru ağırlığı ölçüldü. Elde edilen değerler grafiklendi.

## 3.7. Lipazın Enzimolojik Özellikleri

### 3.7.1. Substrat konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesini incelemek amacı ile 250 ml'lik erlenmeyer şişelerde 100 ml lipaz üretim ortamları hazırlandı ve besiyerlerinin pH'sı 4,5'e ayarlandı. 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. Besiyerlerinin sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine %1 riviera zeytin yağı eklendi. Her bir besiyerine önceden hazırlanmış sıvı stok kültürleri olan *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195, Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşundan 1'er ml aşılılarak 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm hızda 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültür ortamı Whatman no:1 filtre kağıdından süzülerek hücresel kısım uzaklaştırıldı ve süpernatant elde edildi. Enzim sentez tayininde substrat olarak kullanılan riviera tipi zeytin yağının %0,5-5,0 ml arasında değişen yoğunlukları sabit miktardaki enzimle reaksiyona sokularak aktivitelerine bakıldı. Sonuçlar grafiğe geçirilerek substrat doymuşluk eğrisi çizildi ve yorumlandı (Horton ve ark., 1993).

### **3.7.2. Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi**

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesini incelemek amacı ile 250 ml'lik erlenmeyer şişelerde 100 ml lipaz üretim ortamları hazırlandı ve besiyerlerinin pH'sı 4,5'e ayarlandı. 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. Besiyerlerinin sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine %1 riviera zeytin yağı eklendi. Her bir besiyerine önceden hazırlanmış sıvı stok kültürleri olan *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195, Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşundan 1'er ml aşılı olarak 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm hızda 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültür ortamı Whatman no:1 filtre kağıdından süzülerek hücresel kısım uzaklaştırıldı ve süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatantlarda enzim aktivitesi araştırıldı. Enzim aktivitesinin ilk aşamasında 1 ml substrat olan riviera zeytin yağı ile 1 ml enzim örneği olarak kullanılan süpernatant 10 - 70<sup>0</sup>C sıcaklık aralığında ayrı ayrı inkübasyona bırakıldı. Enzim aktivitesinin diğer aşamaları aynen tekrarlandı. Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi saptanarak grafiklendi.

### **3.8. Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması**

#### **3.8.1. Kaba enzim ekstresinin hazırlanması**

Kaba enzim ekstresi elde etmek amacı ile 250 ml'lik erlenmeyer şişelerde 100 ml lipaz üretim ortamları hazırlandı ve pH'ları 4,5'e ayarlandı. 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. Besiyerlerinin sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde besiyerine %1 riviera zeytin yağı eklendi ve optimizasyon sonucunda en yüksek aktivite gösteren *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşundan 1 ml aşılı olarak 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm hızda 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültür ortamı Whatman no:1 filtre kağıdından süzülerek hücresel kısım uzaklaştırıldı ve süpernatant elde edildi. Hücresiz ortam saflaştırma işleminde kullanıldı. Saflaştırma işlemleri +4<sup>0</sup>C'de yapıldı.

#### **3.8.2. Amonyum sülfat ile çöktürme**

Kaba enzim ekstresinin hazırlanmasından sonra saflaştırma işlemlerinden ilki olan amonyum sülfat ile çöktürme işlemi gerçekleştirildi (Litwack, 1960, Rifaat ve ark., 2010). Enzim ekstresinden 100 ml alınarak 500 ml'lik beherglass'a konuldu. Sonrasında üzerine %40 yoğunluk oluşturacak şekilde (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklendi ve +25<sup>0</sup>C'de 24 saat muamele edildi. Sonrasında 10800 rpm'de 15 dakika santrifüj

yapıldı. Oluşan çökelti ve süpernatant birbirinden ayrıldı. Çökelti 50mM pH 5,6 fosfat tamponunda çözüldü. Süpernatant ise %60 amonyum sülfat yoğunluğu için kullanıldı. Bu işlemler %80 yoğunluğa kadar tekrar edildi ve her çökelti tamponunda çözüldü. Daha sonra bu çökeltilerde enzim aktivite, total protein miktarları hesaplandı ve total özgül aktivite ve saflaştırma katsayıları saptandı. Aynı işlemler kaba enzim ekstresi için de gerçekleştirildi. En yüksek saflaştırma oranına sahip olan diyaliz işlemi için ayrıldı.

### **3.8.3. Diyaliz**

Saflaştırma işleminde diyaliz işlemi uygulandı (Bailey, 1967; Chrzanowska, 2001; Kim ve ark., 2001). En yüksek yoğunluk oranına sahip ortam selüloz diyaliz tüplerine konarak 0,05 M (pH: 7,0) fosfat tamponuna karşı +4<sup>0</sup>C'de 24 saat diyaliz edildi. Diyaliz öncesi kaba enzim ekstresinin ve diyaliz sonrası ortamın enzim aktiviteleri ve toplam protein miktarları saptandı. Spesifik aktiviteleri ve saflaştırma katsayıları hesaplanarak yorumlandı.

Spesifik aktivite hesaplamalarında öncelikle süpernatantlardaki toplam protein miktarları hesaplandı. Toplam protein miktarları hem kaba enzim hem de diyaliz sonrası elde edilen süpernatantlarda hesaplandı. Spesifik aktivite, proteaz aktivitesinin toplam protein miktarına bölünmesi ile saptandı.

### **3.8.4. Total protein miktarının hesaplanması**

Santrifügasyon sonrasında elde edilen süpernatantdaki protein miktarı hesaplandı. Enzim örneklerindeki protein miktarı Lowry metodu (Lowry ve ark., 1951) ile spektrofotometrik olarak tayin edildi. Protein tayinlerinde Dana Serum Albumin ile hazırlanan standart protein eğrisi kullanıldı.

0,1 mg'dan başlayarak 1 mg'a kadar 0,1 aralıklar ile dana serum albumin 1'er ml distile suda çözdürüldü. Kör olarak dana serum albumin içermeyen 1 ml distile su kullanıldı. Protein tayininde Lowry yöntemi kullanıldı. 1 ml örneğe 4 ml Lowry C eklendi. 10 dakika sonra 0,5 ml Folin çözeltisi eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 550 nm'de köre karşı okuma yapılarak değerler grafiğe geçirildi.

### 3.9. İmmobilizasyon

Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz yöntemiyle saflaştırılmış lipaz enzimi ekstresi, kaba enzim ekstresi ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu ayrı ayrı Na-alginat, k-Karrageenan ve agar-agara tutuklandı. Saflaştırılmış lipaz enzimi ekstresi olarak, saflaştırılma aşamalarından diyaliz sonrası kalan 6 ml enzim örneği 50mM pH 5,6 fosfat tamponu ile 1:3 oranında seyreltildi ve tutuklama çalışmalarında kullanıldı. Kaba enzim ekstresi, *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunun lipaz üretim ortamında üretimi sonrasında biyokütlenin Whatman no:1 kağıdından süzülmesiyle elde edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu ise lipaz üretim besiyeri ortamında 72 saat üretildikten sonra tutuklama çalışmalarında kullanıldı.

#### 3.9.1. Sodyum alginata tutuklama çalışmaları

Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz yöntemiyle saflaştırılmış lipaz enzimi ekstresi, kaba enzim ekstresi ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu Na-alginata tutuklandı. Saflaştırılmış lipaz enzimi ekstresi, kaba enzim ekstresi ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşundan 5'er ml alınarak otoklavda steril edilmiş olan 10 ml %2'lik sodyum alginat ile ayrı ayrı karıştırıldı. Sonra karışım %2'lik 100 ml steril CaCl<sub>2</sub> içine pipet yardımıyla damlatılarak 3-4 mm çaplı boncuklar elde edildi. Boncukların bulunduğu ortam manyetik karıştırıcıda devamlı bir saat kadar karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan boncuklar %1'lik CaCl<sub>2</sub> içine alındı ve bir gece +4°C buzdolabında saklandı. 24 saat sonra boncuklar steril distile su ile iki kez yıkandı. Sodyum alginat boncuklarından 20 adet alınarak 4,5 ml asetat tamponu, 0,5 ml CaCl<sub>2</sub>, 1 ml riviera zeytin yağı ortamında 30°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ortamdan boncuklar uzaklaştırıldı ve kalan çözültide lipaz aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar grafiklendi.

#### 3.9.2. k-Karrageenana tutuklama çalışmaları

Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz yöntemiyle saflaştırılmış lipaz enzimi ekstresi, kaba enzim ekstresi ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu daha önce 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edilmiş %4 (w/w) konsantrasyonda distile suda hazırlanan 10 ml k-Karrageenan solüsyonu ile ayrı ayrı karıştırıldı. Bu karışım 0,3 M potasyum klorür (KCl) içine damlatıldı ve 3-4 mm büyüklüğünde parçalar elde edildi. Bu parçalar steril distile su ile iki kez yıkandı ve 20 adet alınarak 4,5 ml asetat tamponu, 0,5 ml CaCl<sub>2</sub>, 1 ml riviera zeytin yağı ortamında

30<sup>0</sup>C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ortamdan parçacıklar uzaklaştırıldı ve kalan çözeltide lipaz aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar grafiklendi.

### **3.9.3. Agara tutuklama çalışmaları**

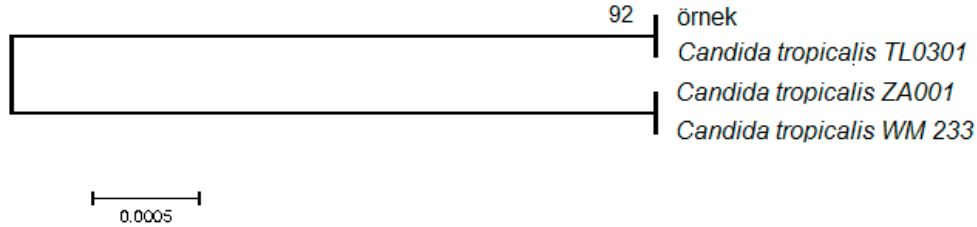
Bunun için Bacteriological Agar-Agar (Merck) kullanıldı. Agar % 3 konsantrasyon olacak şekilde distile suda sterilize edilerek hazırlandı ve amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz yöntemiyle saflaştırılmış lipaz enzimi ekstresi, kaba enzim ekstresi ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu ile ayrı ayrı karıştırılarak petri kabına döküldü. Donduktan sonra 4 mm çaplı steril pipet ucuyla parçalar halinde kesildi ve bu parçalar steril %2'lik CaCl<sub>2</sub> içine atıldı ve bir gece bekletildi. Parçalar steril distile su ile iki kez yıkandı ve agar parçalarından 20 adet alınarak 4,5 ml asetat tamponu, 0,5 ml CaCl<sub>2</sub>, 1 ml riviera zeytin yağı ortamında 30<sup>0</sup>C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ortamdan boncuklar uzaklaştırıldı ve kalan çözeltide lipaz aktivite tayini yapıldı. Sonuçlar grafiklendi.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

Tarsus Boltaş Zeytinyağı İmalathanesinden alınan toprak örneğinden maya izole etmek için çalışmalar yapıldı. Bir maya örneği saflaştırılarak +4<sup>0</sup>C'de buzdolabında saklandı.

Sonuç olarak Mersin ili Tarsus ilçesi Boltaş Zeytinyağı İmalathanesi atık toprağından izole edilen yeni maya suşunun sırasıyla Genomik DNA izolasyon, PCR, PCR temizleme, Dizi analizi ve Filogenetik analizi RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne yaptırılarak tanımlandı. Analiz sonucunda yeni izole edilen maya örneği *Candida tropicalis* olarak tanımlandı (Şekil 4.1.).



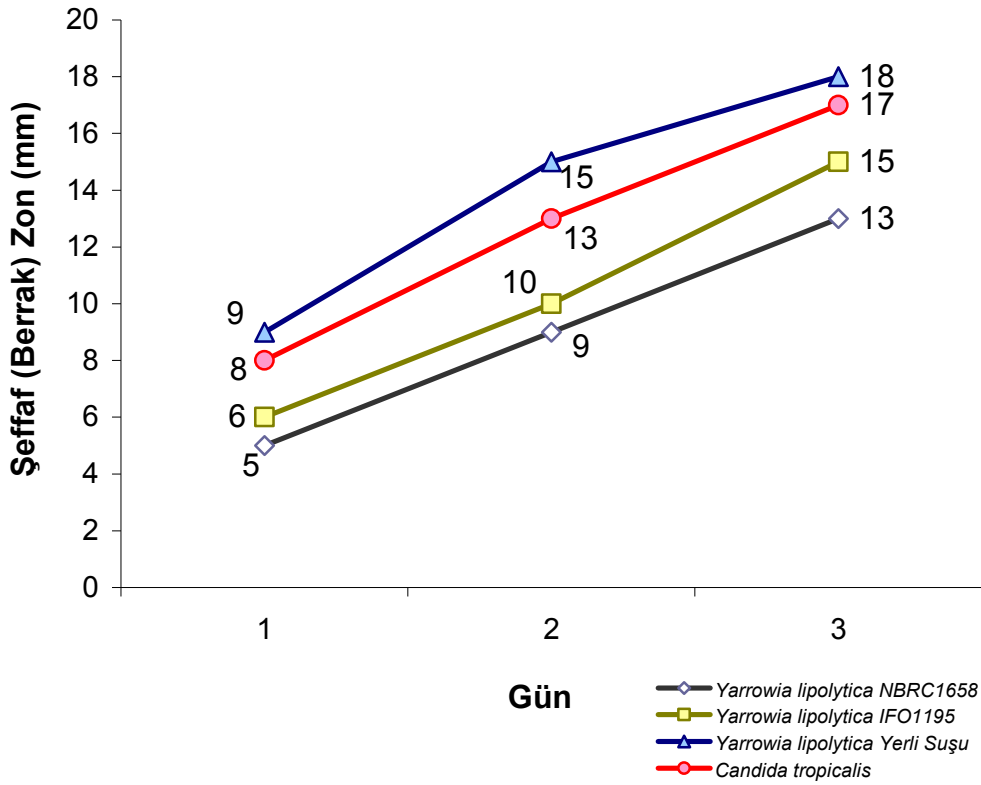
Şekil 4.1. Yeni izole edilen maya suşunun filogenetik analizi.

### 4.2. Mikroorganizmalarda Lipolitik Aktivite Tayini

#### 4.2.1. Tributirinli Agar besiyeriyle lipolitik aktivite tayini

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195 ve *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşunda lipolitik aktivite tespiti amacıyla Tributirinli Agar besiyerlerine ekilen örneklerin sonuçları alındı. Lipaz pozitif ise besiyerinde tributirinin parçalanmasına bağlı olarak berraklık oluşmakta negatif ise herhangi bir değişim gözlenmemektedir. Lipolitik aktivitenin değerlendirilmesinde berraklık derinliği 1. günden sonra ölçüldü ve 3. güne kadar devam edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195 ve *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşunda lipolitik aktivitenin varlığı saptandı (Şekil 4.2.).





Şekil 4.2. Tributirin Agarlı besiyerinde güne bağlı lipaz aktivitesi.

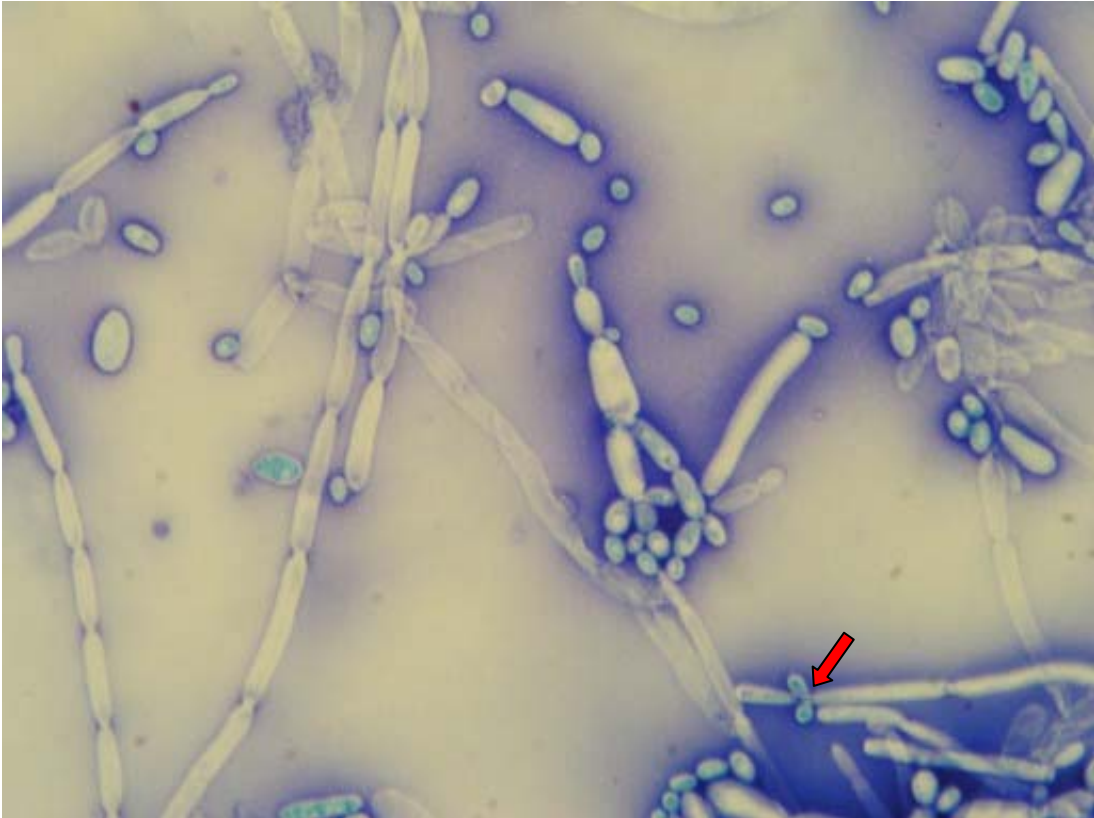
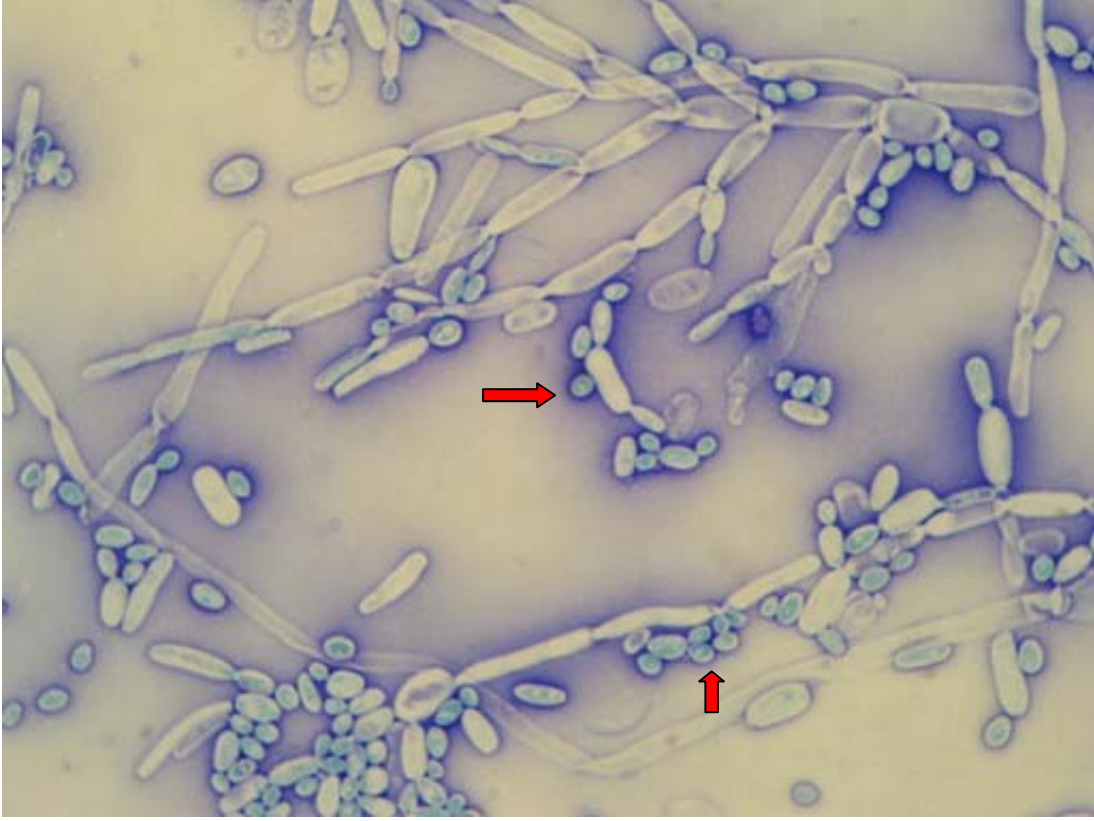
### 4.3. Mikroorganizmalarda Lipaz Aktivite Tayini

Mikroorganizmalarda lipaz aktivite tayininde titrasyon yöntemi kullanıldı. Kültür ortamı filtratının enzim kaynağı olarak kullanıldığı lipaz aktivite tayininde değerler formülde yerine konularak lipaz aktivite miktarı saptandı. 1 ünite lipaz aktivitesi uygun koşullar altında 1 µmol yağ asidini açığa çıkaran aktivite olarak tanımlandı.

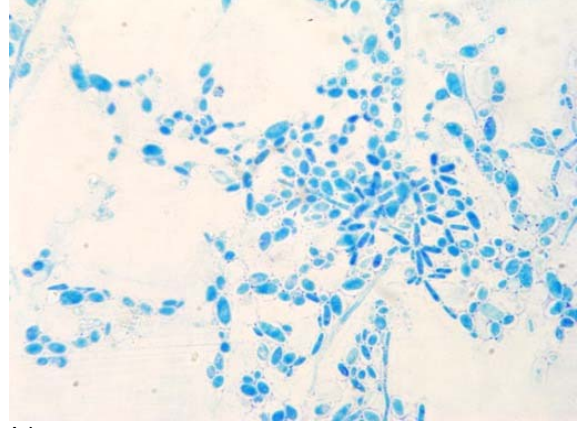
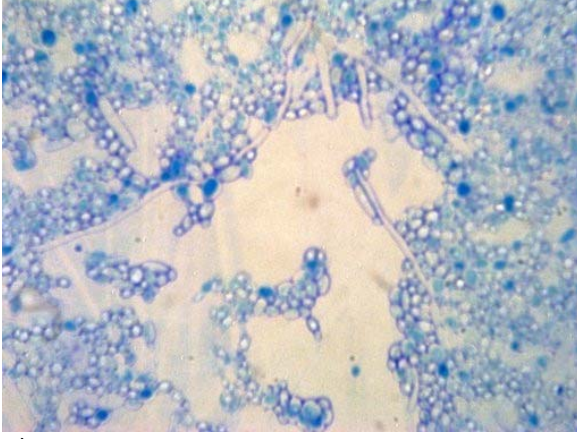
### 4.4. Maya Suşlarının Özellikleri

#### 4.4.1. Hücre morfolojisinin incelenmesi

*Yarrowia* suşlarının mikroskopik incelemesinde psöдохif oluşturdıkları gözlemlendi, ancak *Candida tropicalis* suşunda psöдохif görülmedi. Tipik maya hücresel yapısı saptandı. Özellikle YM agarda üreyen *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunun mikroskopik görüntüsünde gerçek hif ve askospor keseleri görüntülendi (Şekil 4.3.). *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda ise tipik maya hücreleri baskın olsa da psöдохifler gözlemlendi (Şekil 4.4.). *Yarrowia lipolytica* Yerli suşunda yine hif yapıları ve askospor keseleri ve bu keselerden bir tanesinin içinde 3 adet askospor tespit edildi (Şekil 4.5.). *Candida tropicalis* suşunda herhangi bir hifsel yapıya rastlanmadı (Şekil 4.6.).



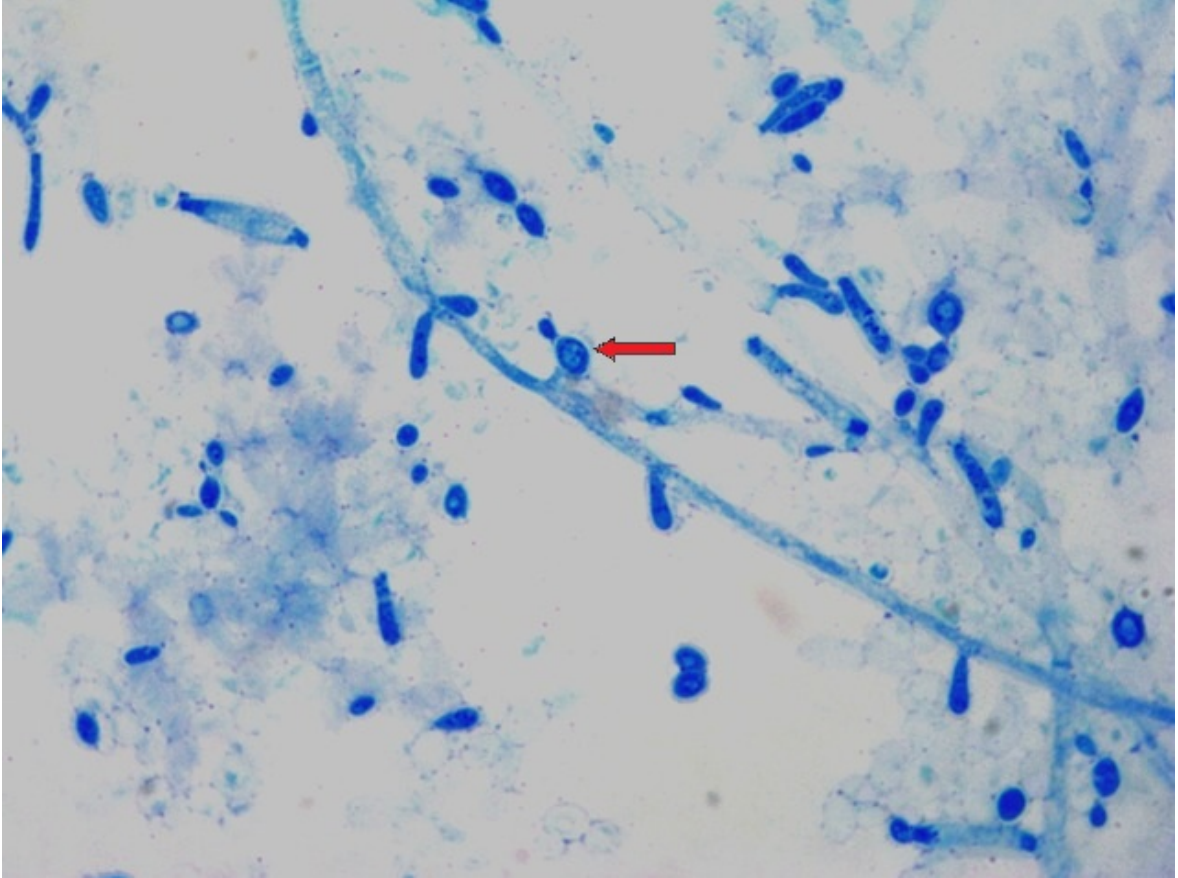
Şekil 4.3. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunun mikroskop görüntüleri (YM Agar) - [mikroskop 100x , fotoğraf makinesi 3x optik ve 3,4x digital zoom], oklar muhtemel askospor keselerini göstermektedir. © Özgür Kebabcı.



a)

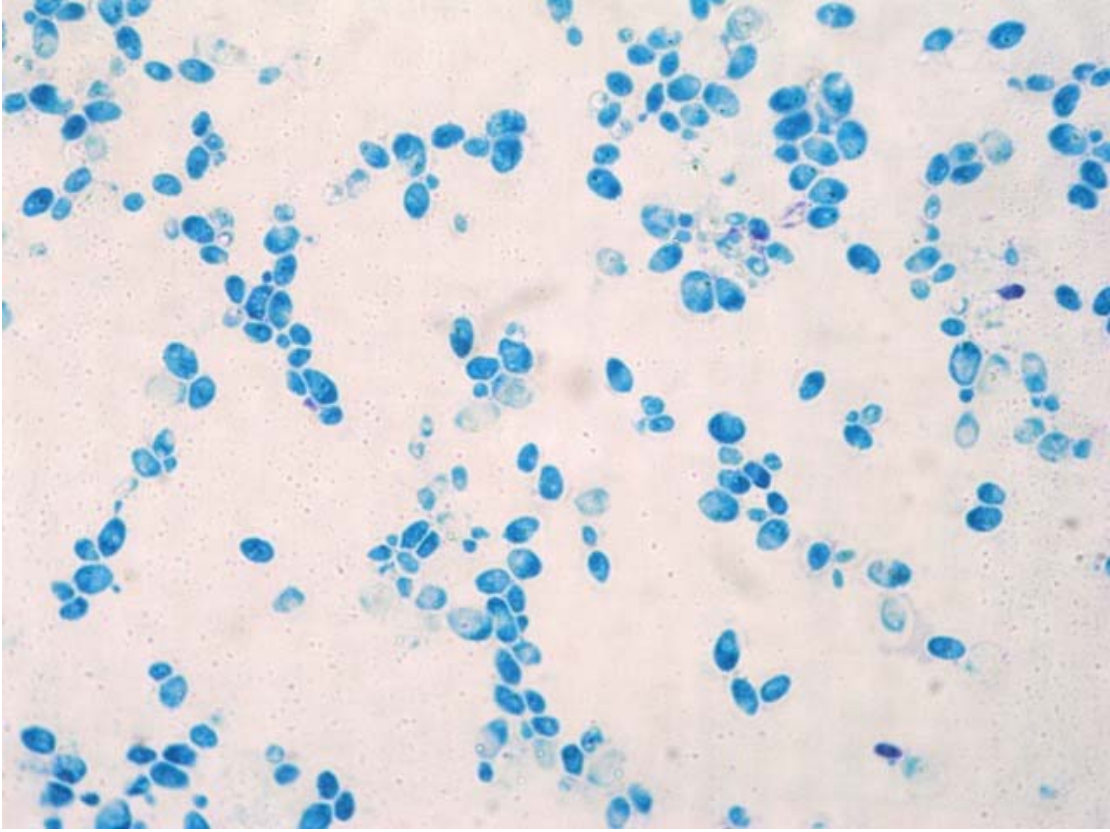
b)

Şekil 4.4. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunun mikroskop görüntüsü (a) YM Agarda ve b) YM Broth) - [mikroskop 100x , fotoğraf makinesi 3x optik ve 3,4x digital zoom]. © Özgür Kebabcı.



Şekil 4.5. *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunun mikroskop görüntüsü (YM Broth) - [mikroskop 100x , fotoğraf makinesi 3x optik ve 3,4x digital zoom]. Kırmızı ok muhtemel askospor kesesini ve içinde 3 adet askosporu göstermektedir. © Özgür Kebabcı.





Şekil 4.6. *Candida tropicalis* suşunun mikroskop görüntüsü (YM Broth ) - [mikroskop 100x , fotoğraf makinesi 3x optik ve 3,4x digital zoom]. © Özgür Kebabcı.

#### 4.4.2. Koloni morfolojisinin incelenmesi

*Candida tropicalis* ve *Yarrowia* suşlarının koloni morfolojilerinin incelenmesi amacıyla petri plaklarına YM Agar besiyerleri hazırlandı. Her maya örneği tek koloni ekim yöntemiyle YM Agar besiyerlerine ekildi ve 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oluşan tek koloniler koloni mikroskopunda incelenerek koloni morfolojileri saptandı (Şekil 4.7.).

*Yarrowia* suşlarında özellikle de NBRC 1658 suşunda R tipi koloniler gözlemlendi (Şekil 4.7., a). *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 ve Yerli Suşunda ise yer yer R tipi kolonilerin oluştuğu saptandı (Şekil 4.7., b ve c). *Candida tropicalis* suşunda ise S tipi koloniler görüldü (Şekil 4.7. d).



a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunun YM Agarda tek koloni üretimi ve koloni morfolojisi



b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunun YM Agarda tek koloni üretimi ve koloni morfolojisi



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunun YM Agarda tek koloni üretimi ve koloni morfolojisi



d) *Candida tropicalis* suşunun YM Agarda tek koloni üretimi ve koloni morfolojisi

Şekil 4.7. YM Agar'da üretilen mayaların koloni morfolojileri.

© Özgür Kebabcı.

#### 4.4.3. Maya suşlarının biyokimyasal testleri

##### 4.4.3.1. Katalaz aktivitesinin tayini

Maya suşları Sabouraud Dekstroz Broth besiyerinde 150 rpm döngüsel hızda 30<sup>0</sup>C'de 48 saat inkübe edildikten sonra 1 ml %3'lük hidrojen peroksit ile katalitik aktiviteleri araştırıldı. Tüm maya suşlarının katalaz aktivitesine sahip olduğu saptandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Yarrowia* suşları ve *Candia tropicalis* suşunun katalaz aktivitesi

	<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 1658	<i>Yarrowia lipolytica</i> IFO 1195	<i>Yarrowia lipolytica</i> Yerli Suşu	<i>Candida tropicalis</i>
Katalaz	+	+	+	+

(+ olumlu, - olumsuz)

##### 4.4.3.2. Nitrati nitrite dönüştürme özelliği

Mayaların metabolizması sonucu ortamda nitrit varlığını incelemek amacıyla sülfanilik asit çözeltisi ve  $\alpha$ -Naftilamin çözeltisi hazırlandı. İnkübasyon sonrasında kültür ortamına öncelikle 1 ml sülfanilik asit çözeltisi damlatıldı. Ardından 1 ml  $\alpha$ -Naftilamin çözeltisi eklenerek renk oluşumuna göre sonuç alındı. Sonuçta tüm maya suşlarının nitrati redükte edemediği saptandı (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. *Yarrowia* suşları ve *Candida tropicalis* suşunun nitrat redüksiyon tayini.

	<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 1658	<i>Yarrowia lipolytica</i> IFO 1195	<i>Yarrowia lipolytica</i> Yerli Suşu	<i>Candida tropicalis</i>
Nitrat Redüksiyonu	-	-	-	-

#### 4.4.3.3. Amilolitik aktivite tayini

Amilolitik aktivite tayini için petri kaplarına nişastalı katı besiyerlerinde ayrı ayrı 48 saat 30°C'de inkübe edilen maya suşlarına üreme sonrasında ortama lügol ayırıcı eklendi ve sonuca göre yorumlandı. Tüm maya suşlarında nişasta hidrolizi negatif olarak saptandı (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. *Yarrowia* suşları ve *Candida tropicalis* suşunun nişasta hidrolizi.

	<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 1658	<i>Yarrowia lipolytica</i> IFO 1195	<i>Yarrowia lipolytica</i> Yerli Suşu	<i>Candida tropicalis</i>
Nişasta Hidrolizi	-	-	-	-

(+ olumlu, - olumsuz)

#### 4.4.3.4. Üreaz tayini

Mayaların üreaz aktivitesinin incelenmesi amacıyla üreli besiyerine ekimi yapılan örneklerin 30°C'de 48 saat inkübasyonu sonrasında indikatör madde olan fenol kırmızısındaki renk değişimine göre sonuç yorumlandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195 ve Yerli Suşu ile *Candida tropicalis* suşlarında üreaz aktivitesinin pozitif olduğu saptandı. (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. *Yarrowia* suşları ve *Candida tropicalis* suşunun üreaz tayini.

	<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 1658	<i>Yarrowia lipolytica</i> IFO 1195	<i>Yarrowia lipolytica</i> Yerli Suşu	<i>Candida tropicalis</i>
Üreaz	+	+	+	+

(+ olumlu, - olumsuz)

## 4.5. Mayaların Üretim Koşullarının Optimizasyonu

### 4.5.1. Üretim ortamı

Lipaz üretim ortamı olarak Hatzinikolaou ve ark, 1996, tarafından önerilen besiyeri hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak ayrı ayrı %1 riviera zeytinyağı ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1 ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında gerçekleştirildi.

### 4.5.2. Aşılama ve kültürasyon

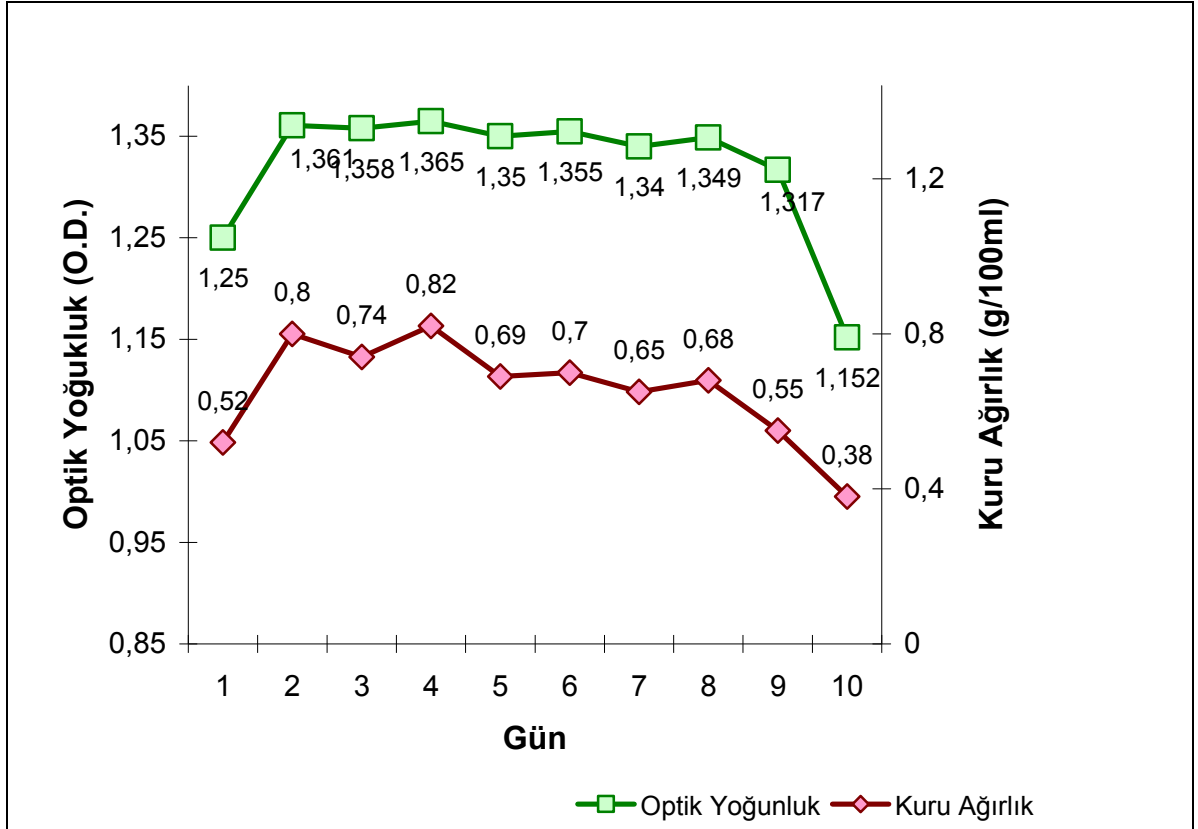
*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* sıvı stok kültürleri 150 ml'lik erlenmeyerlerde 50 ml üretim ortamı olacak biçimde hazırlandı. Besiyeri ortamı olarak Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) besiyeri seçildi.

### 4.5.3. Üreme eğrisi

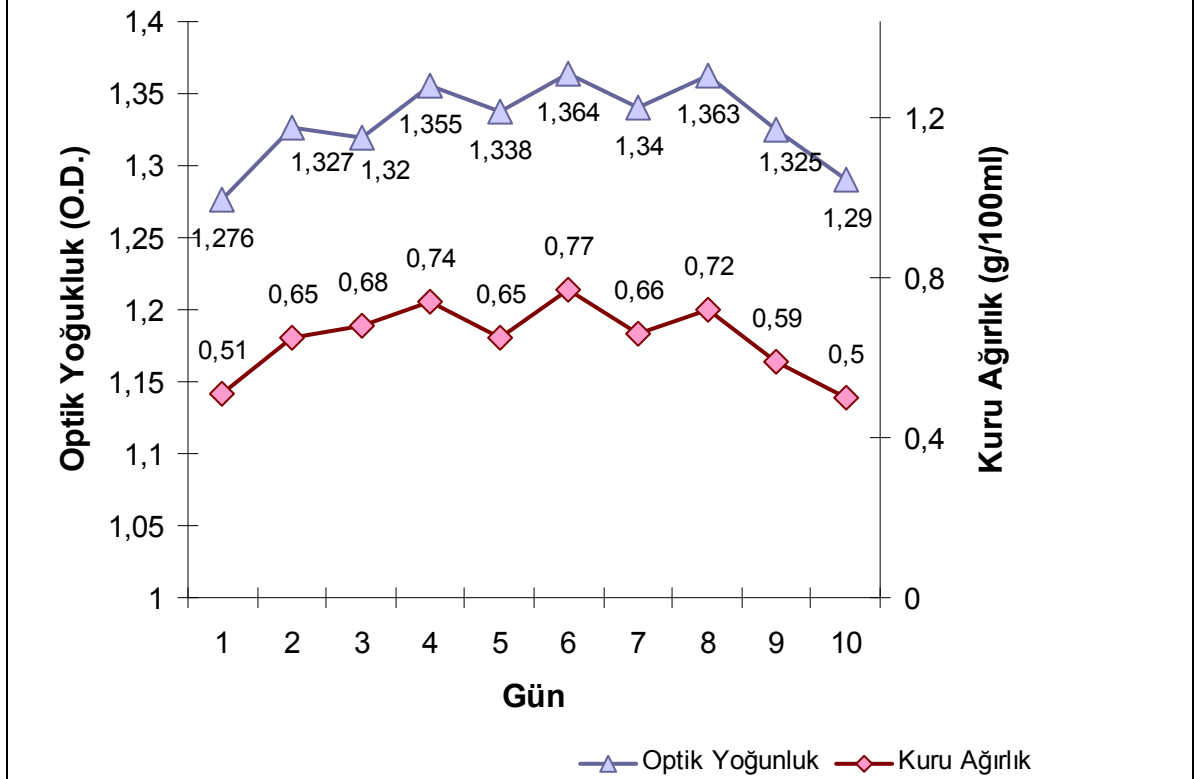
Sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* kültürlerinde 1-10 gün aralığında gerçekleştirildi. Üretim sonrasında spektrofotometrede örneklerin optik dansiteleri hesaplandı ve örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerde mayaların kuru ağırlığı saptanarak tüm suşların üreme eğrileri saptandı.

Tüm suşların üreme eğrisi grafiğinde 2. güne kadar log fazı saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda 2. - 9. güne kadar üremenin durağan olduğu, 10. günde ölüm fazına girdiği saptandı. *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda 2. günden 8. güne kadar durgunluk fazı ve 9. – 10. günlerde ise ölüm fazı saptandı. *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 2 - 9. günlerde durgunluk fazı ve 10. günde ölüm fazı tespit edildi. *Candida tropicalis* suşunda yine 1. günden sonra durgunluk fazına giren mayanın 8. günden sonra ise ölüm fazında girdiği tespit edildi (Şekil 4.8.).



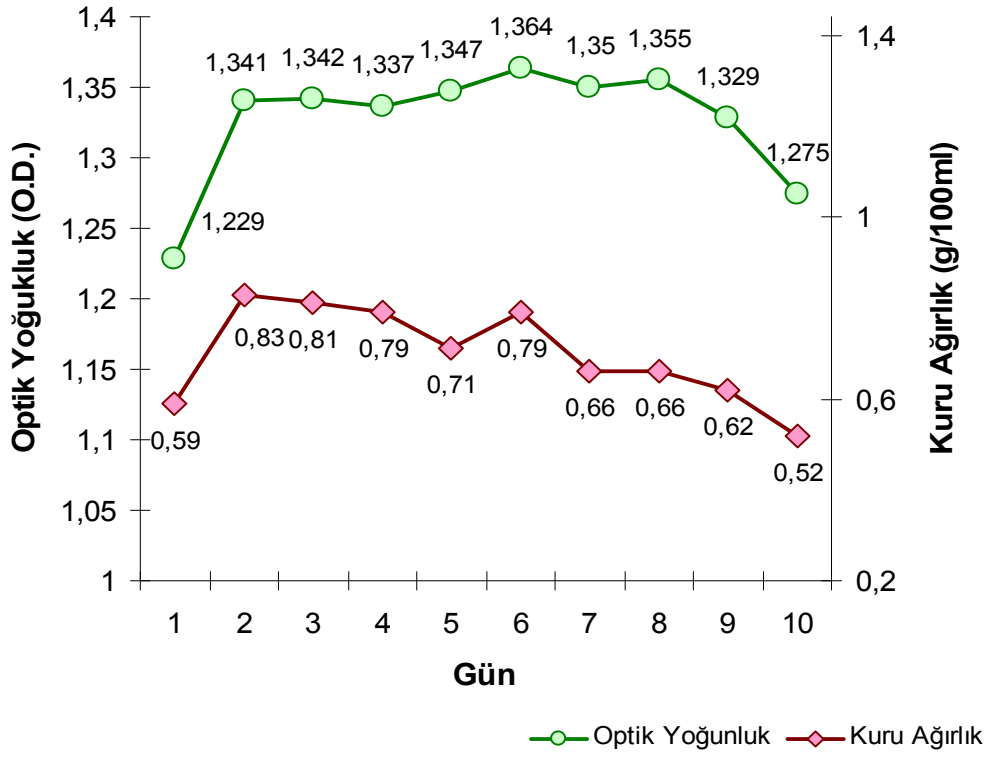


a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunun üreme eğrisi.

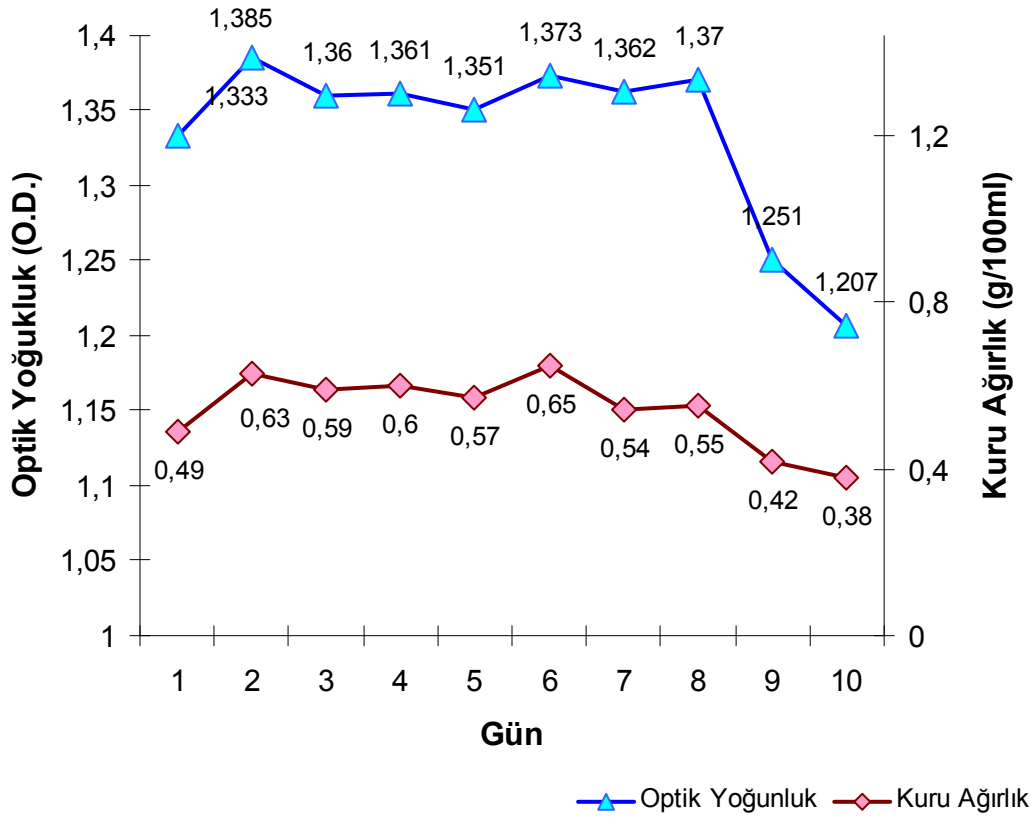


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunun üreme eğrisi.

Şekil 4.8. *Candida tropicalis* ve *Yarrowia* suşlarının üreme eğrileri.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nun üreme eğrisi.



d) *Candida tropicalis* suşunun üreme eğrisi.

Şekil 4.8. Devamı... *Candida tropicalis* ve *Yarrowia* suşlarının üreme eğrileri.

#### 4.5.4. Hücre sayımı

Seyreltmi yapılan tüm maya suşlarından 1'er ml alınarak petride hazırlanmış PDA besiyerlerine yayma yöntemiyle ekildi ve statik etüvde 30<sup>0</sup>C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan koloniler sayılarak ana stok kültürlerdeki hücre sayıları tespit edildi (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Sıvı stok kültürlerdeki hücre sayıları

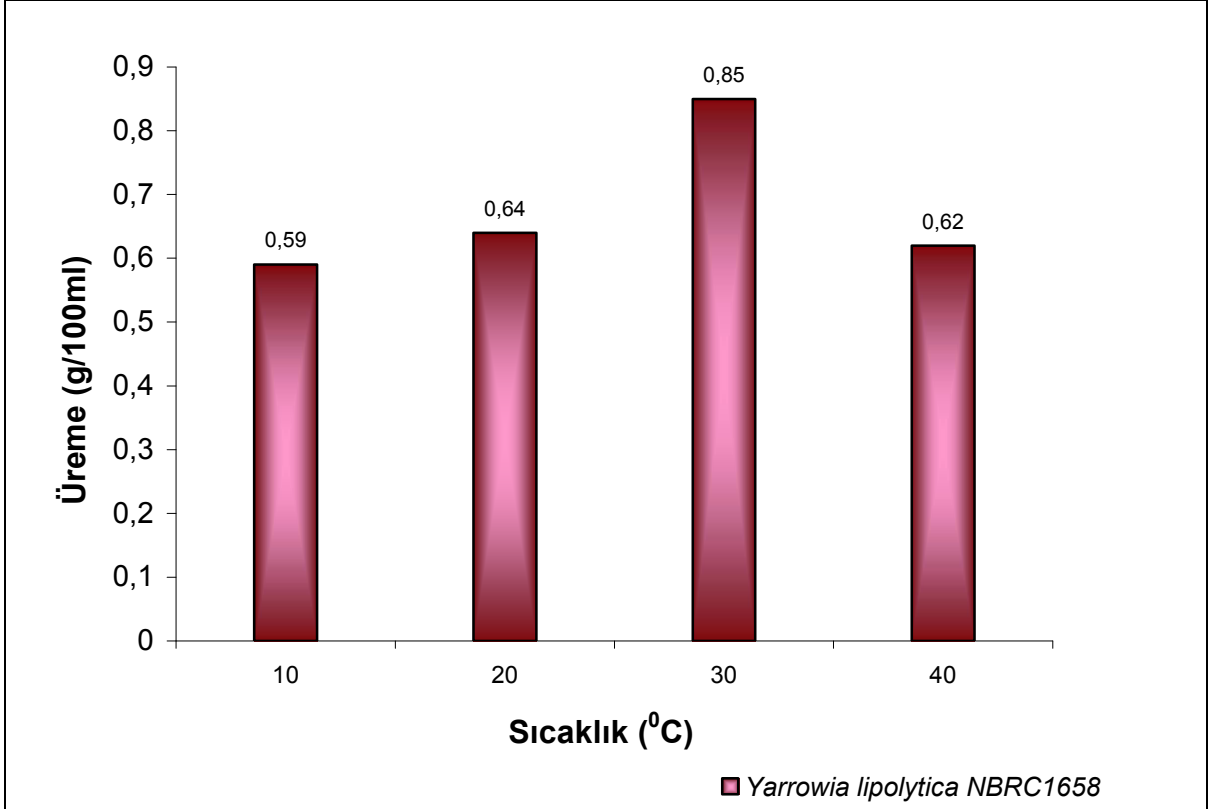
Mayalar	Hücre sayıları / 1 ml
<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC 1658	1,01 x 10 <sup>9</sup>
<i>Yarrowia lipolytica</i> IFO 1195	1,92 x 10 <sup>10</sup>
<i>Yarrowia lipolytica</i> Yerli Suşu	5,32 x 10 <sup>10</sup>
<i>Candia tropicalis</i>	8,50 x 10 <sup>9</sup>

Lipaz üretim besiyerlerine eşit miktarda ekim yapılabilmesi için *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşu 2x10<sup>-1</sup> , *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu 5x10<sup>-1</sup> ve yeni izole maya suşu ise 1/8 oranında steril d.su ile seyreltilerek kullanıldı.

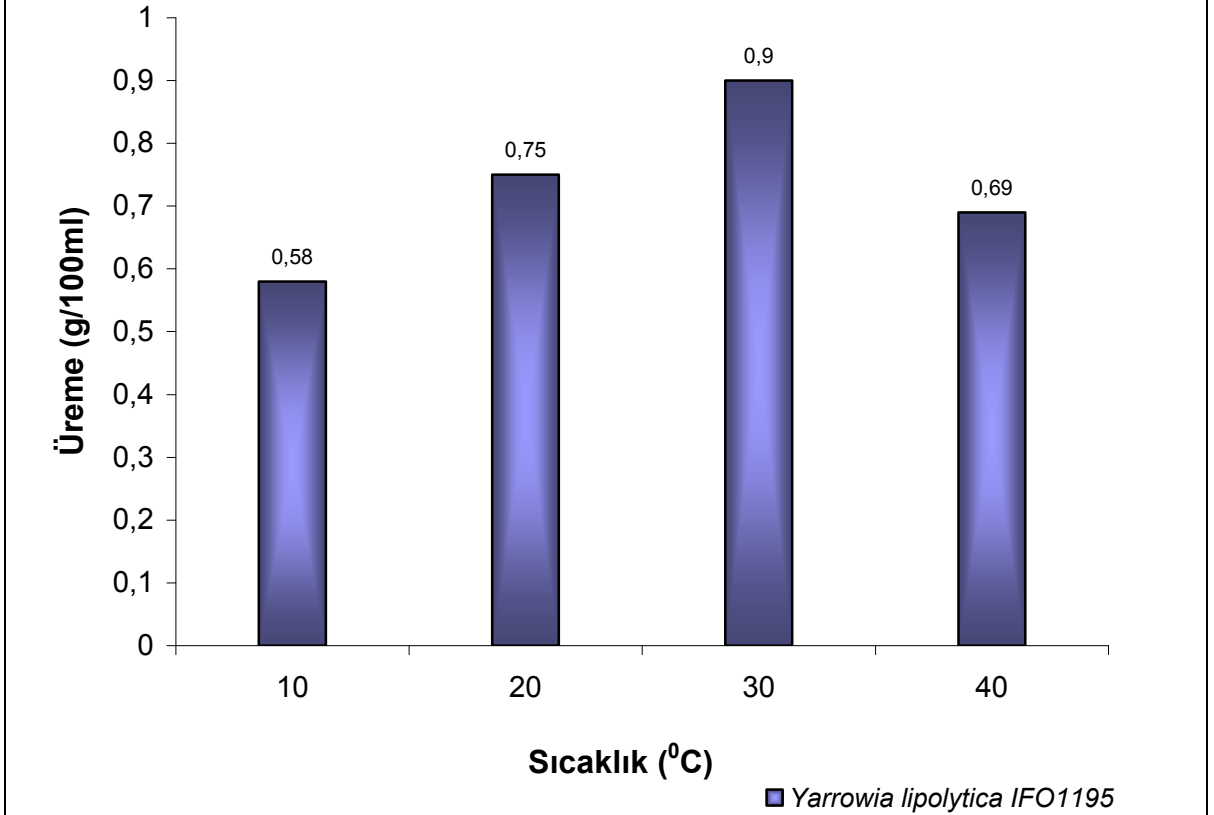
#### 4.5.5. Üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi

Sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candia tropicalis* kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon ayrı ayrı 10 - 40<sup>0</sup>C aralığında 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerde mayaların kuru ağırlığı saptandı (Şekil 4.9.).

Sonuç olarak en fazla üreme *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda 0,85 g/100ml, IFO 1195 suşunda 0,9 g/100ml, Yerli Suşunda 0,82 g/100ml ve *Candida tropicalis* suşunda 0,72 g/100ml olarak 30<sup>0</sup>C'de gözlemlendi. Ancak psikrofilik mikroorganizmalar olarak bilinen *Yarrowia* suşlarının 10 ve 20<sup>0</sup>C'lerde de iyi ürediği bununla birlikte 40<sup>0</sup>C'de üremenin 30<sup>0</sup>C'ye oranla azaldığı saptandı.

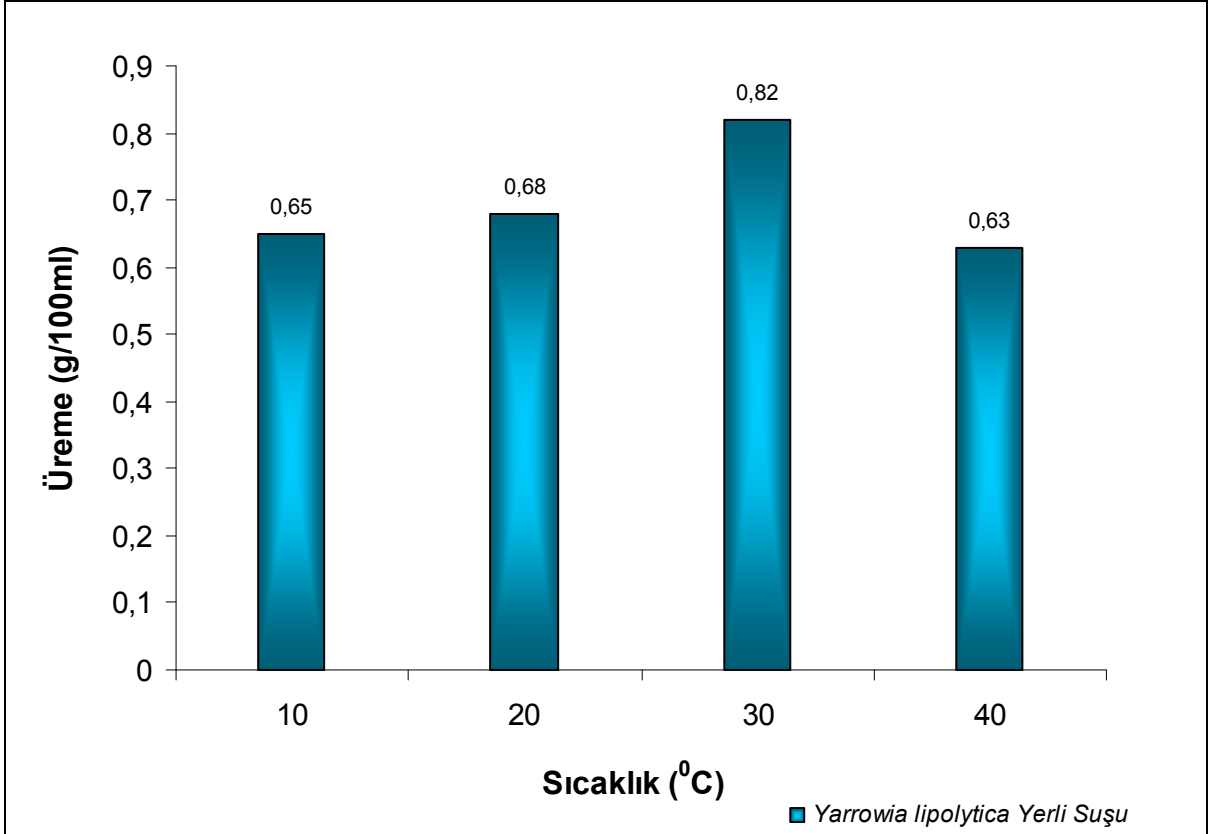


a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi.

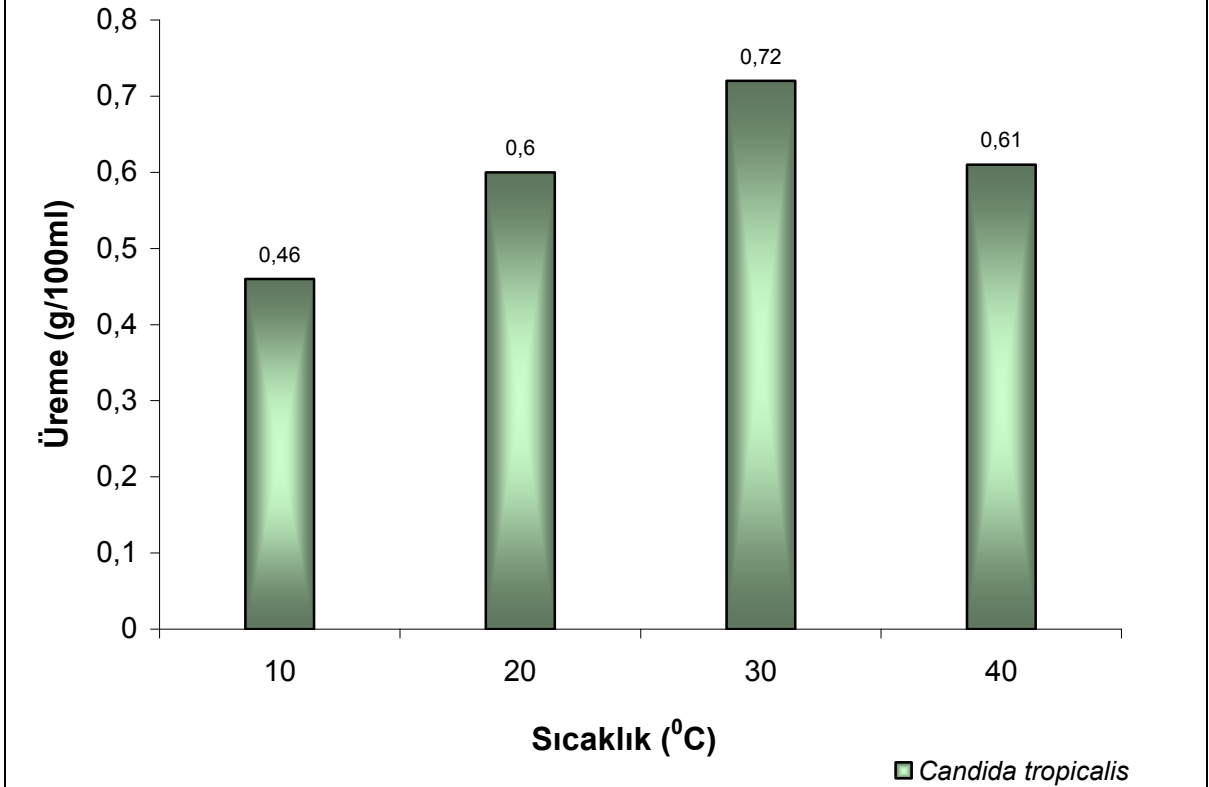


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi.

Şekil 4.9. Üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi.



d) *Candida tropicalis* suşunda üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi.

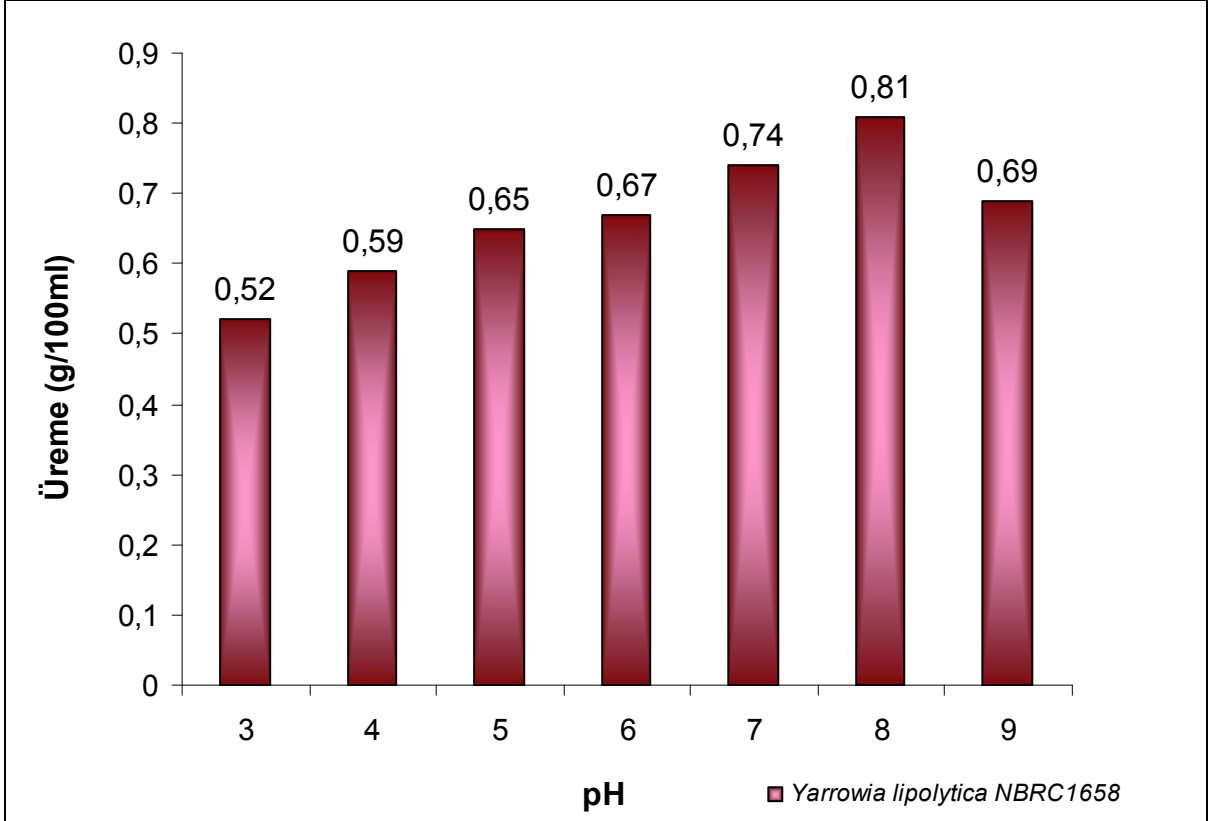
Şekil 4.9. Devamı... Üretim ortamı sıcaklığının üremeye etkisi.

#### 4.5.6. Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi

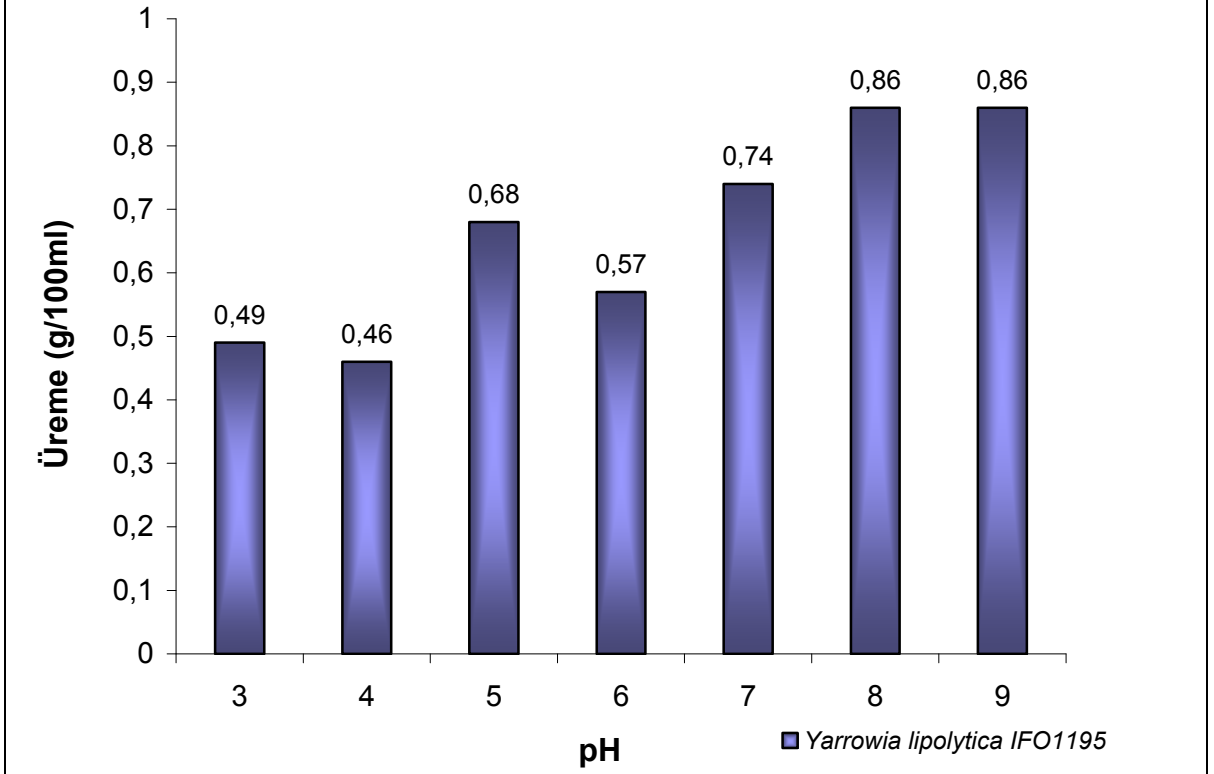
Sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapılarak inkübasyon 3 - 9 pH aralığında 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30°C'de 48 saat kurutulan Whatman no:1 kağıtlarından ise mayaların kuru ağırlığı araştırıldı. Elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.10.).

Üretim ortamının pH'sının üremeye etkisi incelendiğinde *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek üreme 0,81 g/100ml olarak pH 8'de saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda pH 3 - 6 aralığında daha az üreme gerçekleşirken pH 6'den sonra üremenin arttığı tespit edildi. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda pH 7 - 9 aralığında yüksek üreme gözlenirken pH 3 - 6 aralığında ise nispeten daha az üreme gözlemlendi. En yüksek üremeye bu suşta pH 8 ve 9'da rastlandı. *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda en yüksek üreme pH 7'de saptandı. *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda pH 3 - 6 aralığında üremenin pH artışına bağlı olarak arttığı tespit edildi, pH 8'de yine ciddi bir üreme gözlenirken pH 9'da üremenin azaldığı tespit edildi. *Candida tropicalis* suşunda ise *Yarrowia* suşlarından farklı olarak asidik pH'larda ciddi üreme gözlemlendi. Optimum pH aralığı 4 - 6 olarak saptandı ve pH 7 - 9 aralığında ise üremenin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.10.).

*Yarrowia* suşlarının asidik ortamlarda daha fazla ürediği bilinen diğer fungal suşlara göre nötral ve bazik pH'larda daha iyi ürediği tespit edildi. *Candida tropicalis* suşunda ise asidik pH'larda daha fazla üreme gözlemlendi.

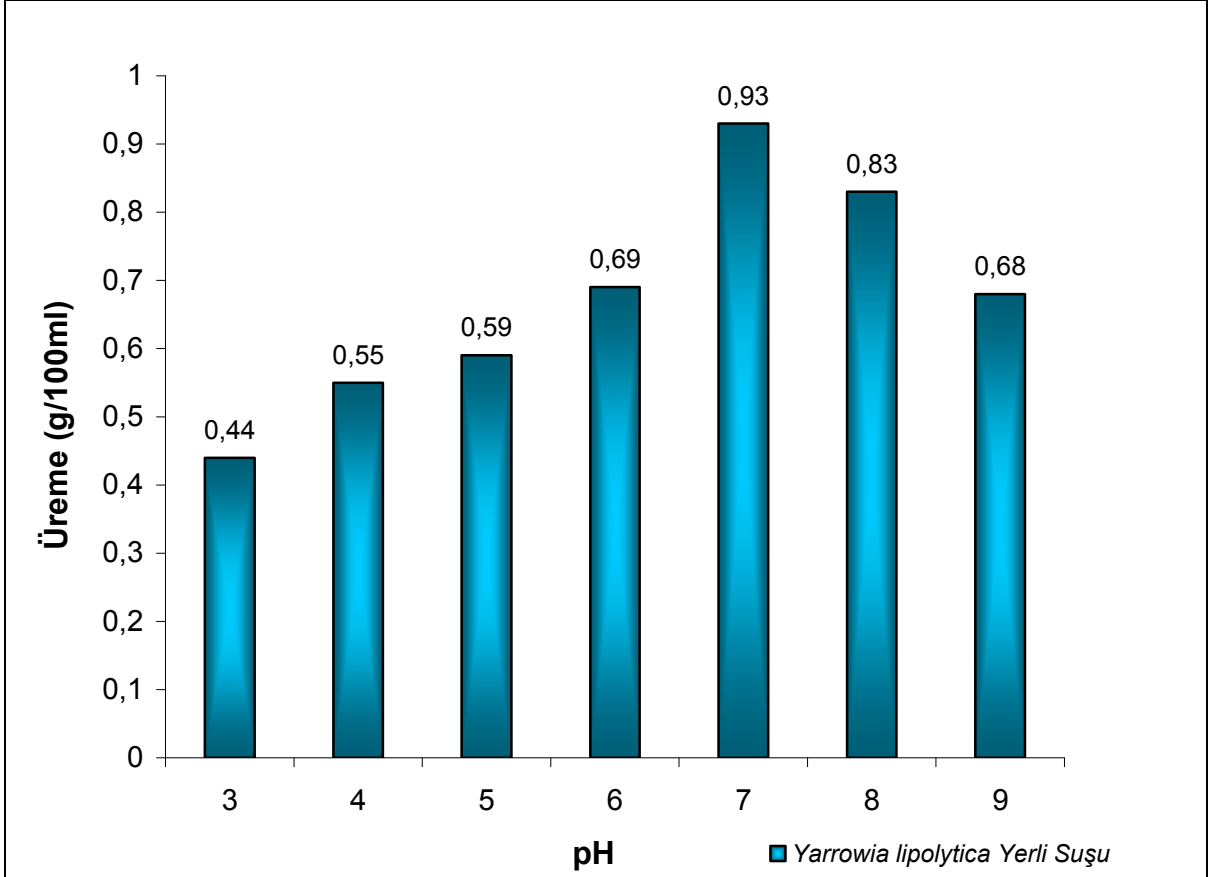


a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi.

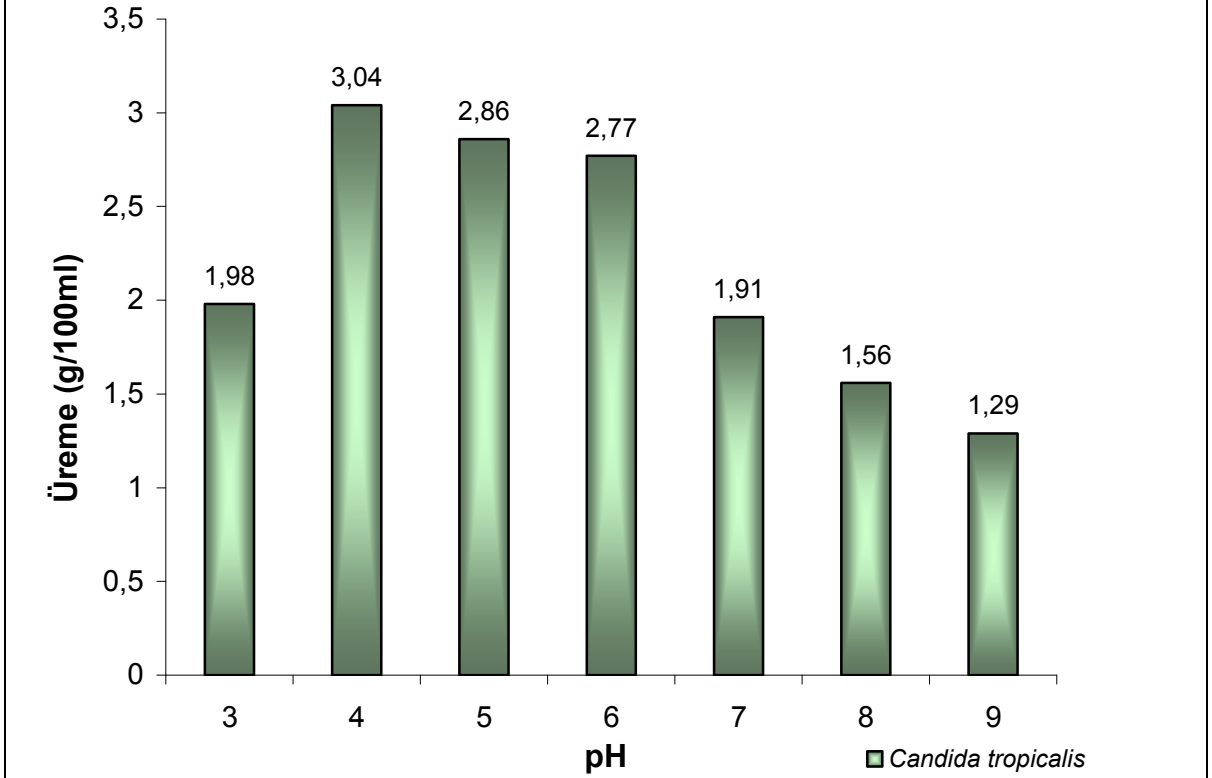


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi.

Şekil 4.10. Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi.



d) *Candida tropicalis* suşunda üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi.

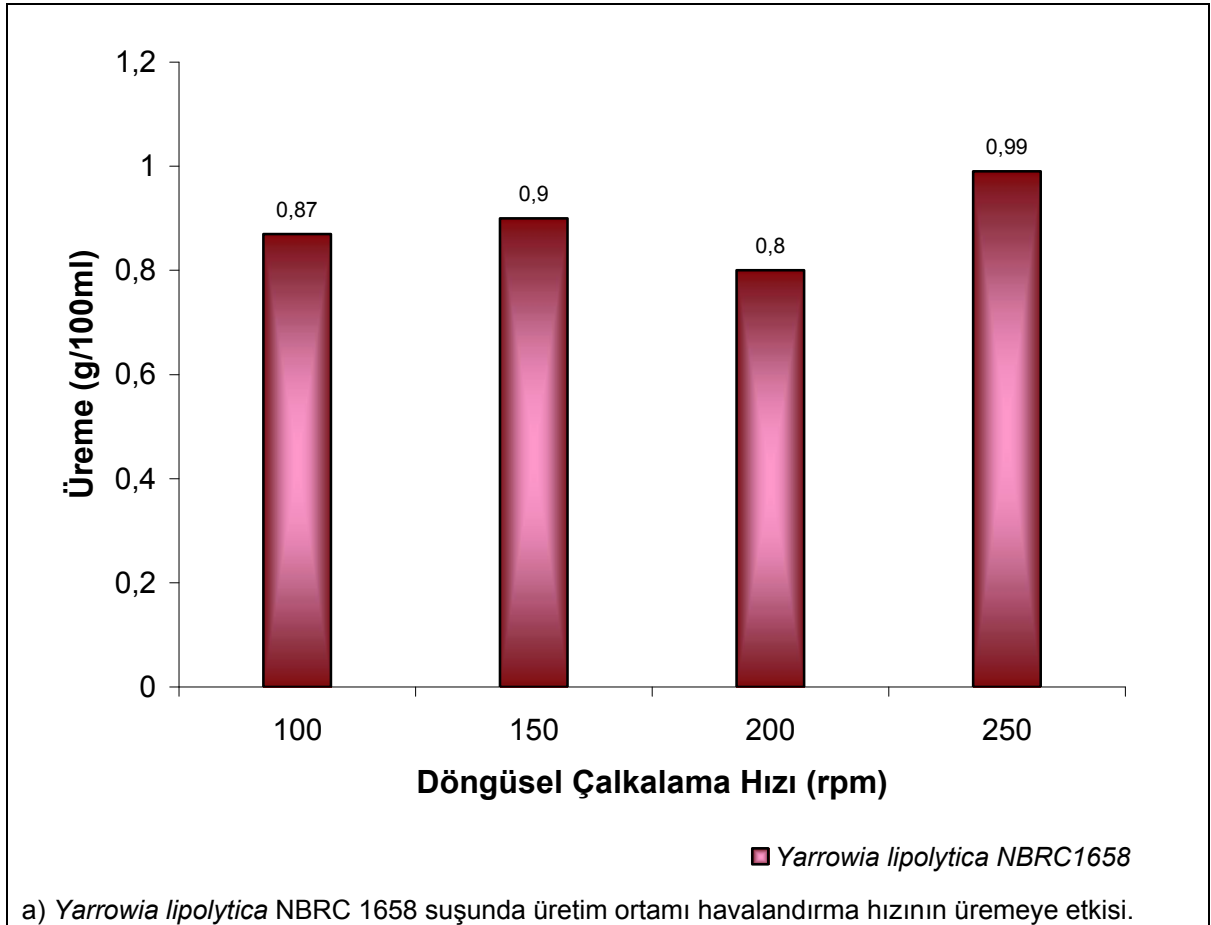
Şekil 4.10. Devamı... Üretim ortamı pH'sının üremeye etkisi.



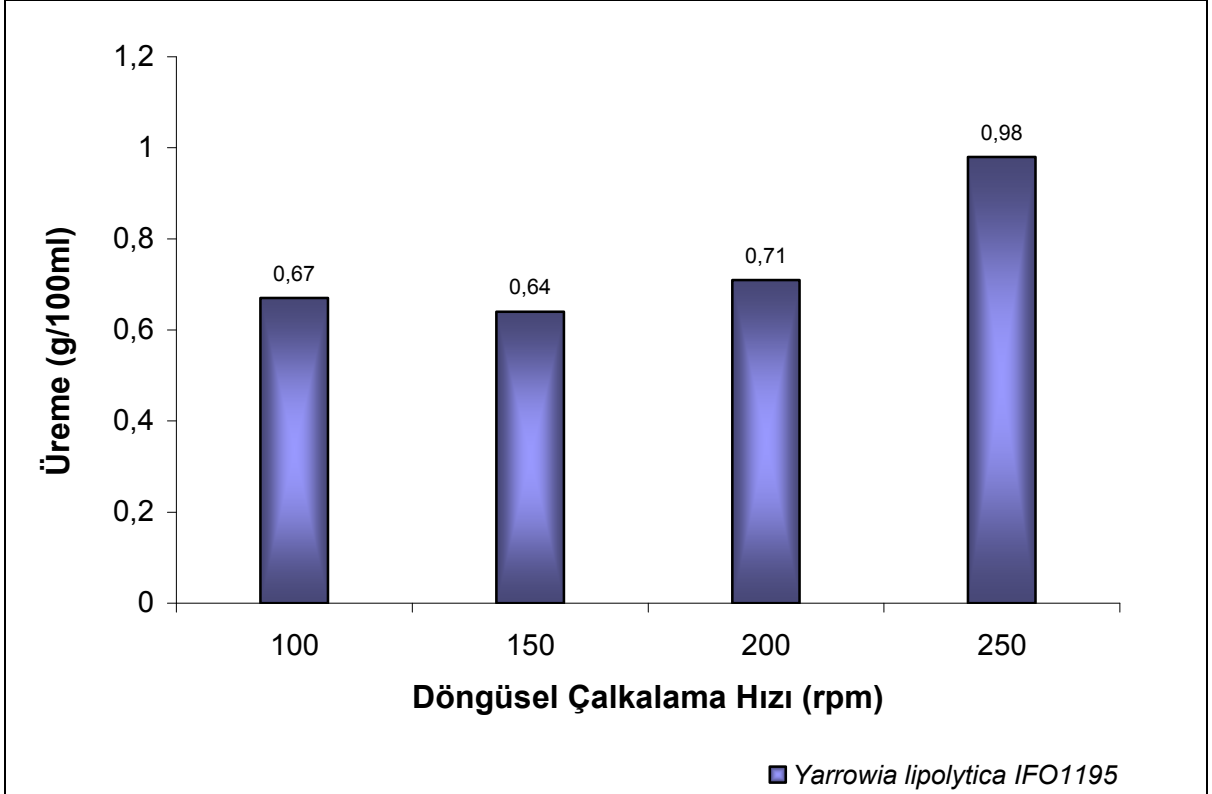
#### 4.5.7. Üretim ortamı havalandırma hızının üremeye etkisi

Sıvı *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 , *Y. lipolytica* NBRC 1658 , *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30°C'de 100 - 250 rpm aralığında döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30°C'de 48 saat kurutulan örneklerin kuru ağırlıkları hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.11.).

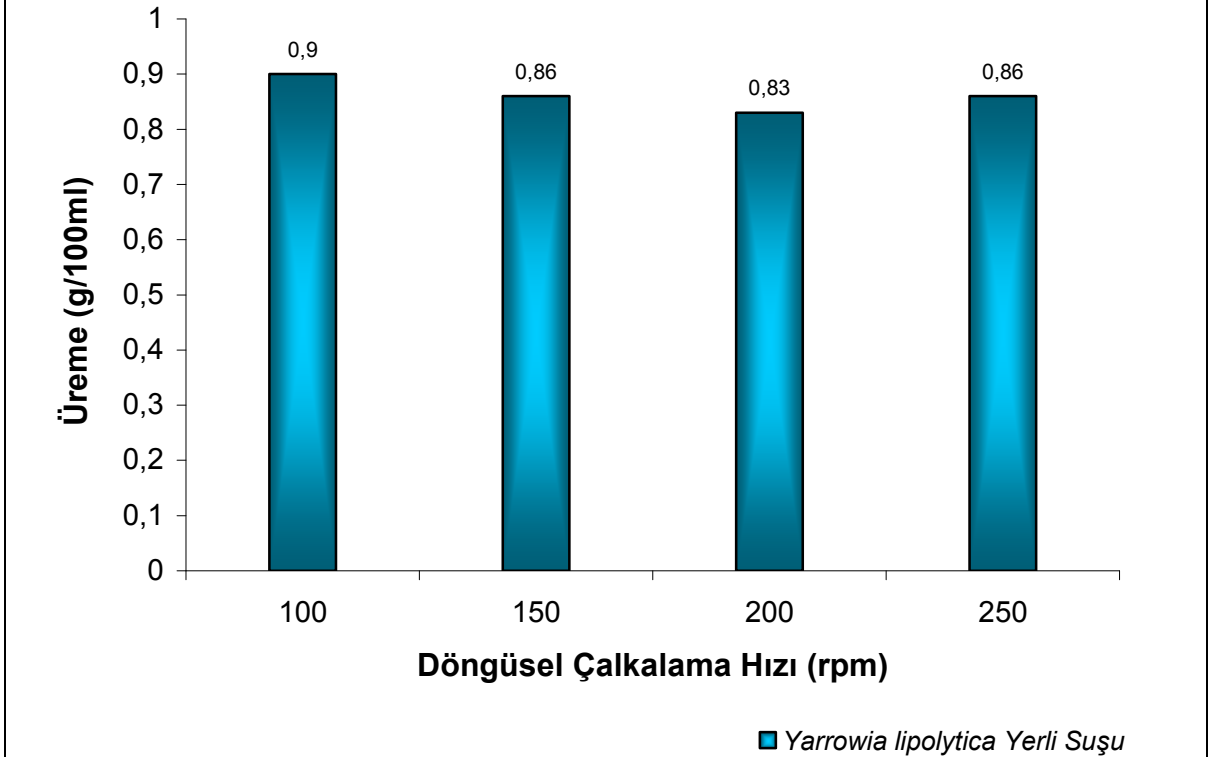
*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşunda 100 - 250 rpm döngüsel çalkalama hızında iyi üreme gözlemlendi. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda ise 100 - 200 rpm döngüsel çalkalama hızında üreme kısmen az olsa da en yüksek üreme 250 rpm'de saptandı (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Üretim ortamı aerasyon hızının üremeye etkisi.

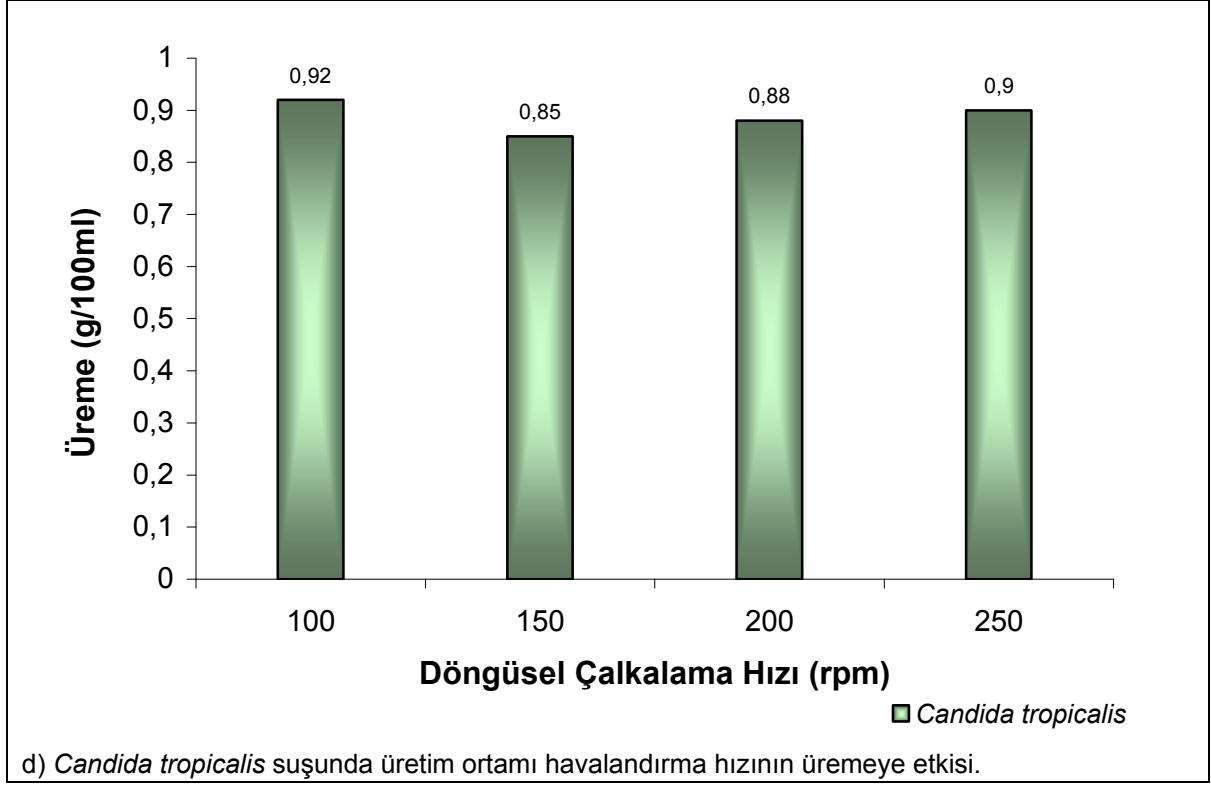


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda üretim ortamı havalandırma hızının üremeye etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda üretim ortamı havalandırma hızının üremeye etkisi.

Şekil 4.11. Devamı... Üretim ortamı aerasyon hızının üremeye etkisi.

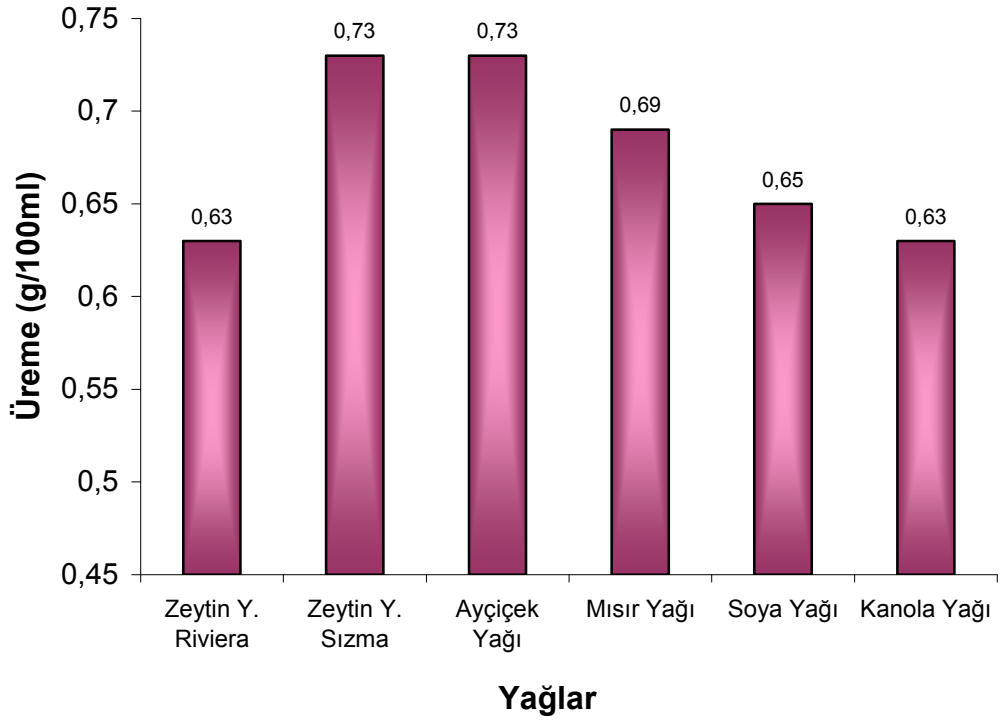


Şekil 4.11. Devamı... Üretim ortamı aerasyon hızının üremeye etkisi.

#### 4.5.8. Karbon kaynağının üremeye etkisi

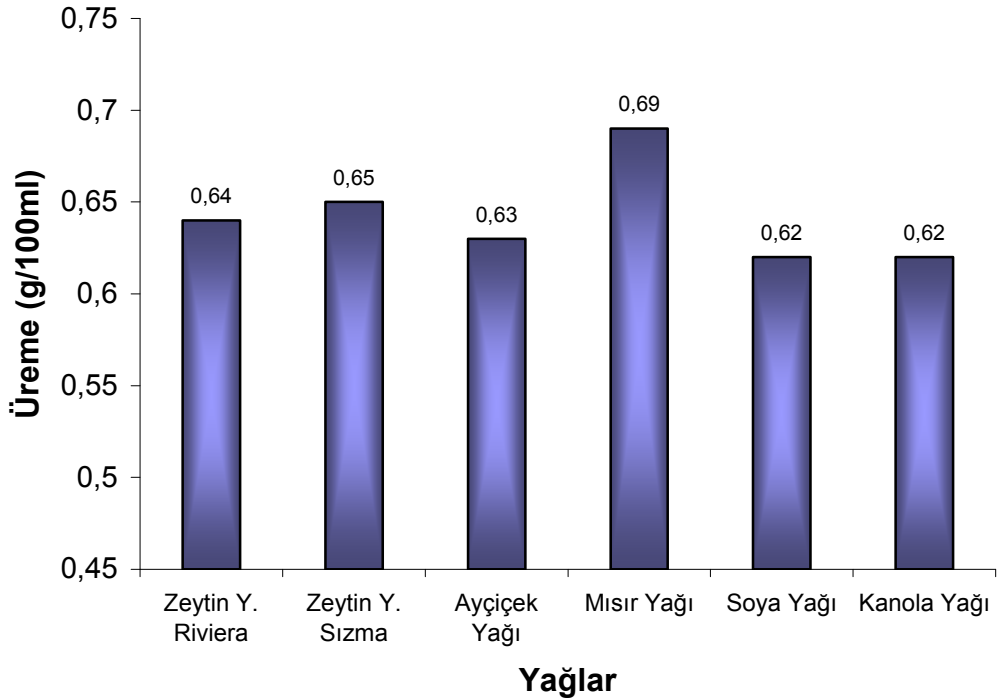
Farklı karbon kaynaklarının lipaz üretimine ve üremeye etkisini araştırmak amacıyla farklı karbon kaynakları içeren lipaz üretim besiyeri hazırlandı.

Öncelikle karbon kaynağı olarak farklı yağların lipaz üretimine ve üremeye etkisi araştırıldı. Her bir besiyerine karbon kaynağı olarak ayrı ayrı %1 riviera zeytinyağı, %1 sızma zeytinyağı, %1 ayçiçek yağı, %1 mısır yağı, %1 soya yağı ve %1 kanola yağı ilave edildi. Daha sonra *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* üretimi sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerin kuru ağırlıkları hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi. En yüksek üreme *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda sızma zeytin yağı (0,73 g/100ml) ve ayçiçek yağında (0,73 g/100ml), *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda mısır yağında (0,69 g/100ml), *Y. lipolytica* Yerli Suşunda riviera zeytin yağında (0,67 g/100ml) ve *Candida tropicalis* suşunda ayçiçek yağında (0,72 g/100ml) saptandı (Şekil 4.12.).



■ *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658

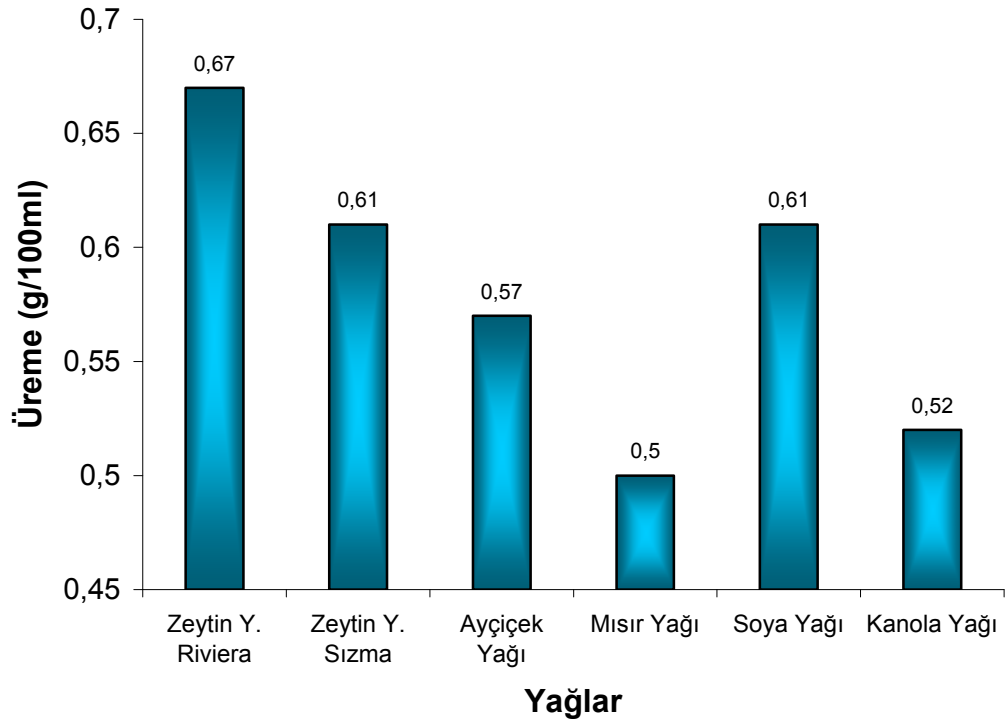
a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı yağların üremeye etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* IFO 1195

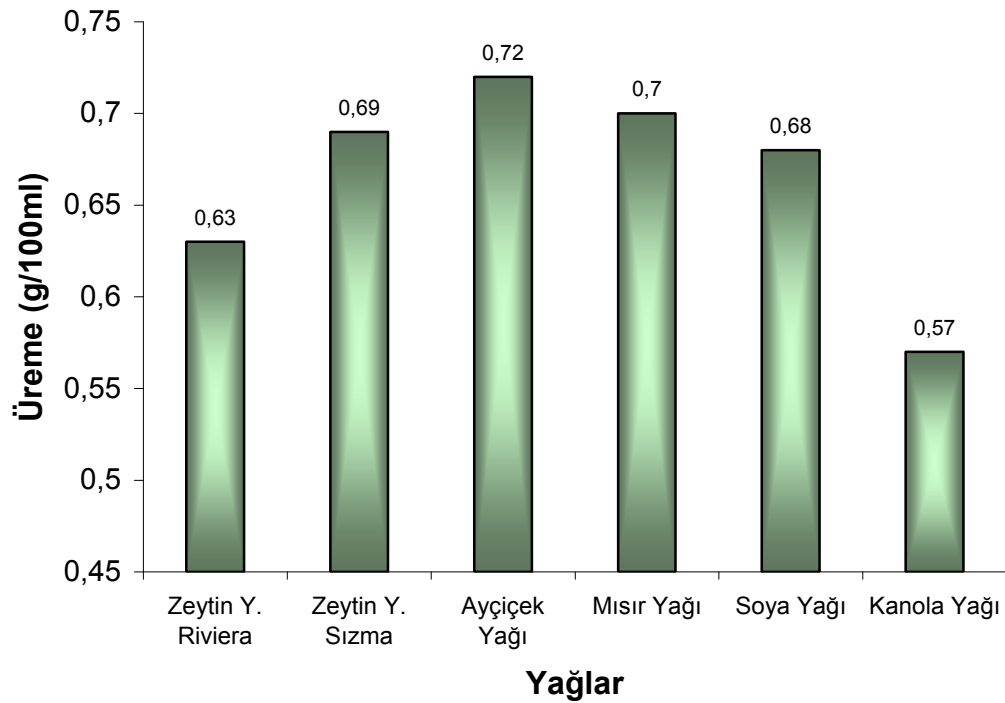
b) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı yağların üremeye etkisi.

Şekil 4.12. Farklı yağların üremeye etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu

c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda farklı yağların üremeye etkisi.



■ *Candida tropicalis*

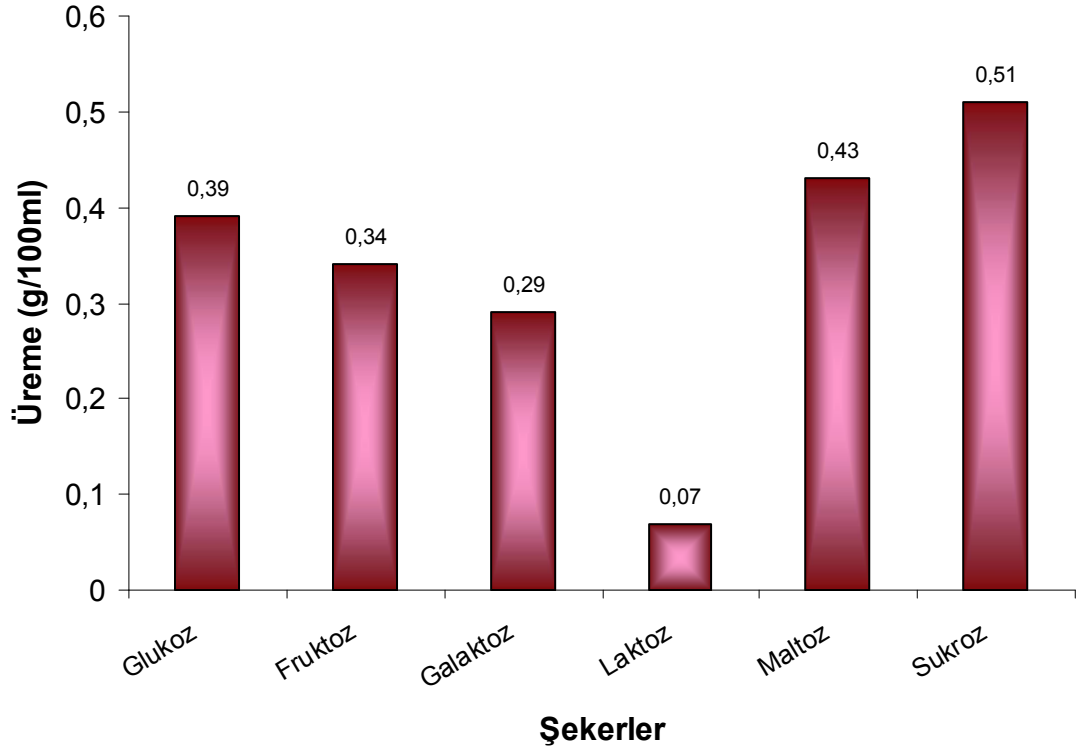
d) *Candida tropicalis* suşunda farklı yağların üremeye etkisi.

Şekil 4.12. Devamı... Farklı yağların üremeye etkisi.

Daha sonra karbon kaynağı olarak şekerlerin lipaz üretimine etkisi araştırıldı ve her bir besiyerine karbon kaynağı olarak ayrı ayrı %1 glukoz, %1 galaktoz, %1 fruktoz, %1 laktoz, %1 maltoz ve %1 sukroz ilave edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* 'in üretimi sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü. 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerin kuru ağırlıkları hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.13.).

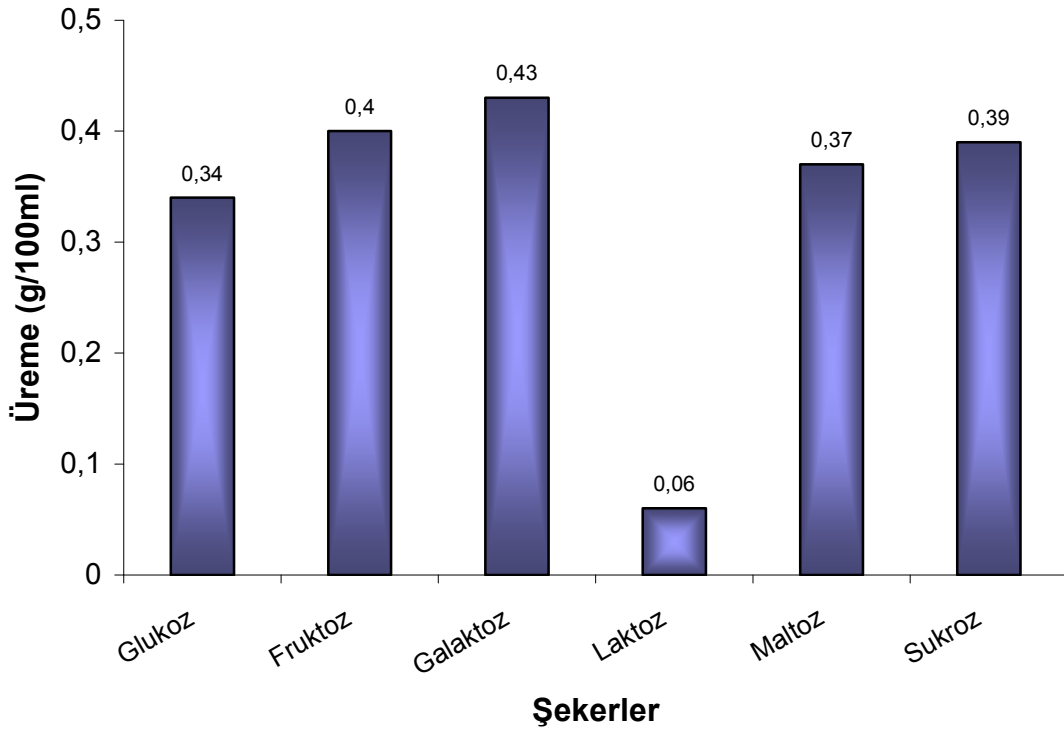
*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek üreme 0,51 g/100ml olarak sukroz disakkaritinin varlığında saptanırken maltoz ve glukoz varlığında da iyi üreme gözlemlendi, ancak laktoz içeren ortamda üremenin çok azaldığı tespit edildi. *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda galaktoz bulunan ortamda en yüksek üreme 0,43 g/100ml olarak saptandı, glukoz, fruktoz, maltoz ve sukroz içeren ortamlarda da iyi üreme gözlemlendi ancak laktozlu ortamda üremenin oldukça azaldığı belirlendi. *Y. lipolytica* Yerli Suşunda yine laktoz içeren ortamda üreme gözlenmezken en yüksek üreme 0,63 g/100ml olarak sukroz içeren ortamda saptandı. *Candida tropicalis* suşunda ise *Yarrowia* suşlarında olduğu gibi laktoz içeren ortamın üremeye etki etmediği saptandı. En yüksek üreme değerine 0,48 g/100ml olarak glukoz içeren ortamda tespit edildi. Maltoz içeren ortamda da diğer şekerlere göre üremenin arttığı saptandı (Şekil 4.13.).

Karbon kaynağı olarak farklı yağlar ve şekerlerin üremeye etkisi karşılaştırıldığında yağ içeren ortamlarda şeker içeren ortamlara göre çok daha fazla üremenin gerçekleştiği tespit edildi. Şekerlerin üremeye çok da etki etmediği saptandı.



■ *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658

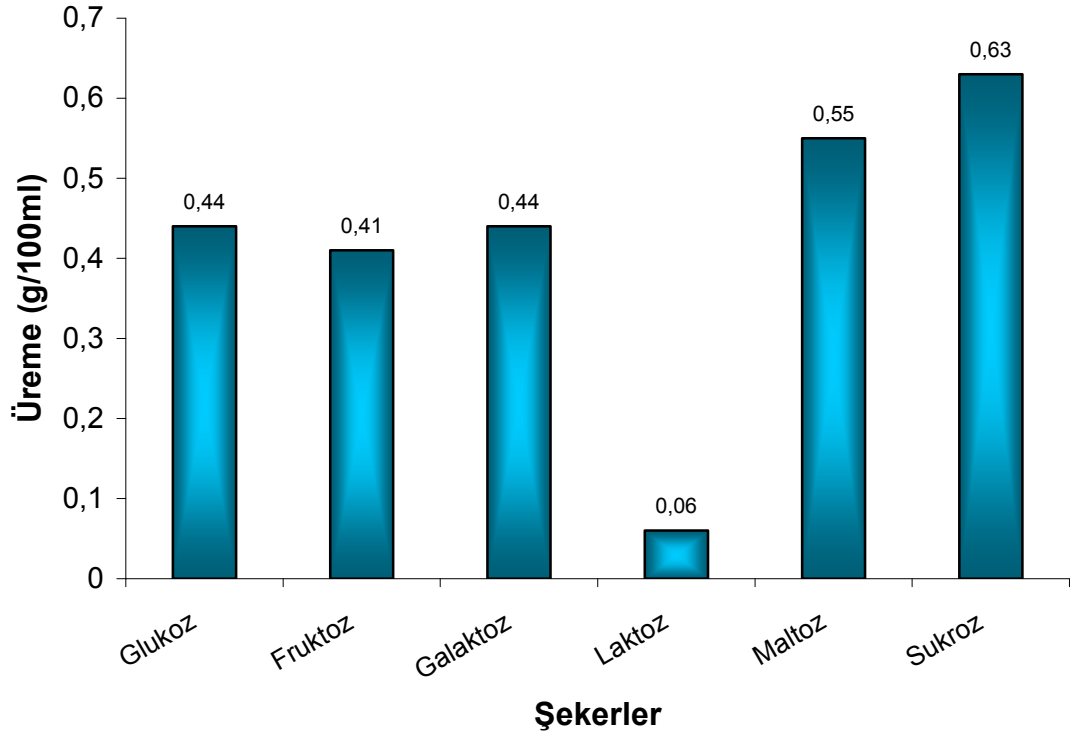
a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı şekerlerin üremeye etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* IFO 1195

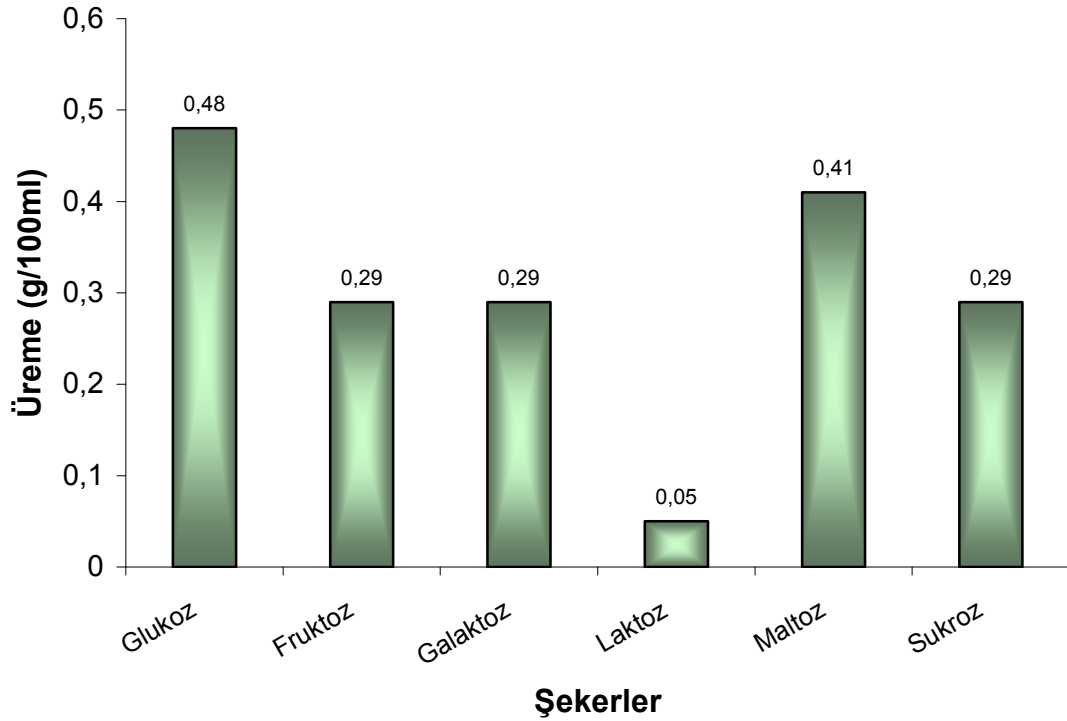
b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı şekerlerin üremeye etkisi.

Şekil 4.13. Farklı mono ve disakkaritlerin üremeye etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu

c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda farklı şekerlerin üremeye etkisi.



■ *Candida tropicalis*

d) *Candida tropicalis* suşunda farklı şekerlerin üremeye etkisi.

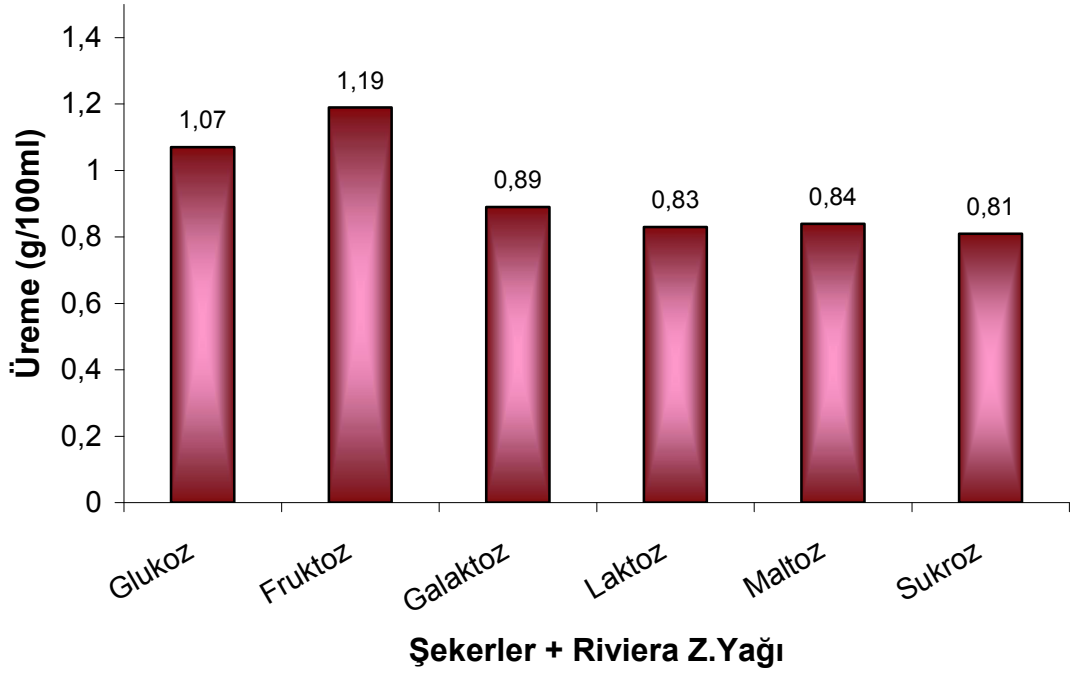
Şekil 4.13. Devamı... Farklı mono ve disakkaritlerin üremeye etkisi.



Son olarak da karbon kaynağı olarak şeker ve riviera zeytin yağı aynı lipaz üretim ortamına eklenerek üremeye etkisi araştırıldı. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, 30<sup>0</sup>C'de 48 saat kurutulan örneklerin kuru ağırlıkları hesaplandı. Elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.14.).

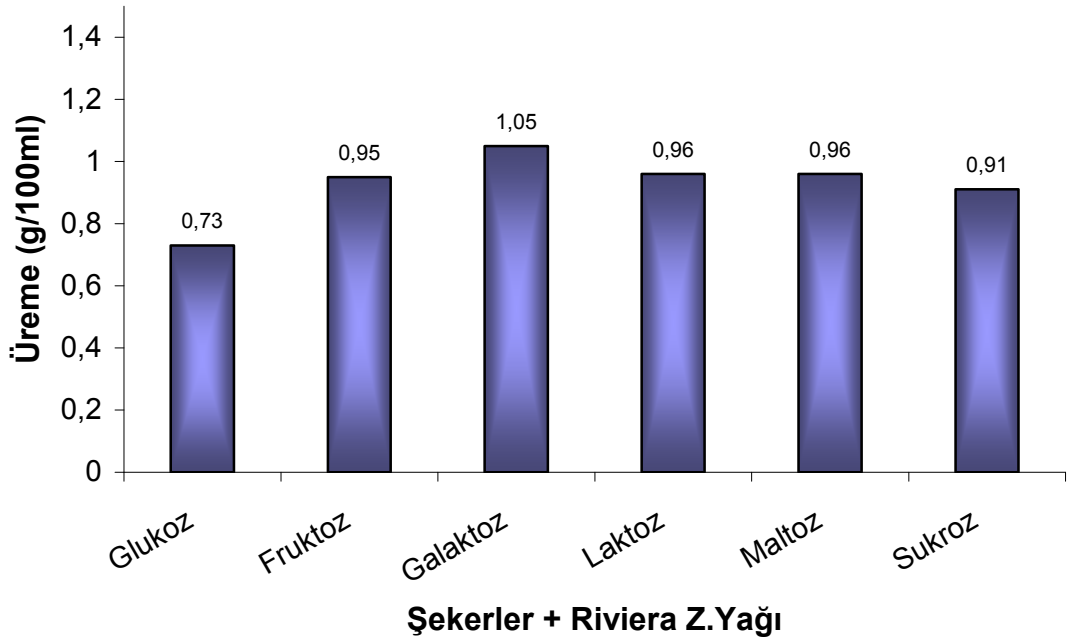
Üretim ortamına farklı şekere ilave olarak riviera zeytin yağı ilave edildiğinde, zeytin yağının etkisiyle üremenin arttığı saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek üreme öncelikle 1,19 g/100ml olarak fruktoz ve zeytin yağı içeren ortamda, sonrasında 1,07 g/100ml olarak glukoz ve zeytin yağı içeren ortamda saptandı. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda en yüksek galaktoz ve zeytin yağı içeren ortamda 1,05 g/100ml, sonrasında laktoz, maltoz ve zeytin yağı içeren ortamda 0,96 g/100ml ve fruktoz ve zeytin yağı içeren ortamda 0,95 g/100ml olarak saptandı. *Yarrowia lipolytica* Yerli suşunda en yüksek galaktoz ve zeytin yağı içeren ortamda 1,18 g/100ml, sonrasında glukoz, maltoz ve zeytin yağı içeren ortamda 1,08 g/100ml ve sukroz ve zeytin yağı içeren ortamda 1,06 g/100ml olarak saptandı. Son olarak da *Candida tropicalis* suşunda 1,38 g/100ml olarak maltoz ve zeytin yağı içeren ortamda en yüksek üreme değeri saptandı. Sonrasında galaktoz ve zeytin yağı içeren ortamda 1,30 g/100ml olarak üreme değeri tespit edildi (Şekil 4.14.).

Şekerlerin tek başına üremeyi çok fazla arttırmadı tespit edildiğinden ortama ilave edilen %1 oranındaki zeytin yağının üremeyi tek başına karbon kaynağı olarak ilave edilen yağlardan daha fazla üremeyi artırdığı tespit edildi.



■ *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658

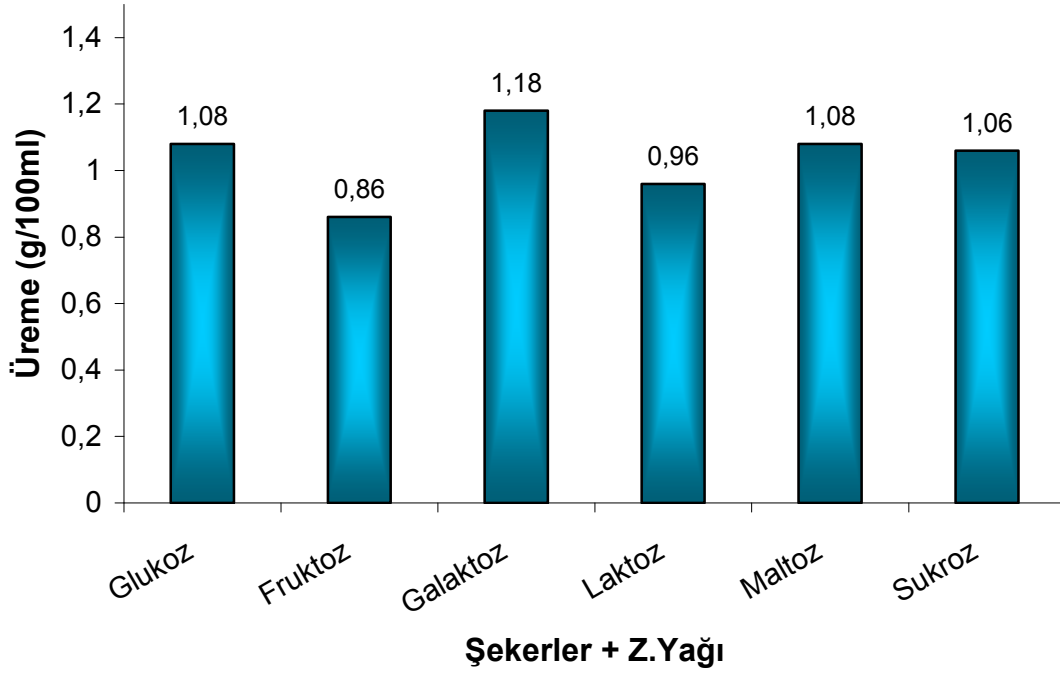
a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı şekerlere ilave olarak %1 riviera zeytin yağının üremeye etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* IFO 1195

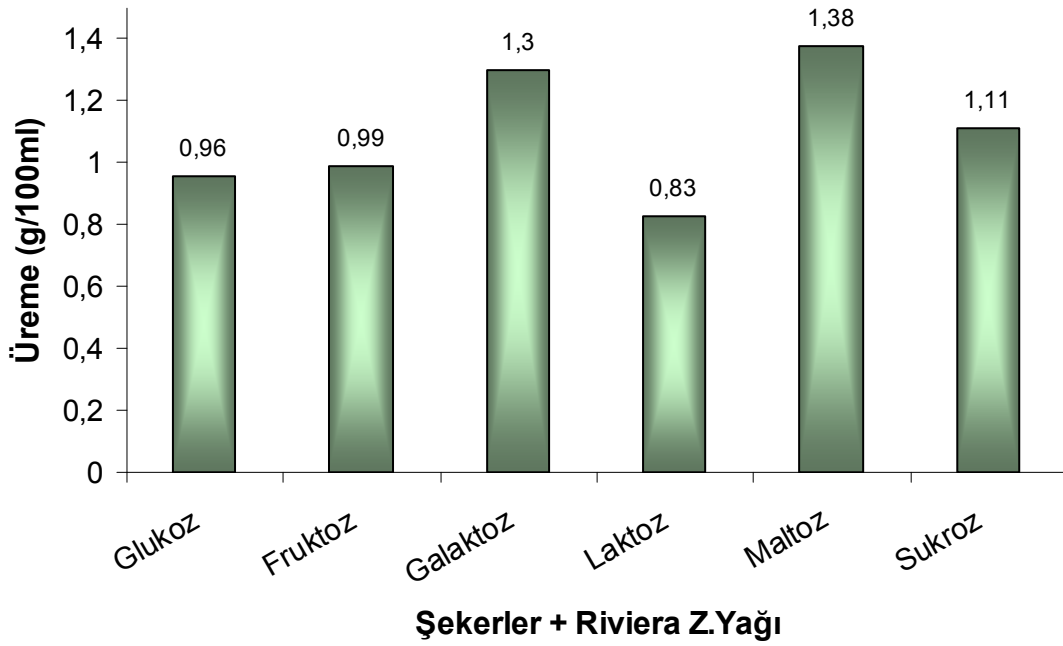
b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı şekerlere ilave olarak %1 riviera zeytin yağının üremeye etkisi.

Şekil 4.14. Farklı mono ve disakkaritlere ilave olarak %1 riviera zeytinyağının üremeye etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu

c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda farklı şekerlere ilave olarak %1 riviera zeytin yağının üremeye etkisi.



■ *Candida tropicalis*

d) *Candida tropicalis* suşunda farklı şekerlere ilave olarak %1 riviera zeytin yağının üremeye etkisi.

Şekil 4.14. Devamı... Farklı mono ve disakkaritlere ilave olarak %1 riviera zeytinyağının üremeye etkisi.

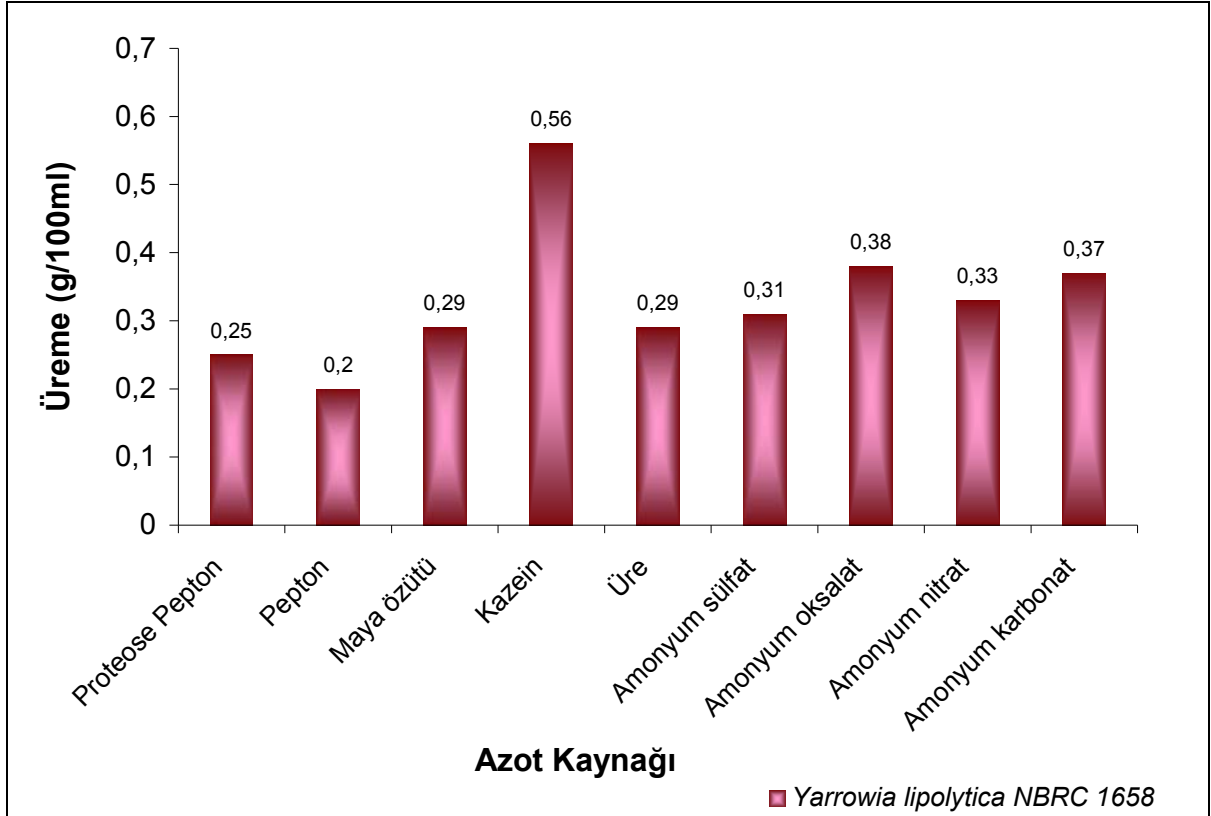
#### 4.5.9. Azot kaynağının üremeye etkisi

Azot kaynaklarının lipaz üretimine ve mikrobiyal üremeye etkisi araştırıldı. Lipaz üretim besiyerlerine ayrı ayrı %1 proteose peptone no:3, %1 pepton, %1 maya özütü, %1 kazein, %1 üre, %1 amonyum sülfat, %1 amonyum oksalat, %1 amonyum nitrat ve %1 amonyum karbonat eklendi ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşlarının üretimi sonrasında kültürler Whatman no:1 kağıdından süzülerek süpernatantları elde edildi. 30°C 'de 48 saat kurutulan Whatman no:1 kağıtlarından mayaların kuru ağırlığı hesaplandı. Elde edilen değerler grafiklendi (Şekil 4.15.).

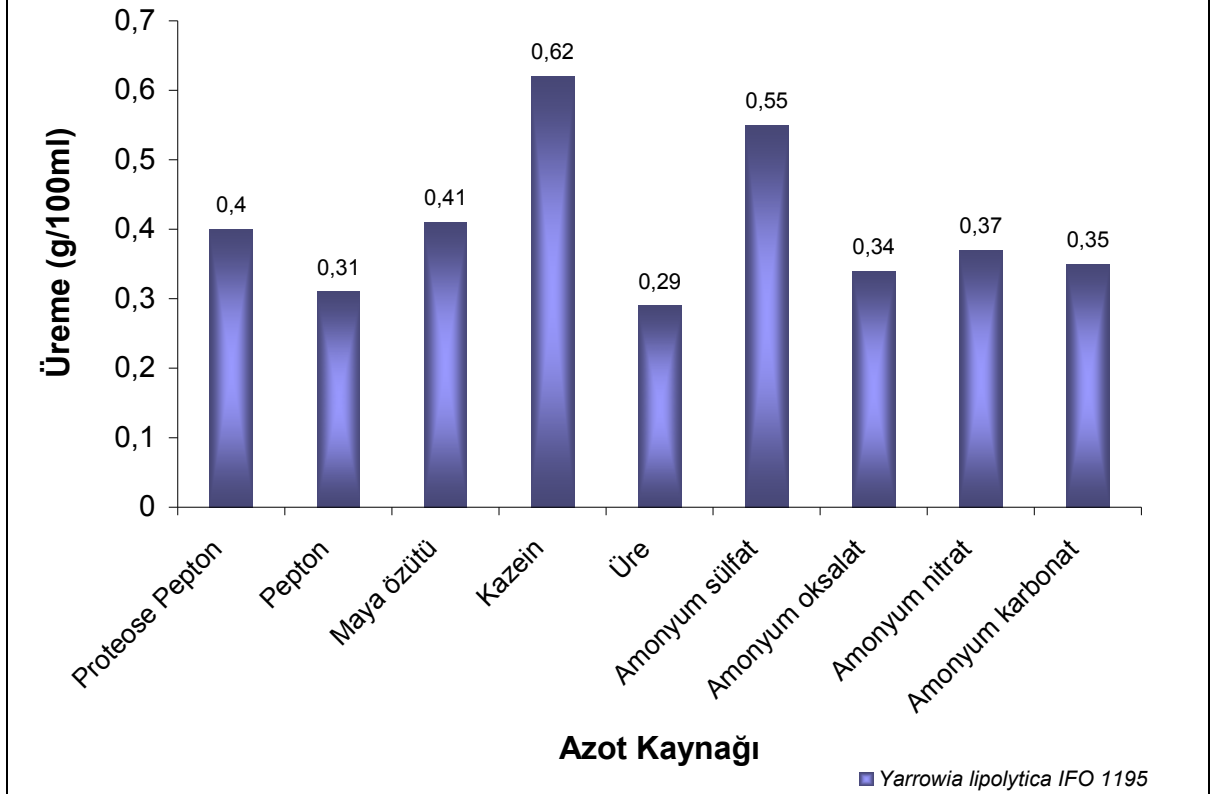
*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek üreme 0,56 g/100ml, *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda 0,62 g/100ml, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 0,55 g/100ml ve *Candida tropicalis* suşunda 0,62 g/100ml olarak kazein içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en düşük üreme 0,20 g/100ml olarak pepton ve 0,29 g/100ml olarak üreli ortamlarda, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda 0,29 g/100ml olarak üreli ortamlarda, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 0,28 g/100ml olarak üreli ortamlarda ve *Candida tropicalis* suşunda 0,28 g/100ml olarak üreli ortamlarda tespit edildi (Şekil 4.15.).

Ayrıca yukarıda bahsedilen azot kaynaklarını içeren ortamlara %1 riviera zeytin yağı ilave edilerek üremeye etkisi araştırıldı (Şekil 4.16.).

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek üreme 1,55 g/100ml, *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda 1,60 g/100ml, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 1,66 g/100ml ve *Candida tropicalis* suşunda 1,44 g/100ml olarak kazein içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en düşük üreme 0,81 g/100ml olarak amonyum nitrat ve 0,82 g/100ml olarak amonyum oksalat içeren ortamlarda, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda 0,73 g/100ml olarak amonyum sülfatlı ortamlarda, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 0,96 g/100ml olarak amonyum oksalat ve 0,97 g/100ml olarak amonyum nitratlı ortamlarda ve *Candida tropicalis* suşunda 0,68 g/100ml olarak amonyum oksalatlı ortamlarda tespit edildi (Şekil 4.16.).

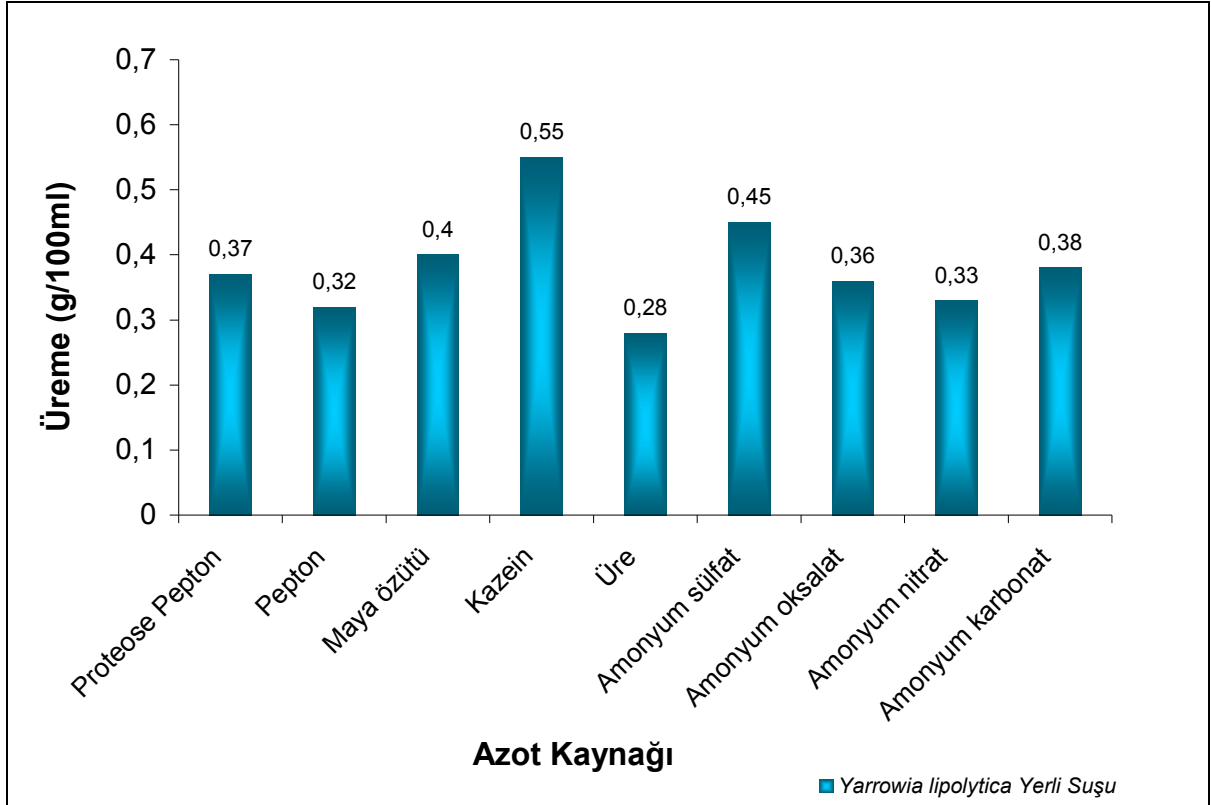


a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı azot kaynaklarının üremeye etkisi.

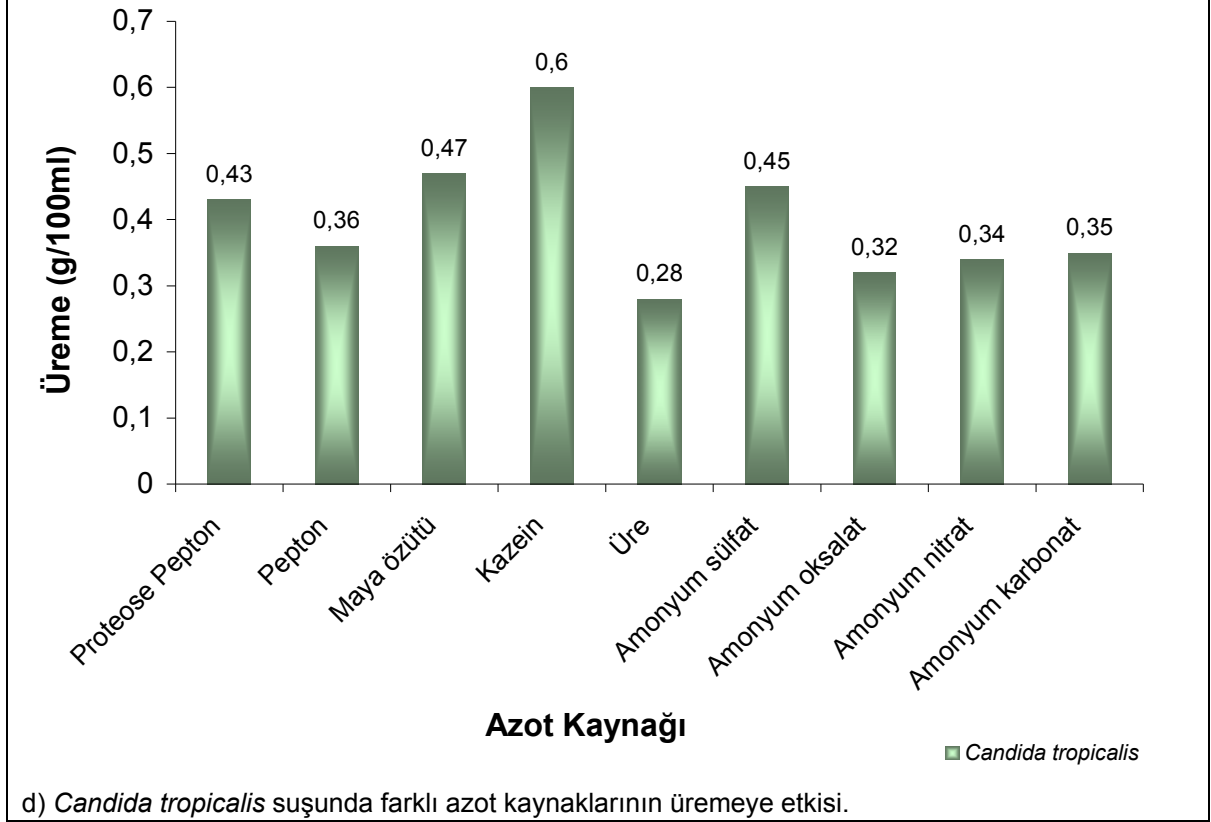


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı azot kaynaklarının üremeye etkisi.

Şekil 4.15. Farklı azot kaynaklarının üremeye etkisi.

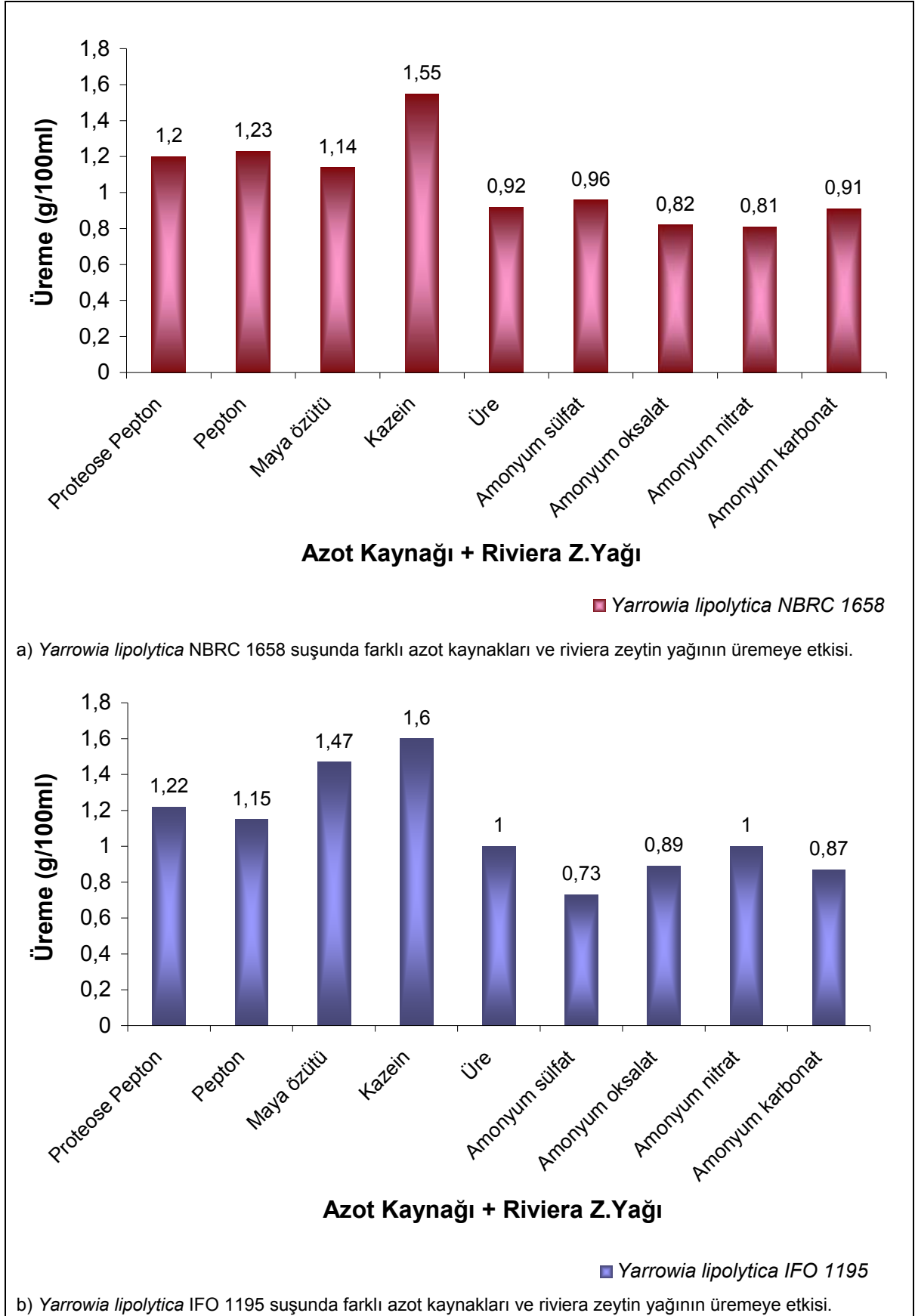


c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda farklı azot kaynaklarının üremeye etkisi.

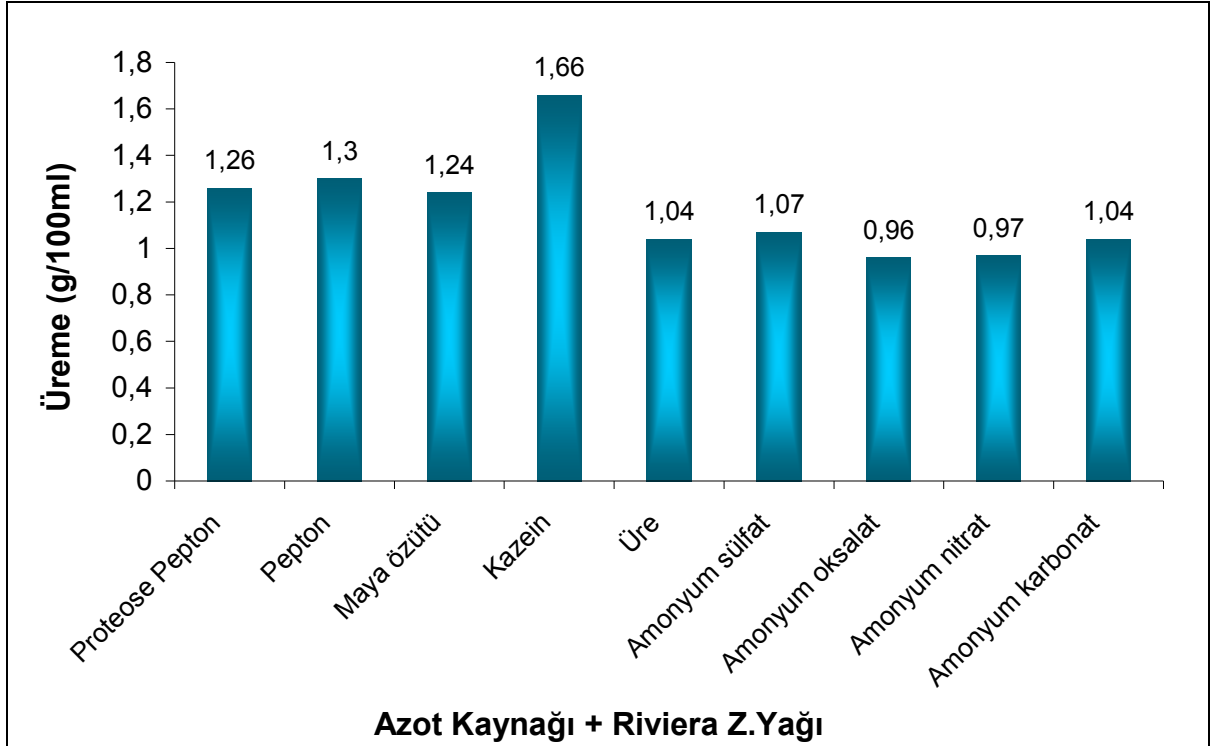


d) *Candida tropicalis* suşunda farklı azot kaynaklarının üremeye etkisi.

Şekil 4.15. Devamı...Farklı azot kaynaklarının üremeye etkisi.

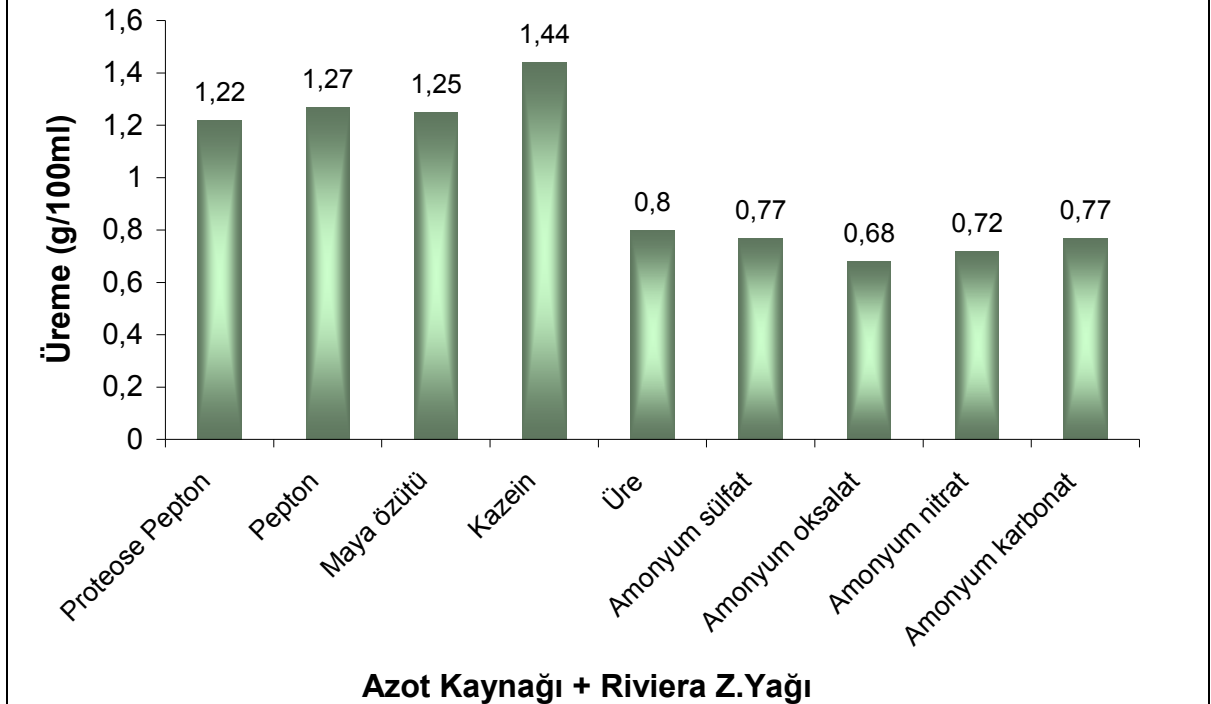


Şekil 4.16. Azot kaynakları ve riviera zeytin yağının üremeye etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu

c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda farklı azot kaynakları ve riviera zeytin yağının üremeye etkisi.



■ *Candida tropicalis*

d) *Candida tropicalis* suşunda farklı azot kaynakları ve riviera zeytin yağının üremeye etkisi.

Şekil 4.16. Devamı... Azot kaynakları ve riviera zeytin yağının üremeye etkisi.

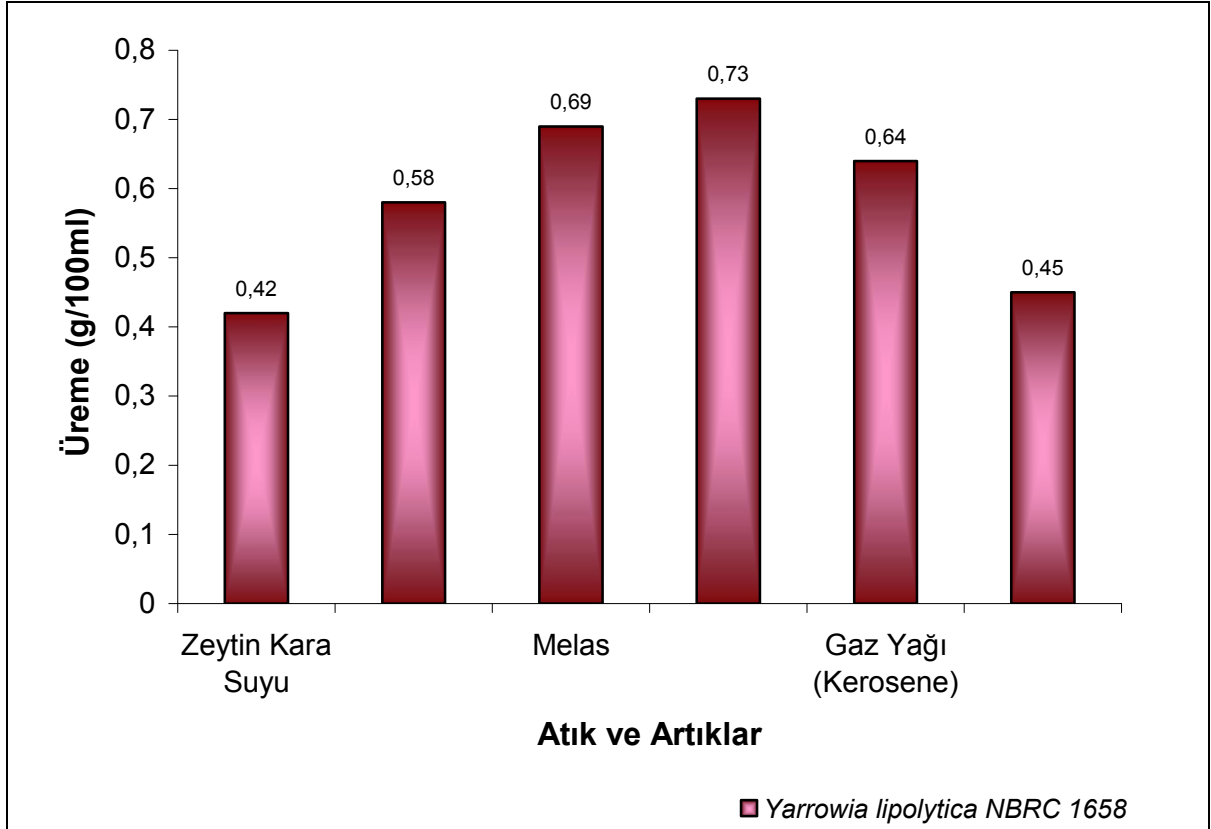


#### 4.5.10. Çeşitli atık-artıklar ve lipaz üretimini artıran birtakım maddelerin üremeye etkisi

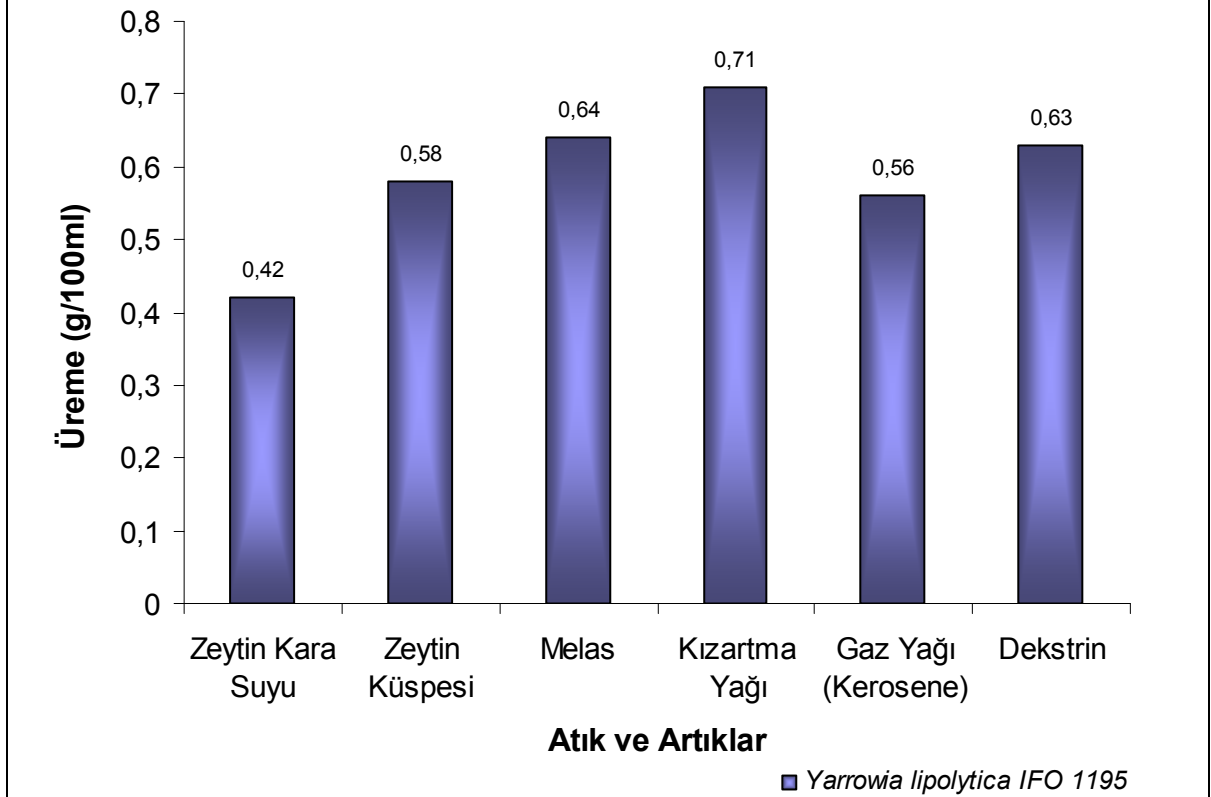
Çeşitli atık ve artıkların lipaz üretimine ve mikrobiyal üremeye etkisinin tespiti amacıyla lipaz üretim besiyerlerine ayrı ayrı %1 zeytin kara suyu, %1 zeytin küspesi, %1 melas, ve %1 kızartma yağı, ayrıca lipaz üretimini artırdığı belirtilen %1 gaz yağı (kerosene) ve %1 dekstrin de eklendi. Ayrıca bir diğer besiyerlerine (kızartma yağı ve gaz yağı hariç) bu atık ve artıklara ilave olarak %1 riviera zeytin yağı eklendi. İnkübasyon sonrasında kültürler Whatman no:1 kağıdından süzülerek 30°C'de 48 saat kurutuldu. Elde edilen değerler grafiklendi (Şekil 4.17.) ve (Şekil 4.18.).

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek mikrobiyal üreme kızartma yağı içeren ortamda (0,73 g/100ml), sonrasında ise melas (0,69 g/100ml) ve gaz yağı (0,64 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda en yüksek mikrobiyal üreme kızartma yağı içeren ortamda (0,71 g/100ml), sonrasında ise melas (0,64 g/100ml) ve dekstrin (0,63 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda en yüksek mikrobiyal üreme kızartma yağı içeren ortamda (0,83 g/100ml), sonrasında ise melas (0,72 g/100ml) ve dekstrin (0,67 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı. *Candida tropicalis* suşunda en yüksek mikrobiyal üreme melas içeren ortamda (0,73 g/100ml), sonrasında ise zeytin küspesi (0,69 g/100ml) ve dekstrin (0,60 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı (Şekil 4.17.).

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en düşük mikrobiyal üreme zeytin karasuyu içeren ortamda (0,42 g/100ml), sonrasında ise dekstrin (0,45 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda en düşük mikrobiyal üreme zeytin karasuyu içeren ortamda (0,42 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda en düşük mikrobiyal üreme zeytin karasuyu içeren ortamda (0,42 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı. *Candida tropicalis* suşunda en düşük mikrobiyal üreme zeytin karasuyu (0,44 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı (Şekil 4.17.).

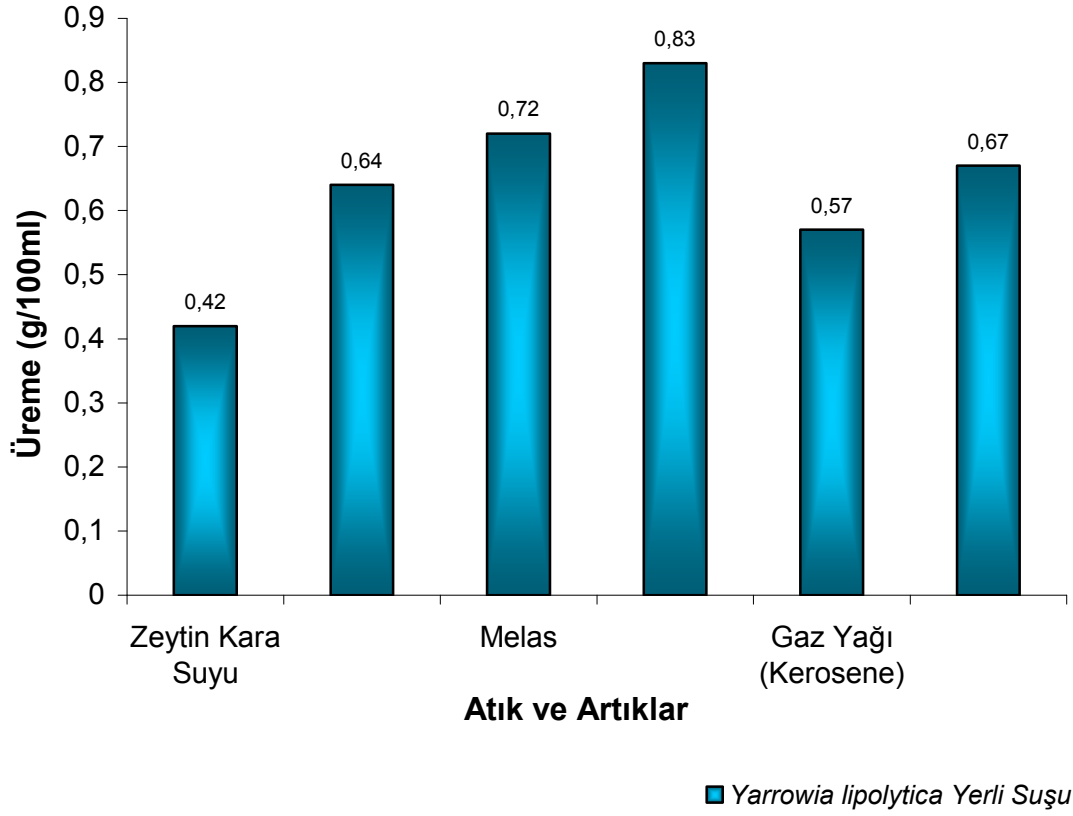


a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi.

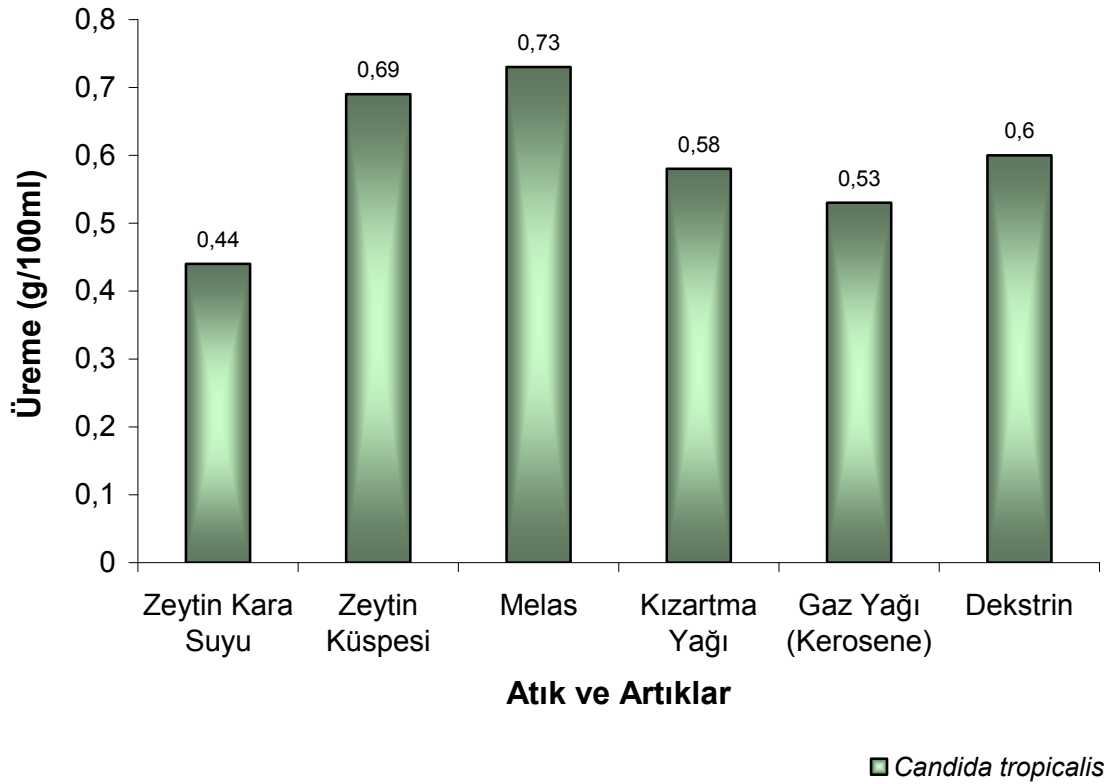


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi.

Şekil 4.17. Çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi.

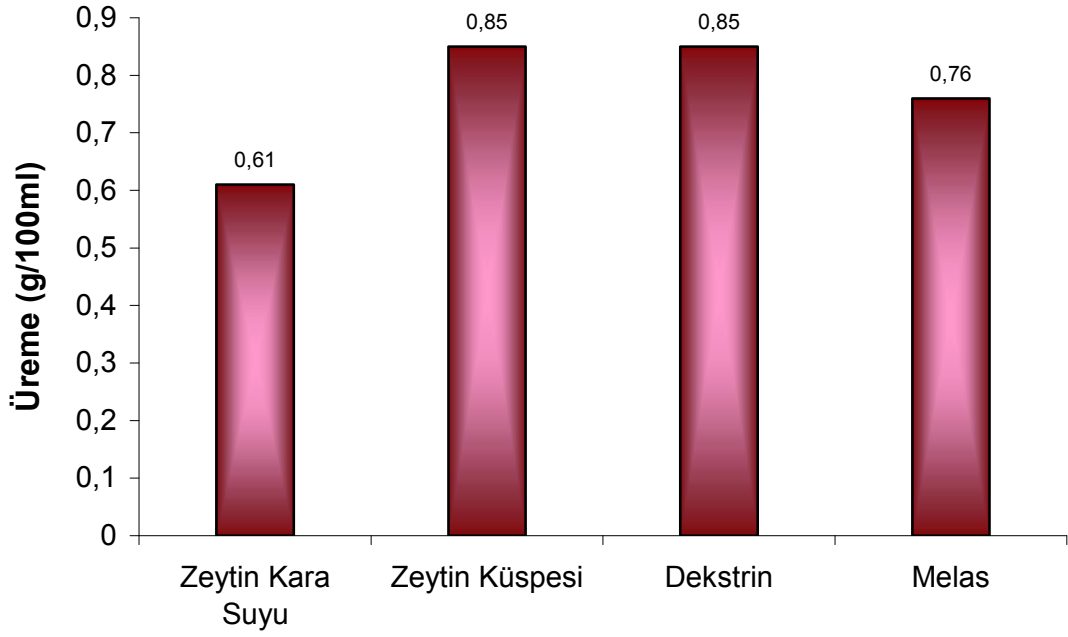


c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi.



d) *Candida tropicalis* suşunda çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi.

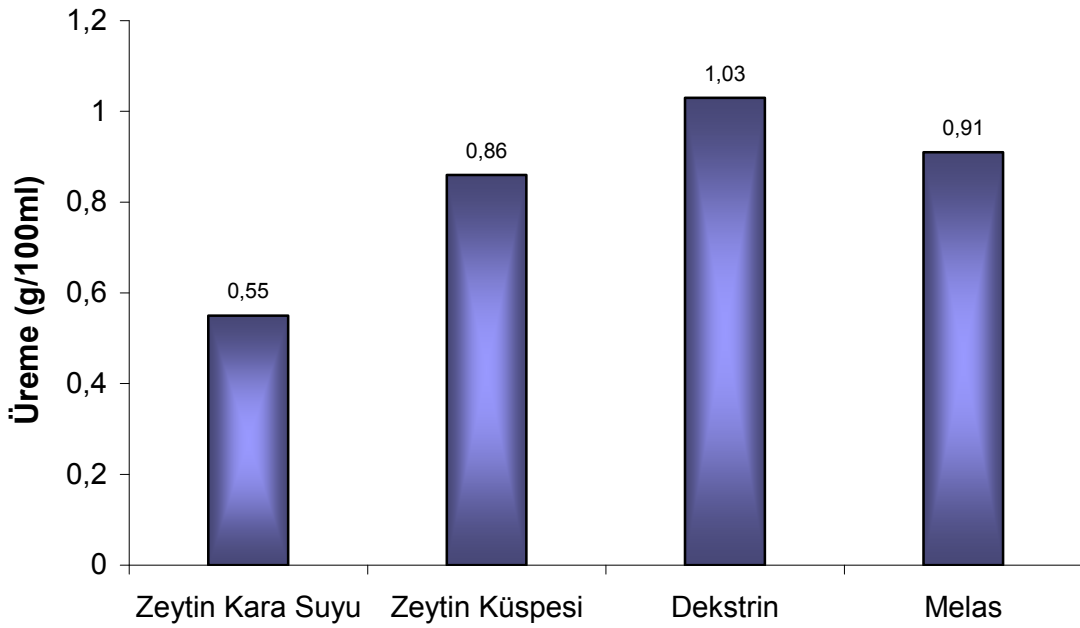
Şekil 4.17. Devamı... Çeşitli atık ve artıkların üremeye etkisi.



#### Atık ve Artıklar + Riviera Z.Yağı

■ *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658

a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda çeşitli atık ve artıklara ilave edilen %1'lik riviera zeytin yağının üremeye etkisi.

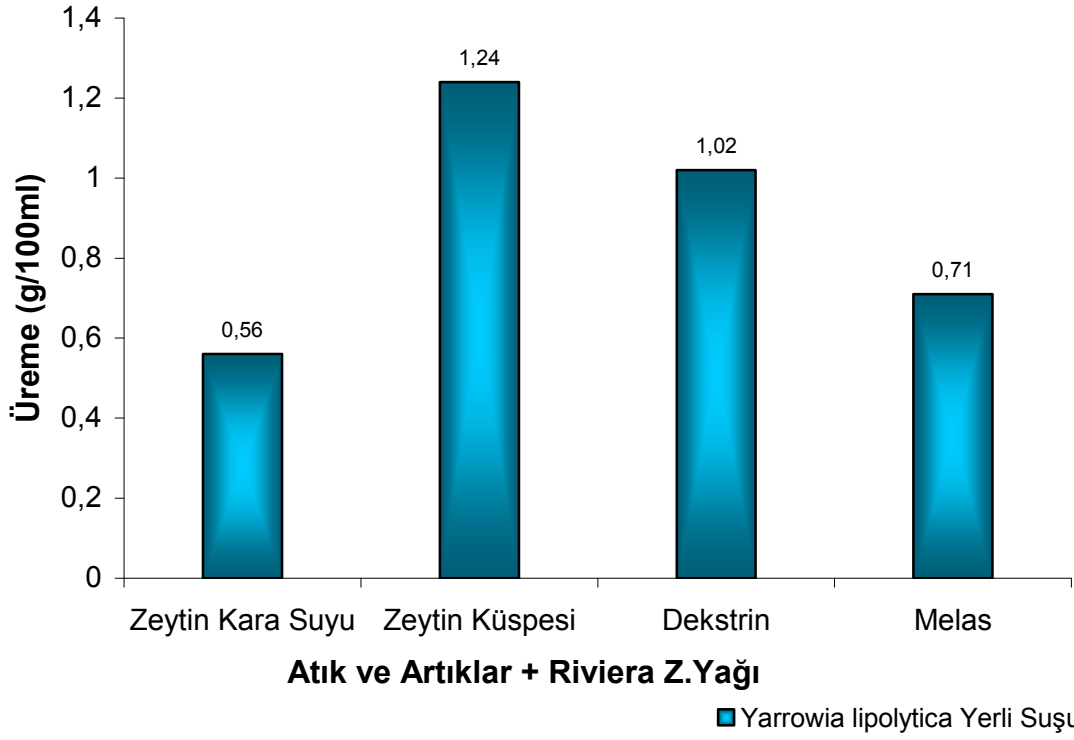


#### Atık ve Artıklar + Riviera Z.Yağı

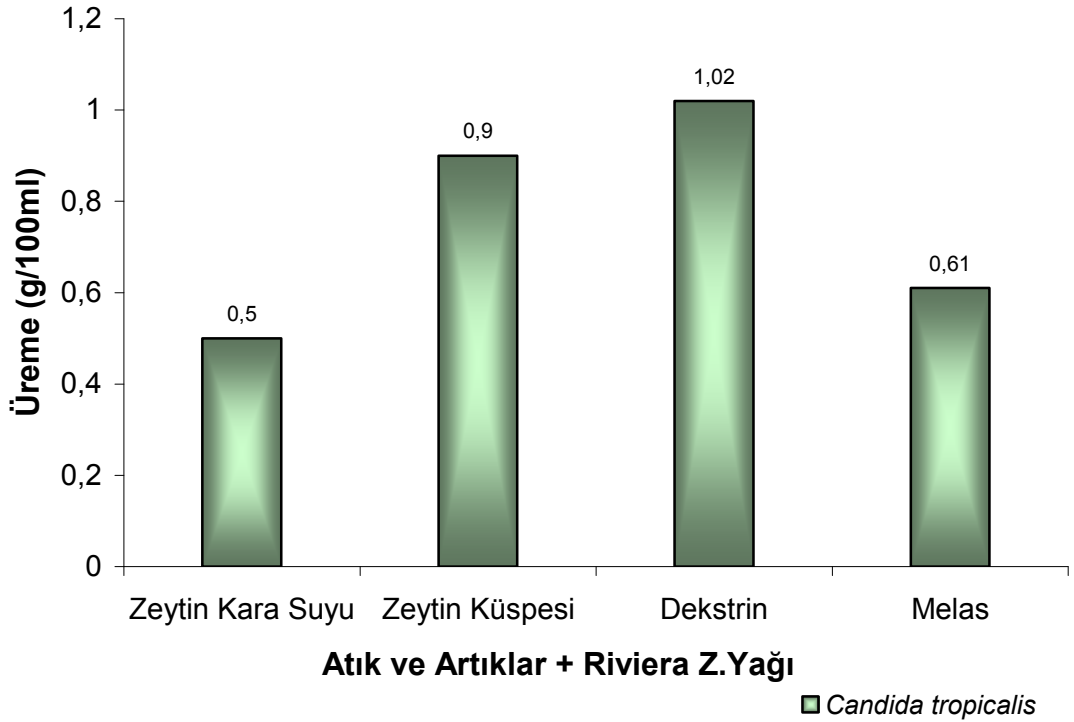
■ *Yarrowia lipolytica* IFO 1195

b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda çeşitli atık ve artıklara ilave edilen %1'lik riviera zeytin yağının üremeye etkisi.

Şekil 4.18. Çeşitli atık ve artıklara ilave olarak %1'lik zeytin yağı rivieranın üremeye etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda çeşitli atık ve artıklara ilave edilen %1'lik riviera zeytin yağının üremeye etkisi.



d) *Candida tropicalis* suşunda çeşitli atık ve artıklara ilave edilen %1'lik riviera zeytin yağının üremeye etkisi.

Şekil 4.18. Devamı... Çeşitli atık ve artıklara ilave olarak %1'lik zeytin yağı rivieranın üremeye etkisi.

Zeytin karasuyu, zeytin küspesi, dekstrin ve melas içeren ortamlara ilave olarak %1 riviera zeytin yağı içeren ortamlarda ilave edilen zeytin yağının üremeyi artırdığı tespit edildi. En yüksek üremelere *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda zeytin küspesi ve dekstrin içeren ortamlarda (0,85 g/100ml), *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda dekstrin (1,03 g/100ml), *Y. lipolytica* Yerli Suşunda zeytin küspesi (1,24 g/100ml) ve *Candida tropicalis* suşunda dekstrin (1,02 g/100ml) içeren ortamlarda saptandı (Şekil 4.18.).

#### **4.6. Lipaz Üretim Optimizasyonu**

Topraktan izole edilen maya kültürü *Candida tropicalis* ve *Yarrowia lipolytica* kültürlerinin lipaz aktivitesi optimizasyonları araştırıldı. Sıcaklık, pH ve lipaz üretim koşulları optimize edilerek sonuçlar değerlendirildi.

##### **4.6.1. Lipaz üretim ortamı**

Lipaz üretim ortamı olarak Hatzinikolaou ve ark, 1996, tarafından önerilen besiyerinin pH'sı 4,5'e ayarlanarak 250 ml'lik erlenmeyerlerde 100 ml üretim ortamı içerecek şekilde dağıtıldı ve otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi, otoklav sıcaklığı 65<sup>0</sup>C'nin altına düştüğünde her bir besiyerine karbon kaynağı olarak %1 zeytinyağı riviera ilave edildi. Daha sonra sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile ayrı ayrı 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında gerçekleştirildi.

##### **4.6.2. Aşılama ve kültürasyon**

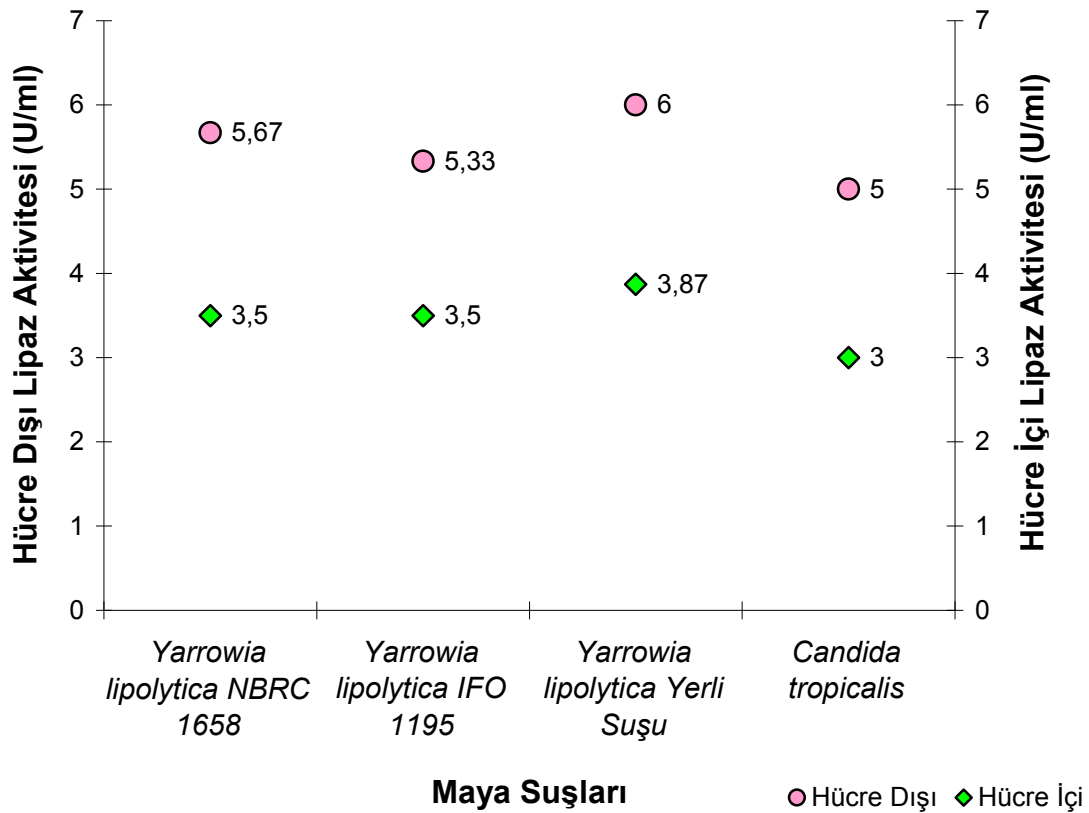
*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* sıvı stok kültürleri 150 ml'lik erlenmeyerlerde 50 ml üretim ortamı olacak biçimde hazırlandı. Besiyeri ortamı olarak Sabouraud Dekstroz Broth besiyeri seçildi. Daha önce katı yatık stok olarak hazırlanan mayalardan sıvı stok ortamlarına ekim yapıldı ve 30<sup>0</sup>C'de 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 48 saat inkübe edildi. Sıvı stok maya kültürlerinden daha sonra lipaz üretimi araştırılacak olan üretim besiyerine 1 ml aşılama yapılacağından sıvı stok kültürlerinde hücre sayımı gerçekleştirildi.

#### 4.6.3. Lipaz sentez tayini

Mikroorganizmalarda lipaz aktivite tayininde titrasyon yöntemi kullanıldı. Kültür ortamı filtratının enzim kaynağı olarak kullanıldığı lipaz aktivite tayininde değerler formülde yerine konularak lipaz aktivite miktarı saptandı. 1 ünite lipaz aktivitesi uygun koşullar altında 1 µmol yağ asidini açığa çıkaran aktivite olarak tanımlandı.

#### 4.6.4. Enzim lokalizasyonunun saptanması

Lipaz enziminin hücre-içi ve hücre-dışı özelliği araştırıldı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda hücre dışı lipaz aktivitesi 5,67 U/ml iken hücre içi enzim aktivitesi 3,5 U/ml olarak saptandı. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda hücre dışı lipaz aktivitesi 5,33 U/ml iken hücre içi enzim aktivitesi 3,5 U/ml, *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda hücre dışı lipaz aktivitesi 6,00 U/ml iken hücre içi enzim aktivitesi 3,87 U/ml, olarak saptandı. Yeni izole edilen maya olan *Candida tropicalis* suşunda ise hücre dışı lipaz aktivitesi 5,00 U/ml iken hücre içi lipaz aktivitesi 3,00 U/ml olarak tespit edildi. Sonuç olarak tüm maya suşlarında enzim aktivitesinin hücre dışında daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.19.).

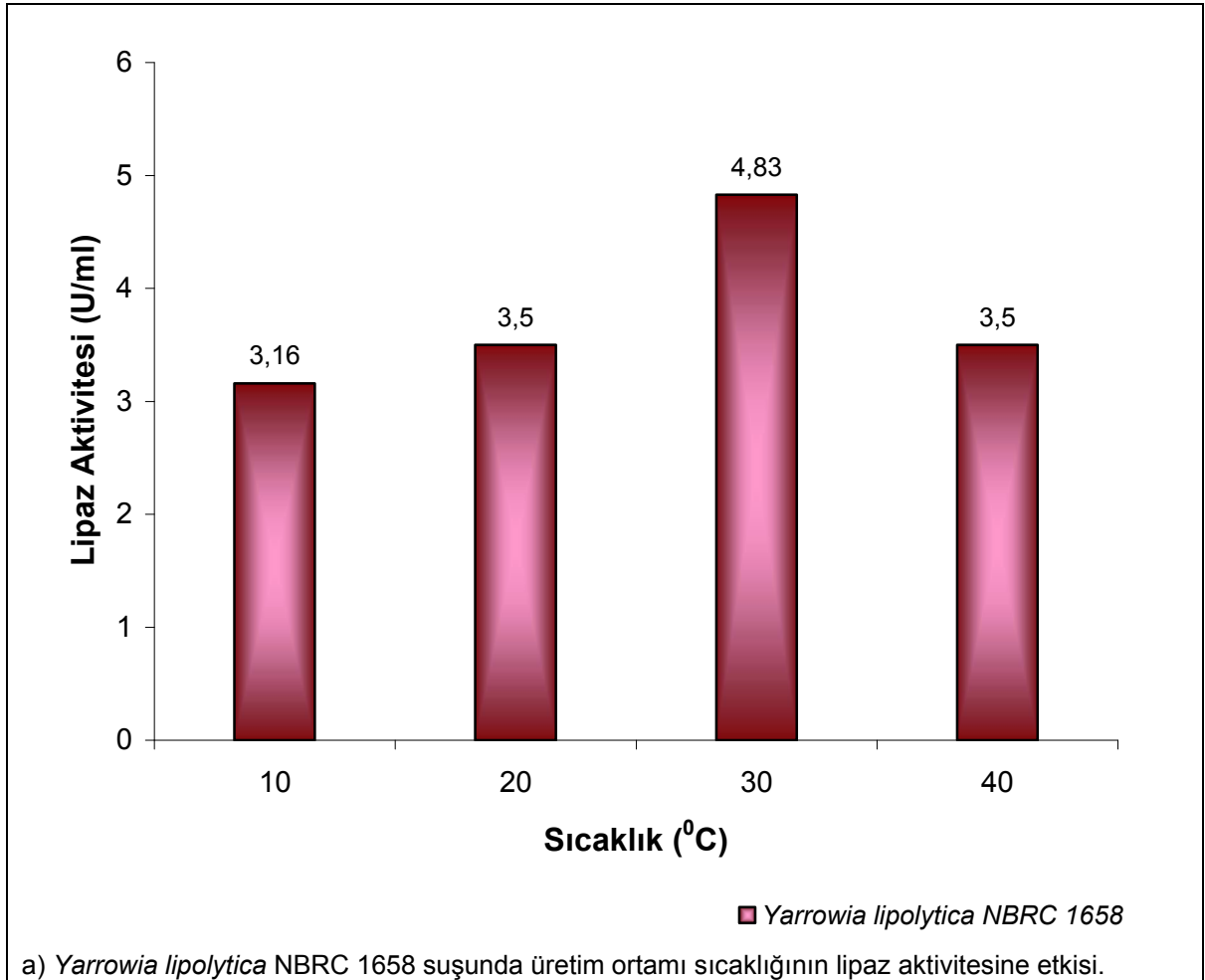


Şekil 4.19. Maya suşlarının hücre dışı ve hücre içi lipaz aktivitesi.

#### 4.6.5. Üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi

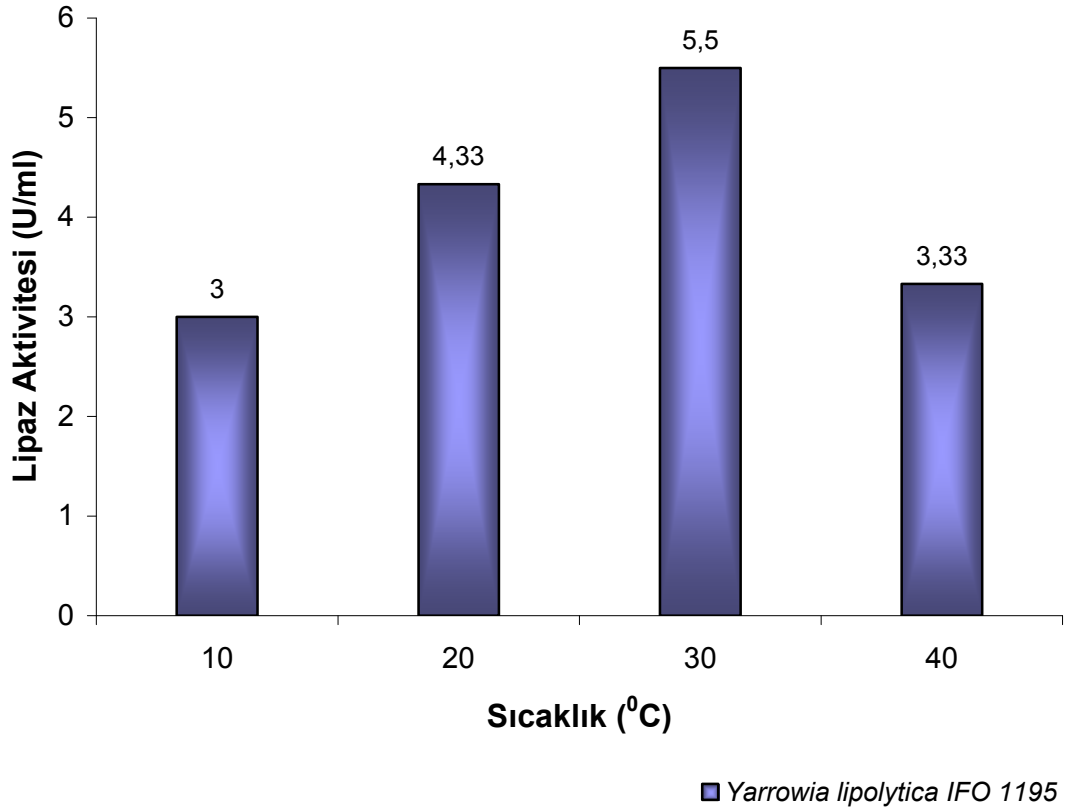
Sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* kültürlerinden lipaz üretim ortamına steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon ayrı ayrı 10 - 40°C aralığında 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, elde edilen süzüntülerde lipaz aktivitesi araştırıldı ve elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.20.).

Sonuç olarak en yüksek lipaz aktivitesi *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda 4,83 U/ml, IFO 1195 suşunda 5,5 U/ml, Yerli Suşunda 5,0 U/ml ve *Candida tropicalis* suşunda 4,5 U/ml olarak 30°C'de gözlemlendi. Ancak psikrofilik mikroorganizmalar olarak bilinen *Yarrowia* suşlarında 20 ve 40 °C'lerde de 30°C'dekine yakın lipaz aktivitesi saptandı (Şekil 4.20.).

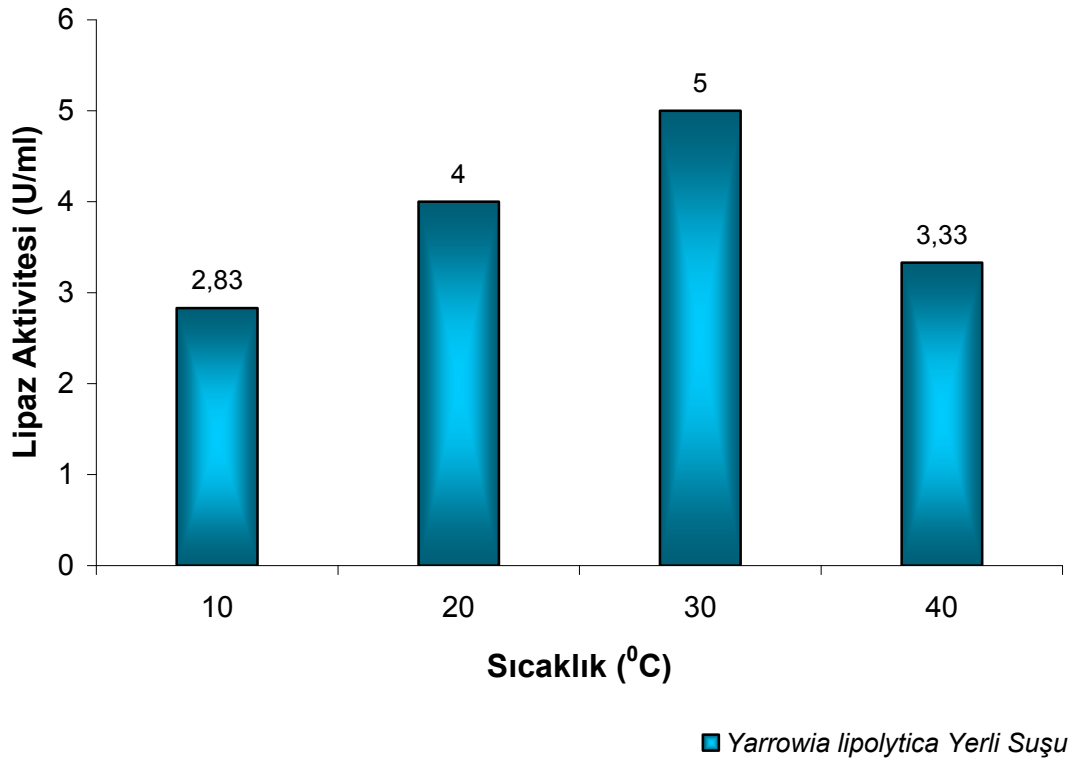


Şekil 4.20. Üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.



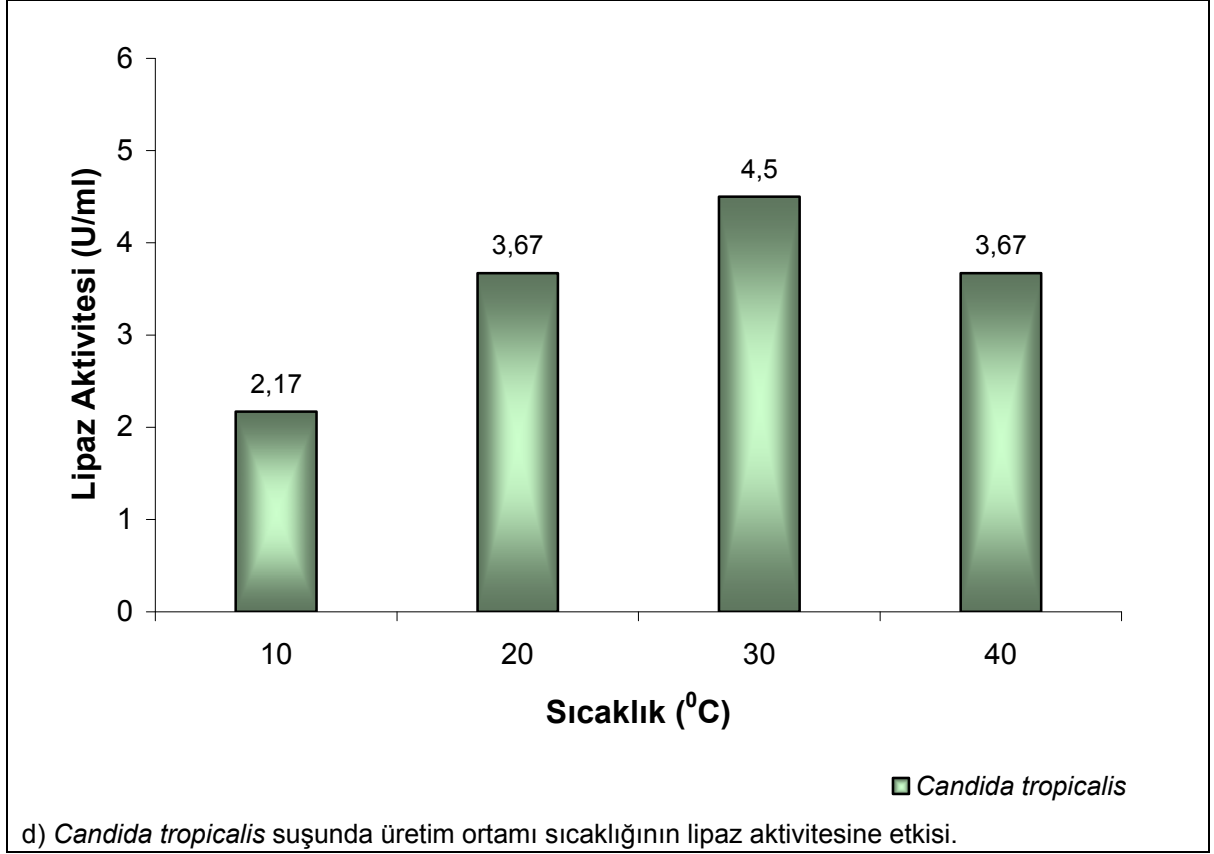


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.20. Devamı... Üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.



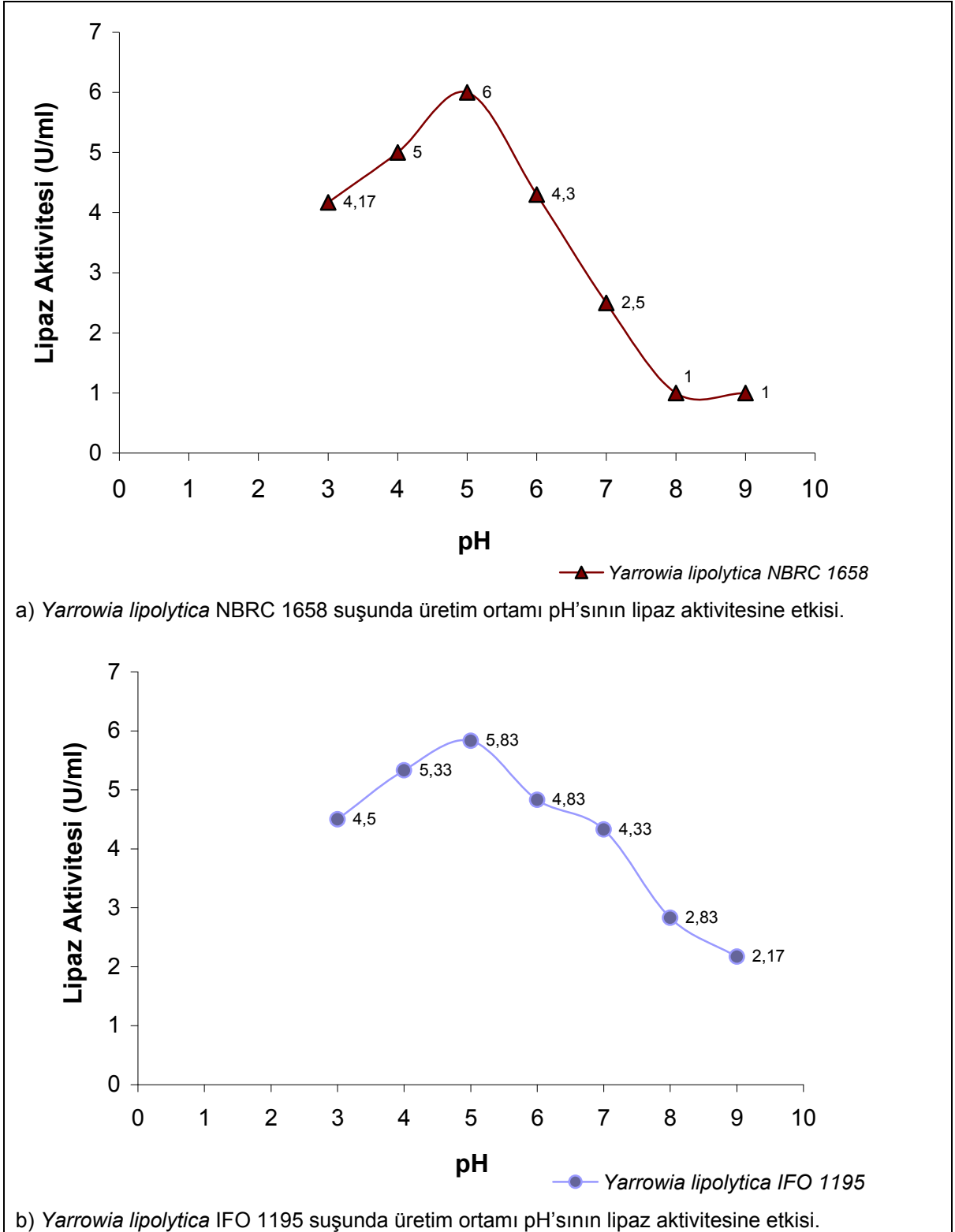
Şekil 4.20. Devamı... Üretim ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.

#### 4.6.6. Üretim ortamı pH'sının lipaz sentezine etkisi

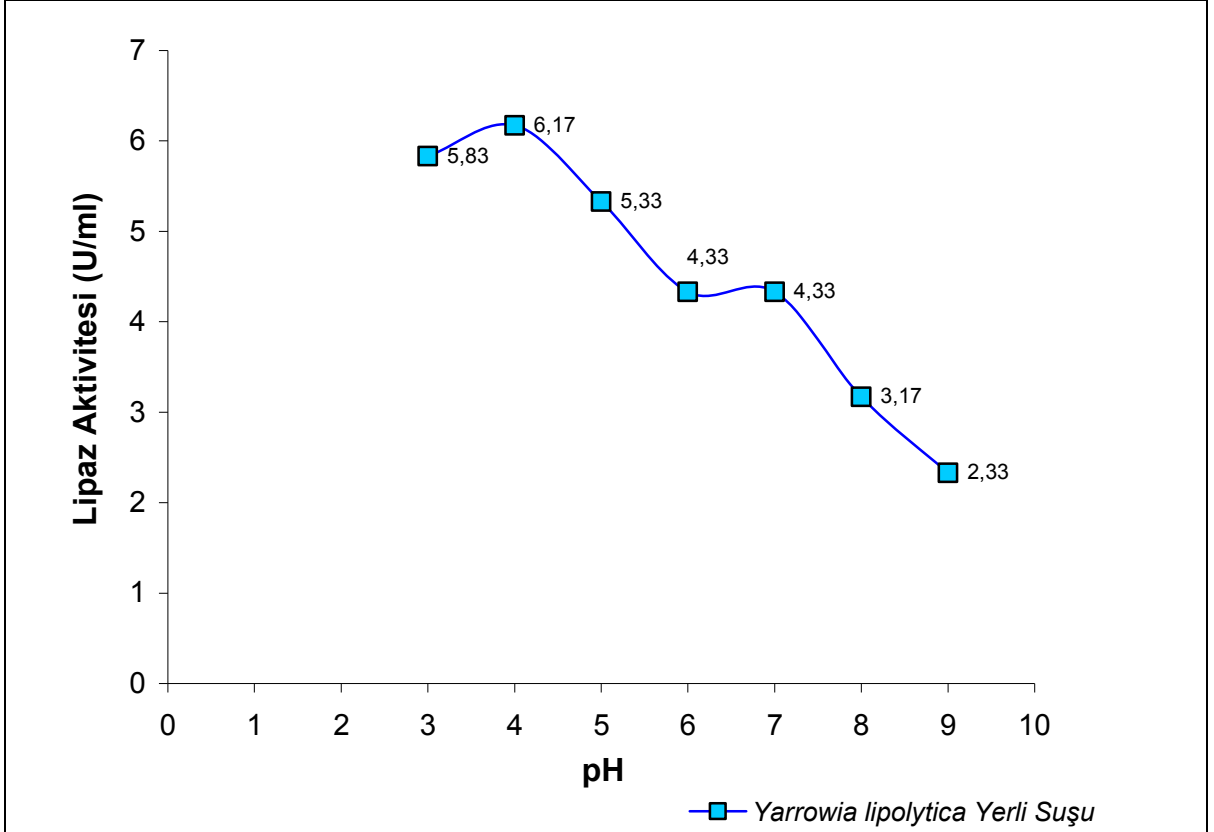
Sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapılarak inkübasyon 3 - 9 pH aralığında 150 rpm döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, elde edilen süzüntülerde lipaz aktivitesi tayin edilerek elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.21.).

Üretim ortamının pH'sının üremeye etkisi incelendiğinde *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek aktivite 5,0 – 6,0 U/ml olarak pH 4-5 aralığında saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda pH 3 - 6 aralığında lipaz aktivitesinin yüksek olduğu ancak pH 7'den itibaren ciddi oranda azaldığı tespit edildi. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda en yüksek aktivite 5,33 – 5,83 U/ml olarak pH 4-5 aralığında saptandı. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda pH 3 - 7 aralığında lipaz aktivitesinin yüksek olduğu ancak pH 8'den itibaren oldukça azaldığı tespit edildi. *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda pH 3 - 5 aralığında lipaz aktivitesinin yüksek

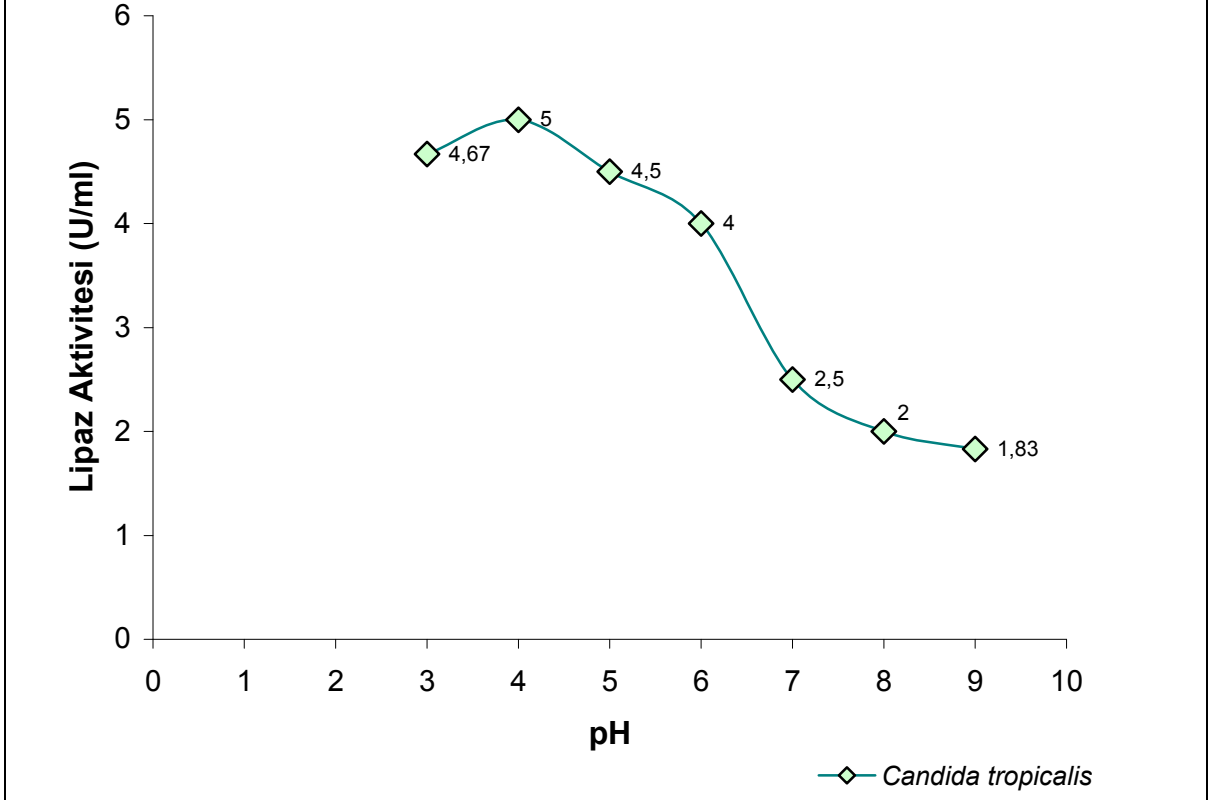
olduğu, pH 6 ve 7’de durağan olduğu (4,33 U/ml) ancak pH 8’den itibaren azaldığı gözlemlendi. *Candida tropicalis* suşunda ise pH 3 - 6 aralığında lipaz aktivitesinin yüksek olduğu, ancak pH 7’den itibaren yarı yarıya azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Üretim ortamı pH’sının lipaz aktivitesine etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda üretim ortamı pH'sının lipaz aktivitesine etkisi.



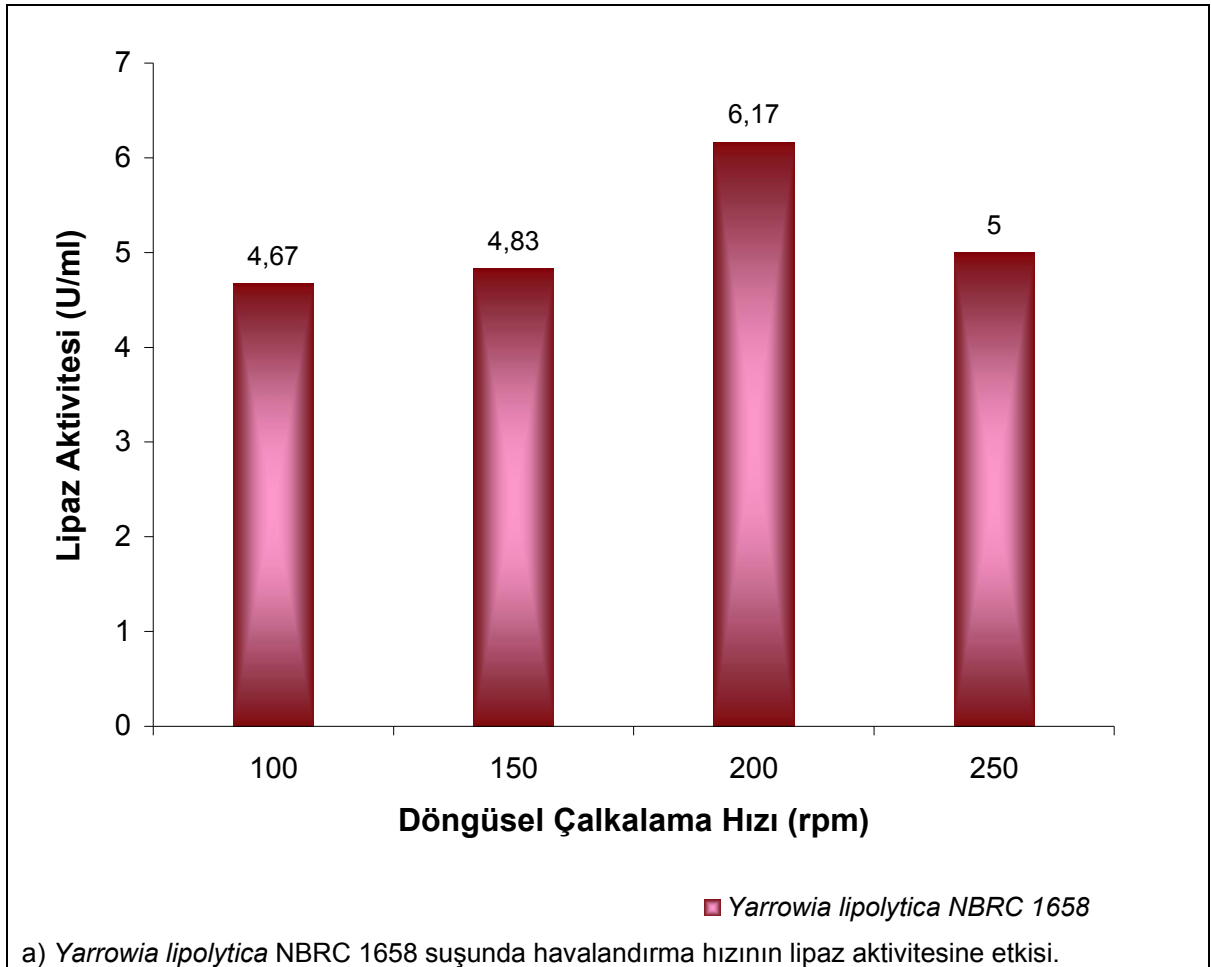
d) *Candida tropicalis* suşunda üretim ortamı pH'sının lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.21. Devamı... Üretim ortamı pH'sının lipaz aktivitesine etkisi.

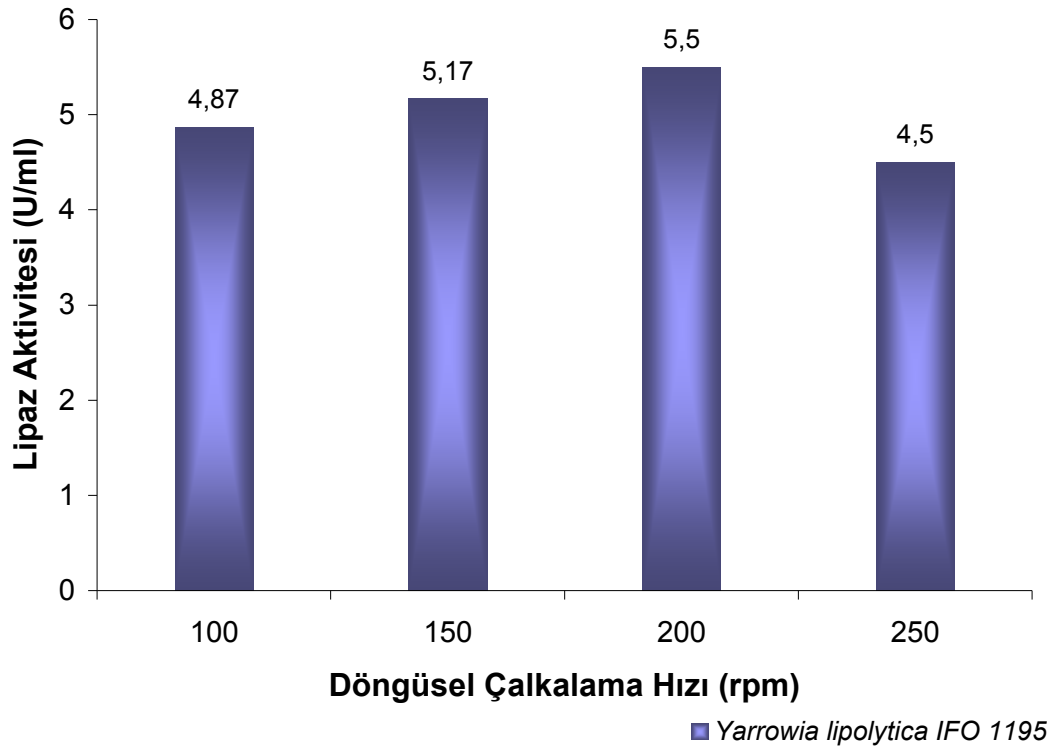
#### 4.6.7. Üretim ortamı havalandırma hızının lipaz aktivitesine etkisi

Sıvı *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* stok kültürlerinden steril pipet ile 1'er ml aşılama yapıldı ve inkübasyon 30°C'de 100 - 250 rpm aralığında döngüsel çalkalama hızında 72 saatte gerçekleştirildi. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, süzüntülerde lipaz aktivitesi araştırıldı. Elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.22.).

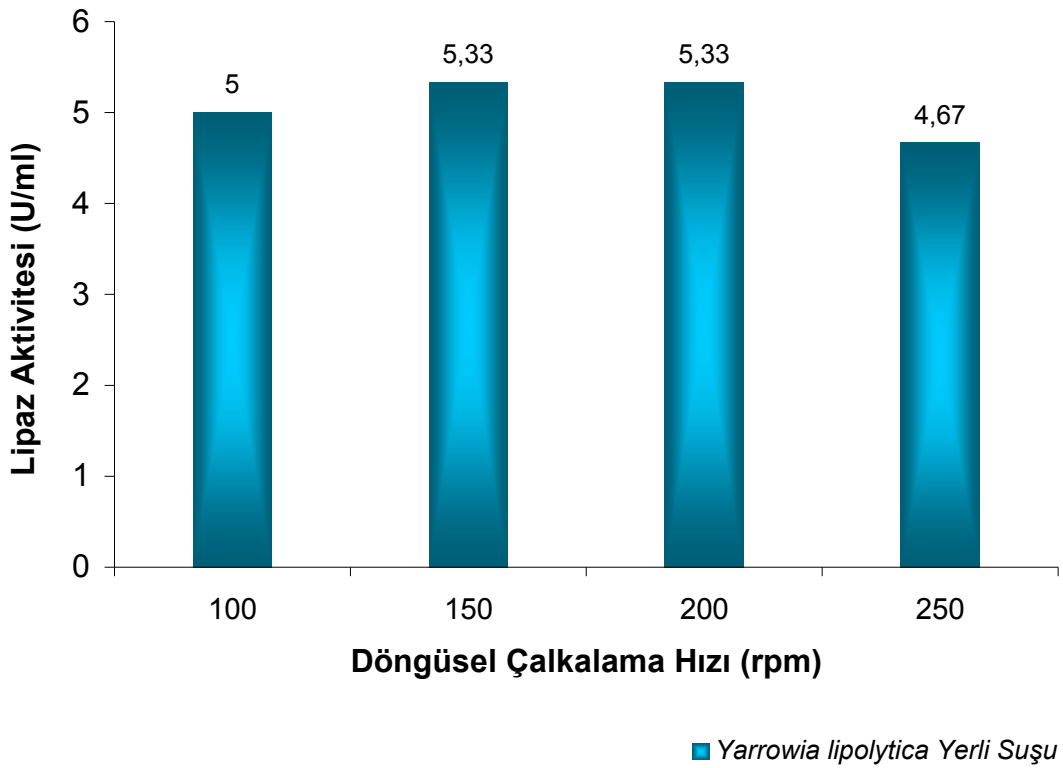
*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek lipaz aktivitesi 200 rpm'de (6,17 U/ml), *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda en yüksek lipaz aktivitesi 200 rpm'de (5,50 U/ml), *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda en yüksek lipaz aktivitesi 150 ve 200 rpm'de (5,33 U/ml) ve *Candida tropicalis* suşunda en yüksek lipaz aktivitesi 100 rpm'de (6,00 U/ml) saptandı (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. Üretim ortamı aerasyon hızının lipaz aktivitesine etkisi.

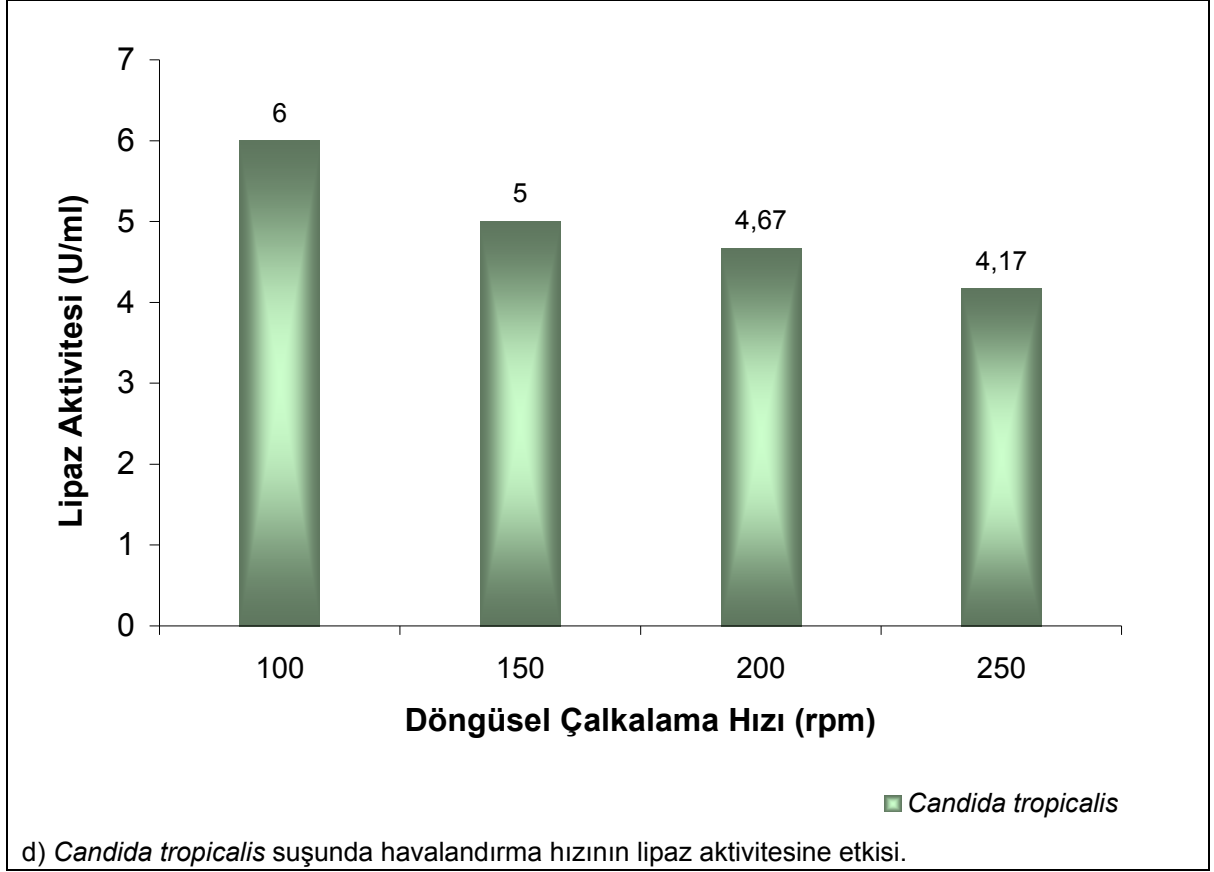


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda havalandırma hızının lipaz aktivitesine etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda havalandırma hızının lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.22. Devamı... Üretim ortamı aerasyon hızının lipaz aktivitesine etkisi.



Şekil 4.22. Devamı... Üretim ortamı aerasyon hızının lipaz aktivitesine etkisi.

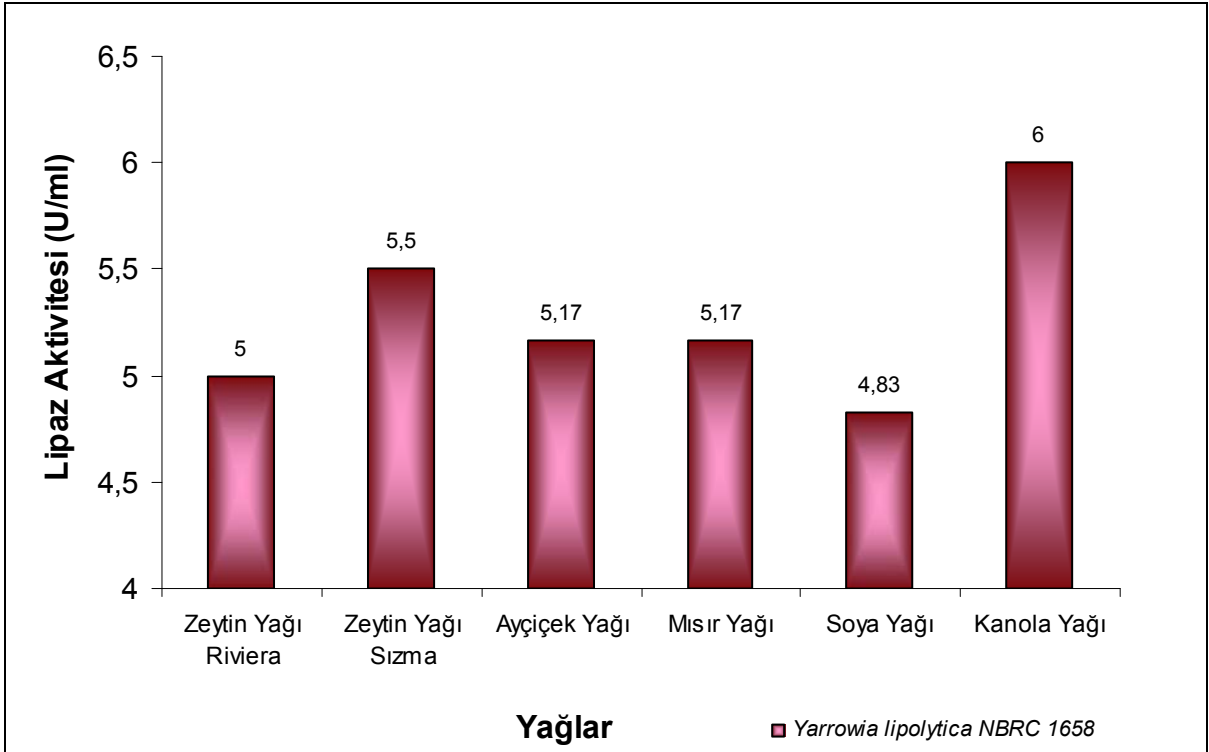
#### 4.6.8. Karbon kaynağının lipaz aktivitesine etkisi

Farklı karbon kaynaklarının lipaz üretimine ve üremeye etkisini araştırmak amacıyla farklı karbon kaynakları içeren lipaz üretim besiyeri hazırlandı.

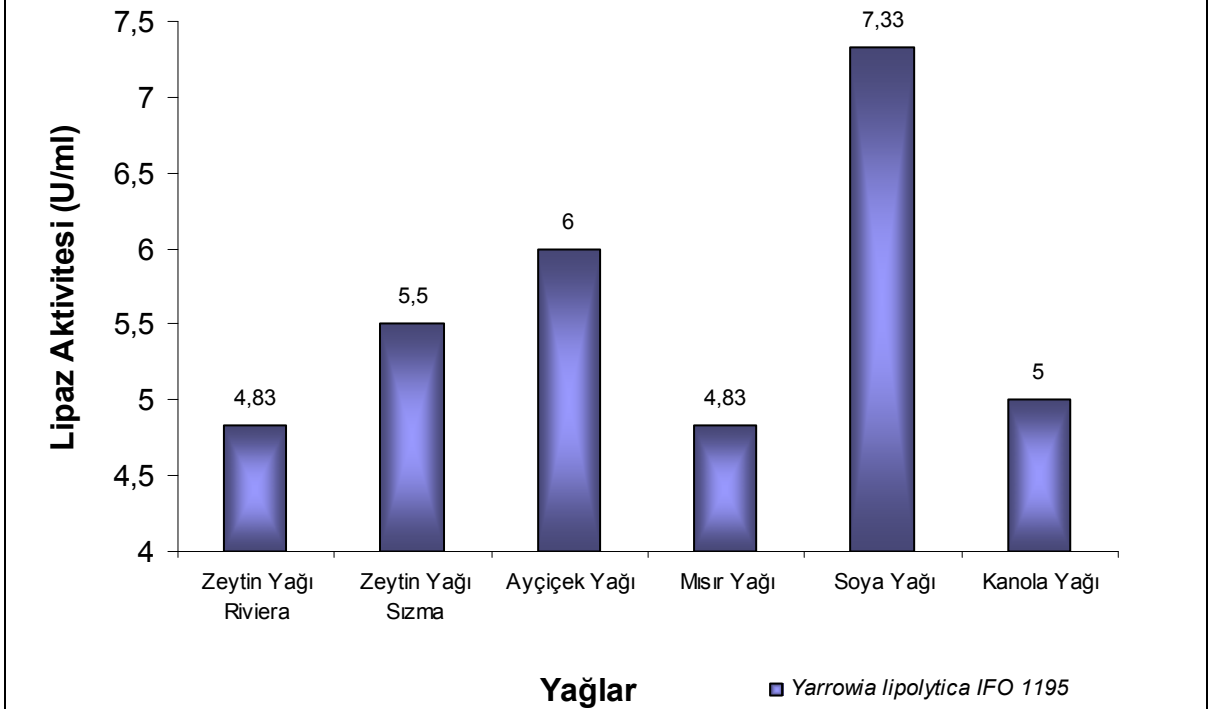
Öncelikle karbon kaynağı olarak farklı yağların lipaz üretimine ve üremeye etkisi araştırıldı. Her bir besiyerine karbon kaynağı olarak ayrı ayrı %1 riviera zeytinyağı, %1 sızma zeytinyağı, %1 ayçiçek yağı, %1 mısır yağı, %1 soya yağı ve %1 kanola yağı ilave edildi. Daha sonra *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* üretimi sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, süzüntülerde lipaz aktivite tayini yapıldı. Elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.23.).

En yüksek aktivite *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda kanola yağında (6,0 U/ml) ve sızma zeytin yağında (5,5 U/ml), *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda soya yağında (7,33 U/ml) ve ayçiçek yağında (6,0 U/ml), *Y. lipolytica* Yerli Suşunda sızma zeytin yağı, mısır yağı, soya yağı ve kanola yağında (5,17 U/ml) ve *Candida*

*tropicalis* suşunda soya yağında (5,33 U/ml) ve riviera zeytin yağı, ayçiçek yağı ve kanola yağında (5,17 U/ml) saptandı (Şekil 4.23.).



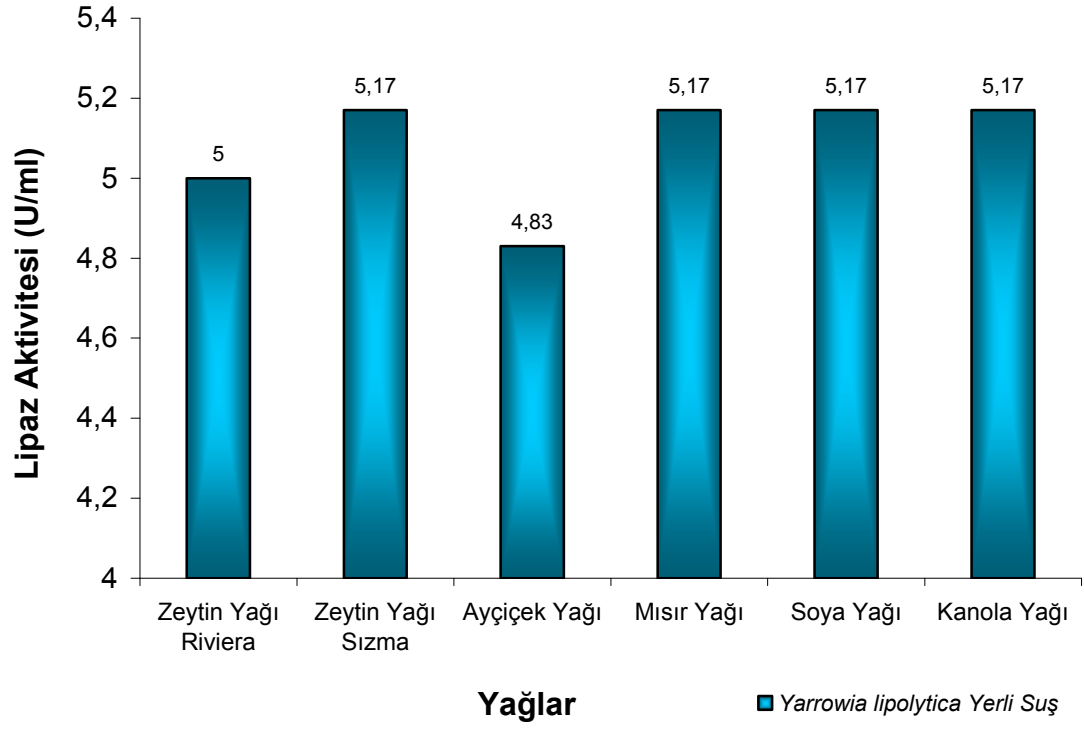
a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı yağların lipaz aktivitesine etkisi.



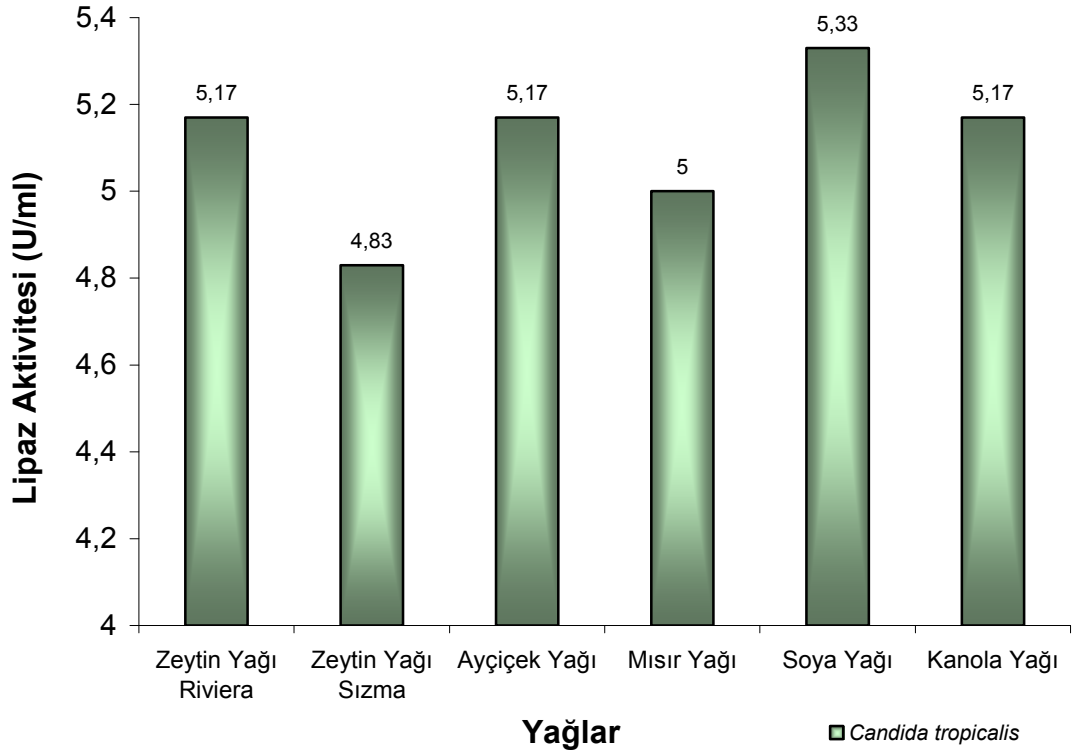
b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı yağların lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.23. Farklı yağların lipaz aktivitesine etkisi.





c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda farklı yağların lipaz aktivitesine etkisi.

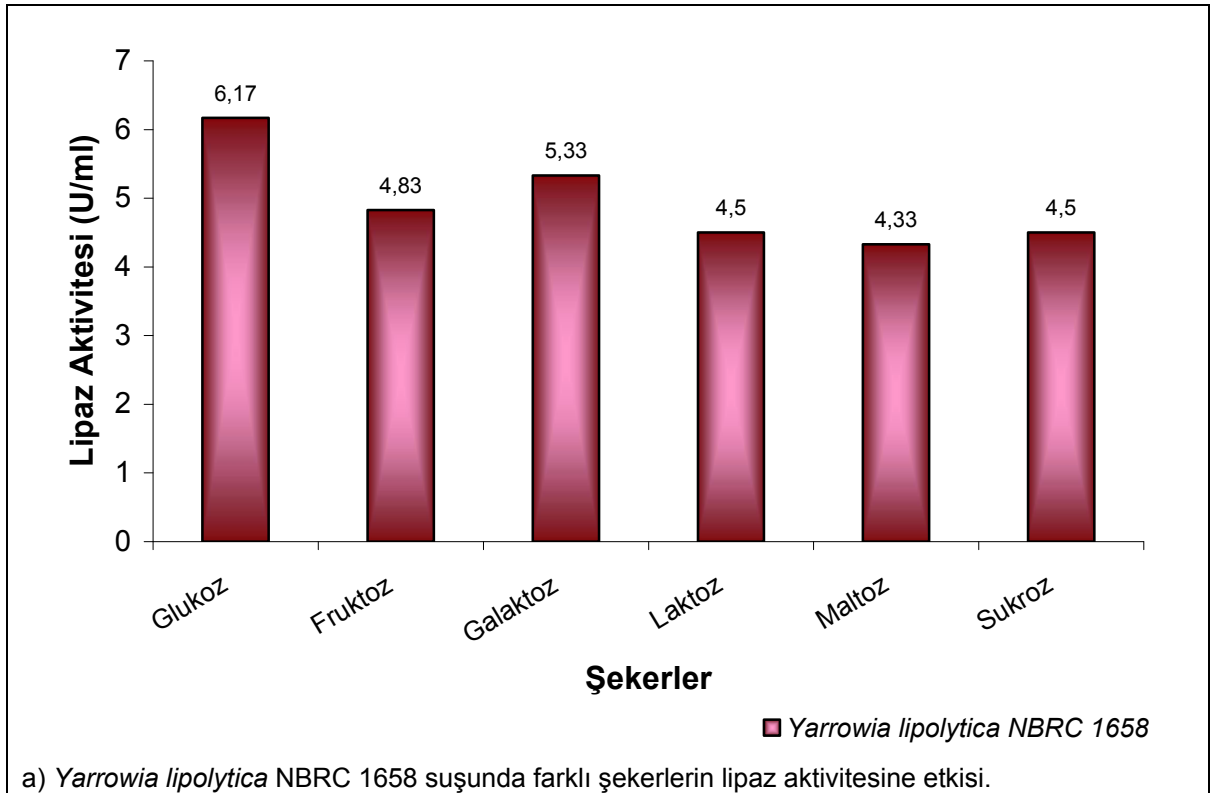


d) *Candida tropicalis* suşunda farklı yağların lipaz aktivitesine etkisi.

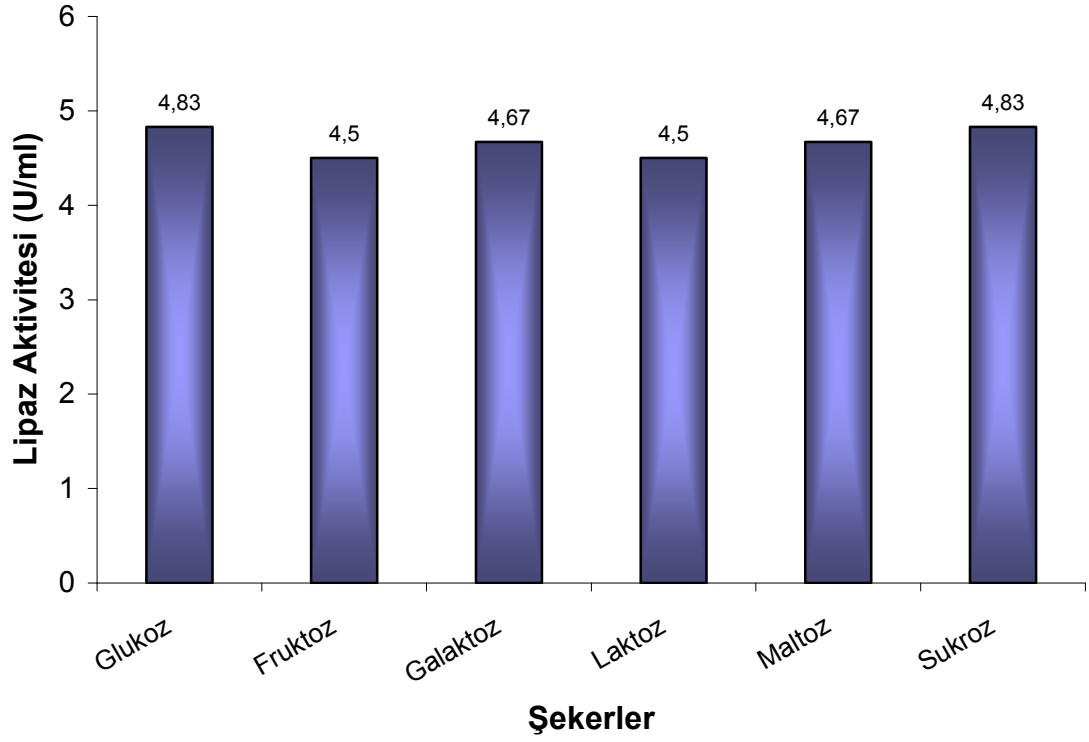
Şekil 4.23. Devamı... Farklı yağların lipaz aktivitesine etkisi.

Daha sonra karbon kaynağı olarak şekerlerin lipaz üretimine etkisi araştırıldı ve her bir besiyerine karbon kaynağı olarak ayrı ayrı %1 glukoz, %1 galaktoz, %1 fruktoz, %1 laktoz, %1 maltoz ve %1 sukroz ilave edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis*'in üretimi sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, süzüntülerde lipaz aktivite tayini yapıldı. Elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.24.).

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek lipaz aktivitesine 6,17 U/ml olarak glukoz varlığında saptanırken galaktoz varlığında da iyi aktivite (5,33 U/ml) gözlemlendi. *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda glukoz ve sukroz bulunan ortamda en yüksek lipaz aktivitesi 4,83 U/ml olarak saptandı, galaktoz ve maltoz içeren ortamlarda da aktivitenin yüksek olduğu saptandı. *Y. lipolytica* Yerli Suşunda ise laktoz içeren ortamda en yüksek aktivite 5,17 U/ml olarak saptandı. Laktoz içeren ortamlarda üremenin çok az gözlenmesine rağmen aktivitenin yüksekliği mayanın stress koşullarına bağlı olarak besiyerindeki peptonu kullanarak lipaz aktivitesini artırdığı yorumu yapıldı. *Candida tropicalis* suşunda ise *Yarrowia* Yerli Suşunda olduğu gibi laktoz içeren ortamda en yüksek lipaz aktivitesi (5,67 U/ml) saptandı (Şekil 4.24.).

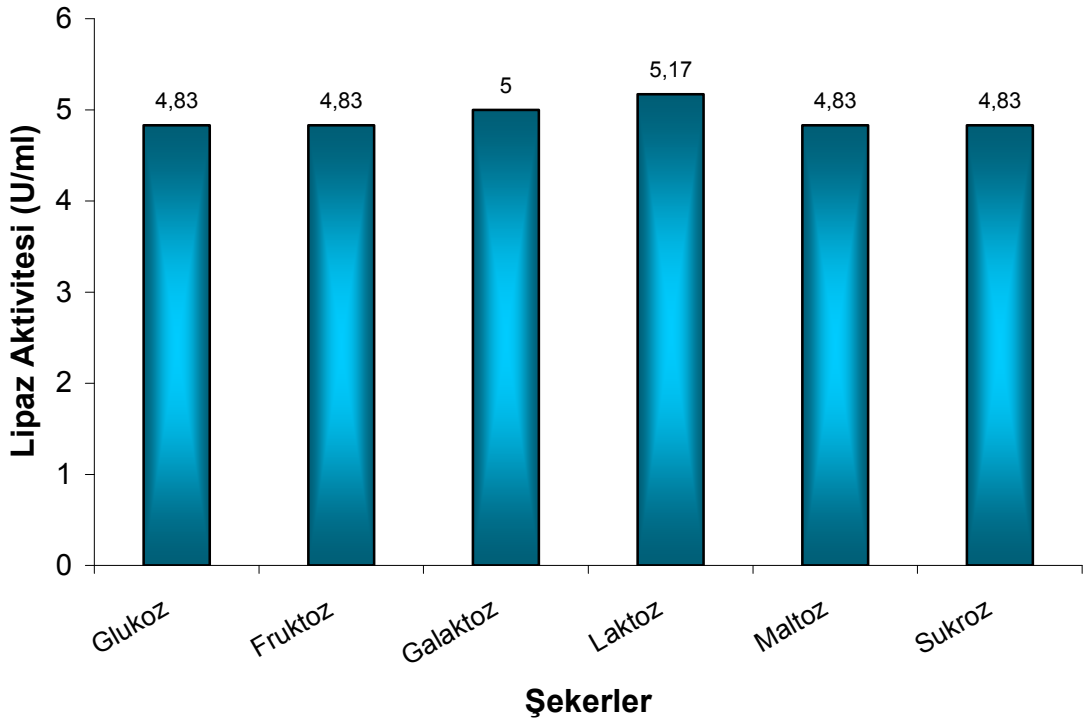


Şekil 4.24. Farklı mono ve disakkaritlerin lipaz aktivitesine etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* IFO 1195

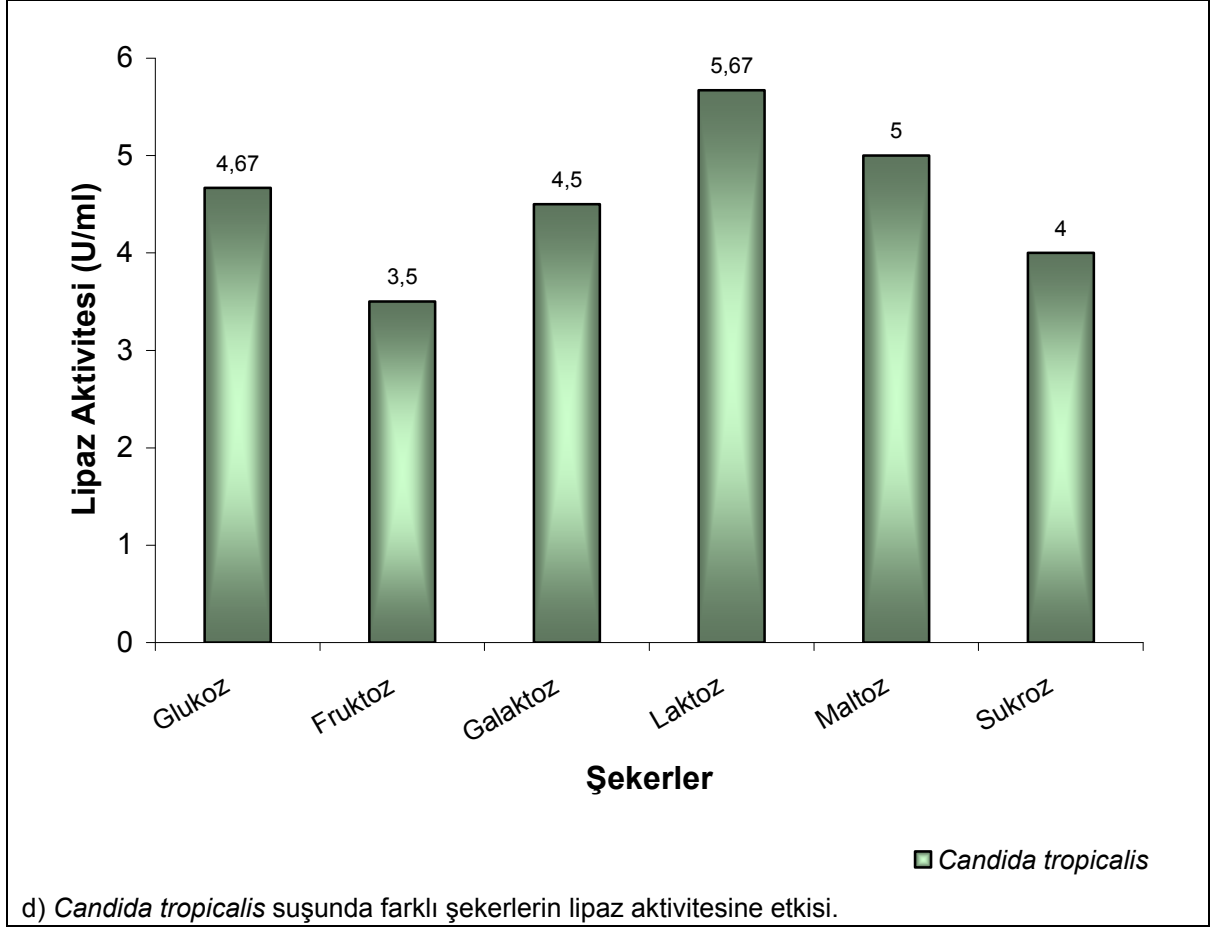
b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı şekerlerin lipaz aktivitesine etkisi.



■ *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu

c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda farklı şekerlerin lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.24. Devamı... Farklı mono ve disakkaritlerin lipaz aktivitesine etkisi.

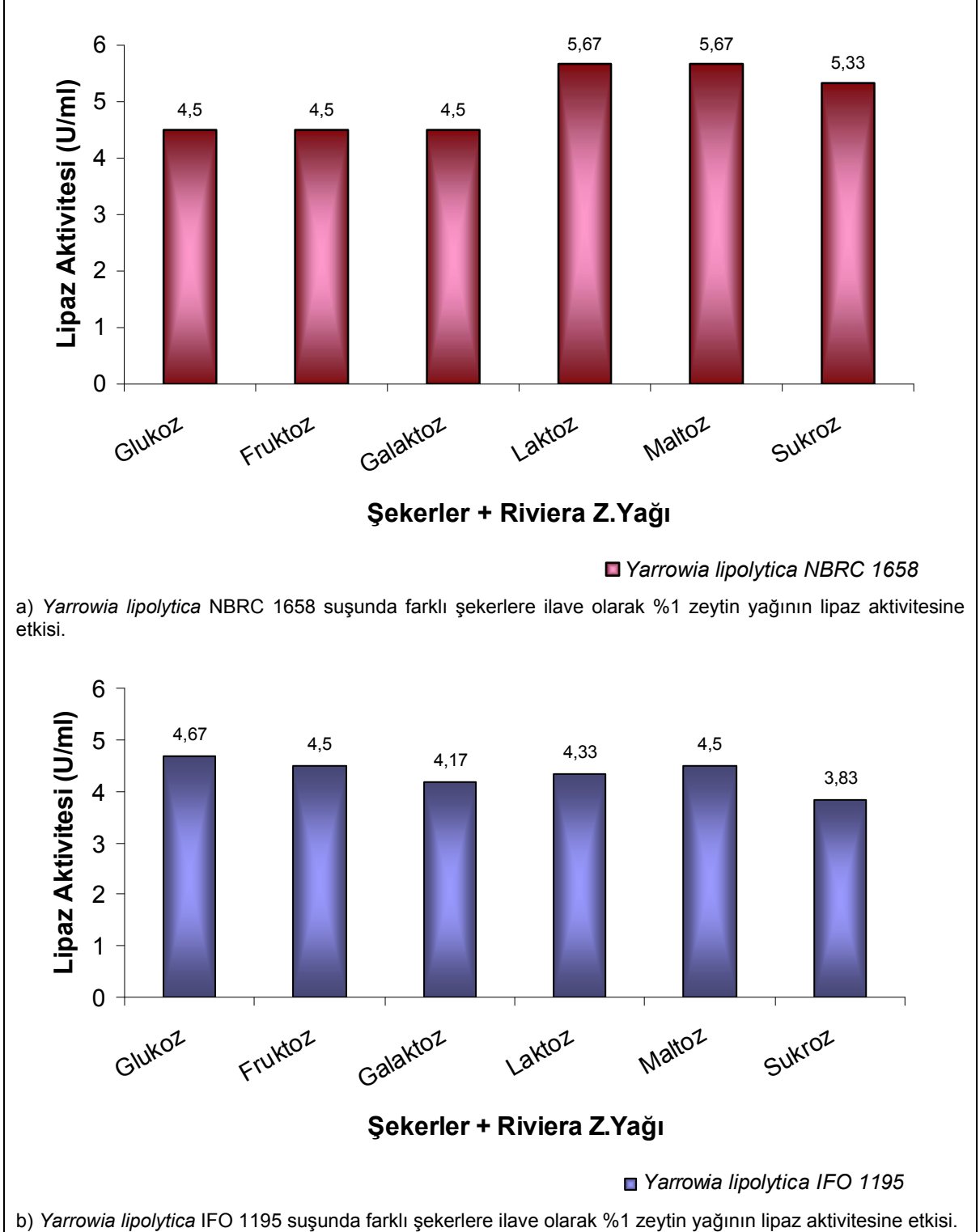


Şekil 4.24. Devamı... Farklı mono ve disakkaritlerin lipaz aktivitesine etkisi.

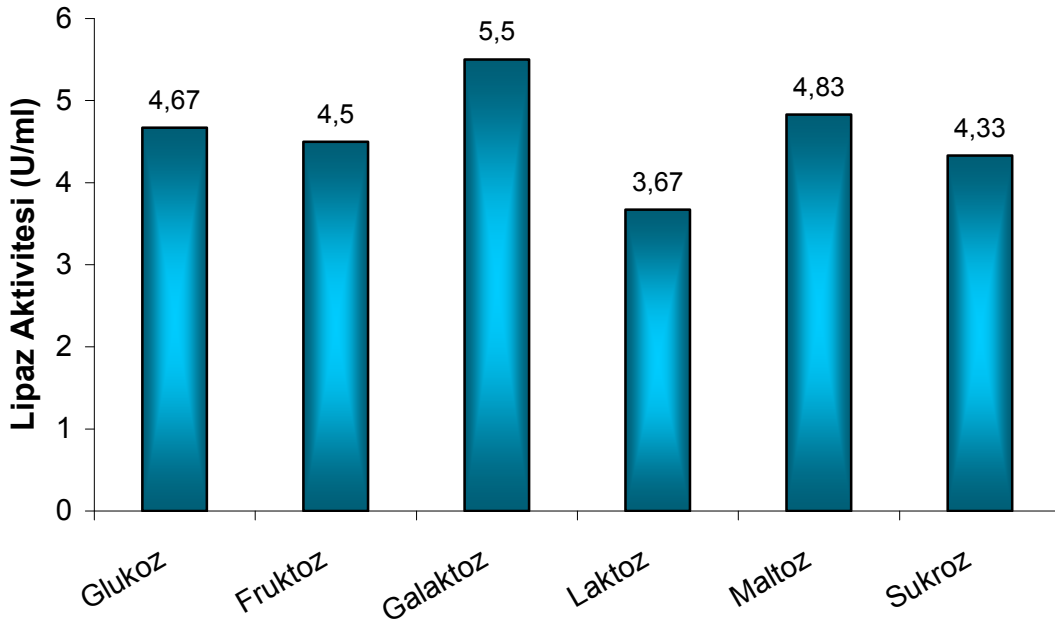
Son olarak da karbon kaynağı olarak şeker ve riviera zeytin yağı aynı lipaz üretim ortamına eklenerek lipaz üretimine etkisi araştırıldı. Üretim sonrasında örnekler Whatman no:1 kağıdından süzüldü, süzüntülerde lipaz aktivite tayini yapıldı. Elde edilen veriler grafiklendi (Şekil 4.25.).

Üretim ortamına farklı şekerlere ilave olarak riviera zeytin yağı ilave edildiğinde, zeytin yağının etkisiyle lipaz aktivitesinin değiştiği saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek aktivite öncelikle 5,67 U/ml olarak laktoz, maltoz ve zeytin yağı içeren ortamda, sonrasında 5,33 U/ml olarak sukroz ve zeytin yağı içeren ortamda saptandı. Ancak üretim ortamına %1 riviera zeytin yağı ilave edildiğinde zeytin yağsız ortama göre glukozun aktiviteyi düşürdüğü (6,17 U/ml ve 4,5 U/ml) belirlendi. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda en yüksek glukoz ve zeytin yağı içeren ortamda 4,67 U/ml olarak saptandı. Zeytin yağı ilavesinin lipaz üretimini artırmadığı hatta azalttığı tespit edildi. *Yarrowia lipolytica* Yerli suşunda en yüksek galaktoz ve zeytin yağı içeren ortamda 5,5 U/ml, sonrasında maltoz ve

zeytin yağı içeren ortamda 4,83 U/ml olarak saptandı. Son olarak da *Candida tropicalis* suşunda 4,67 U/ml olarak sukroz ve zeytin yağı içeren ortamda en yüksek lipaz aktivite değeri saptandı. Sonuç olarak şeker içeren ortama ilave edilen yağın lipaz üretimini artırmadığı gözlemlendi (Şekil 4.25.).



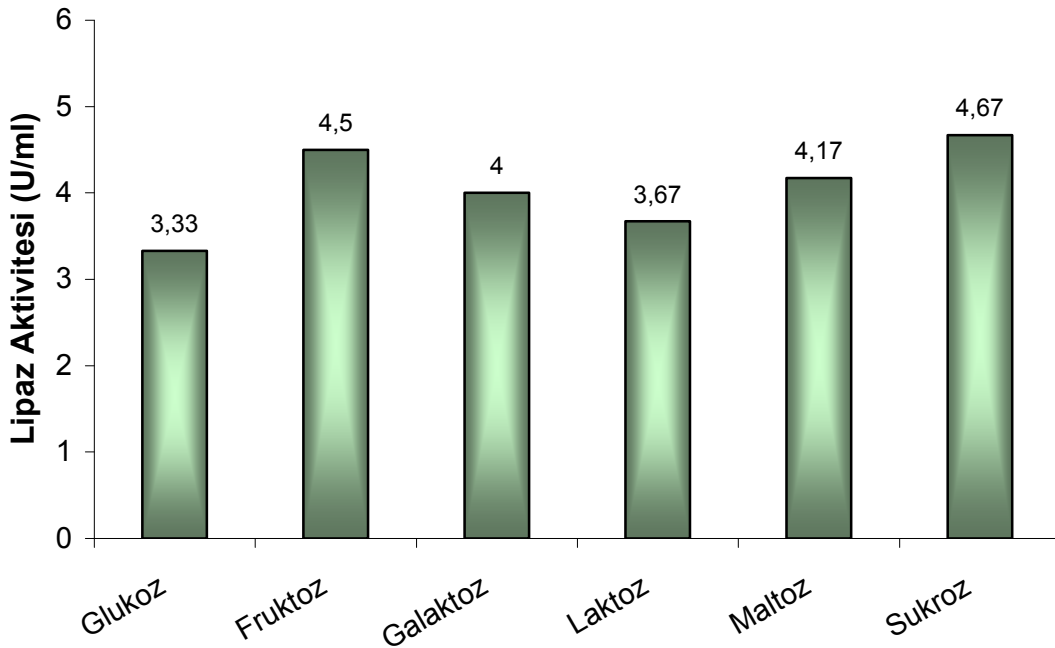
Şekil 4.25. Mono-disakkaritlere ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.



#### Şekerler + Riviera Z.Yağı

■ *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu

c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda farklı şekerlere ilave olarak %1 zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.



#### Şekerler + Riviera Z.Yağı

■ *Candida tropicalis*

d) *Candida tropicalis* suşunda farklı şekerlere ilave olarak %1 zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.25. Devamı... Mono-disakkaritlere ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi

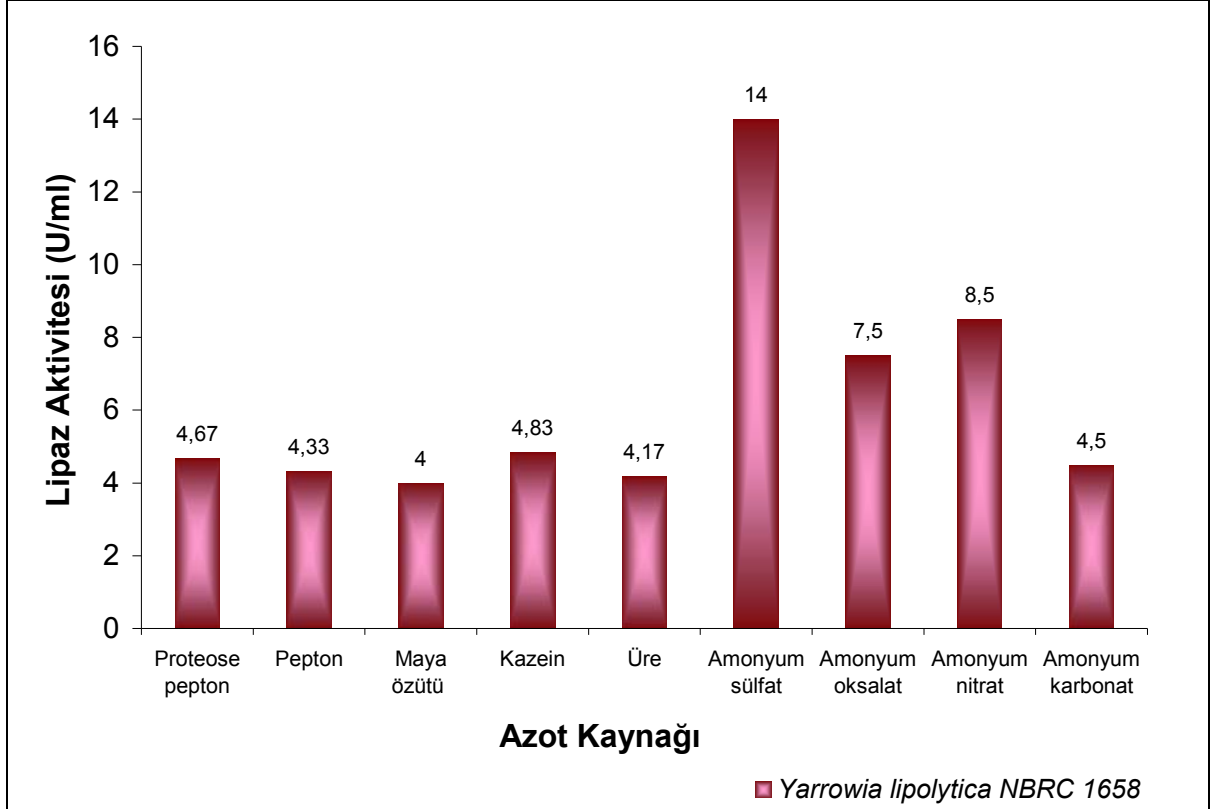
#### 4.6.9. Azot kaynağının lipaz aktivitesine etkisi

Azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisi araştırıldı. Lipaz üretim besiyerlerine ayrı ayrı %1 proteose peptone no:3, %1 pepton, %1 maya özütü, %1 kazein, %1 üre, %1 amonyum sülfat, %1 amonyum oksalat, %1 amonyum nitrat ve %1 amonyum karbonat eklendi ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Y. lipolytica* IFO 1195, *Y. lipolytica* Yerli Suşu ve *Candida tropicalis* suşlarının üretimi sonrasında besiyerleri Whatman no:1 kağıdından süzülerek süpernatantları elde edildi. Süpernatantlarda lipaz aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerler grafiklendi (Şekil 4.26.).

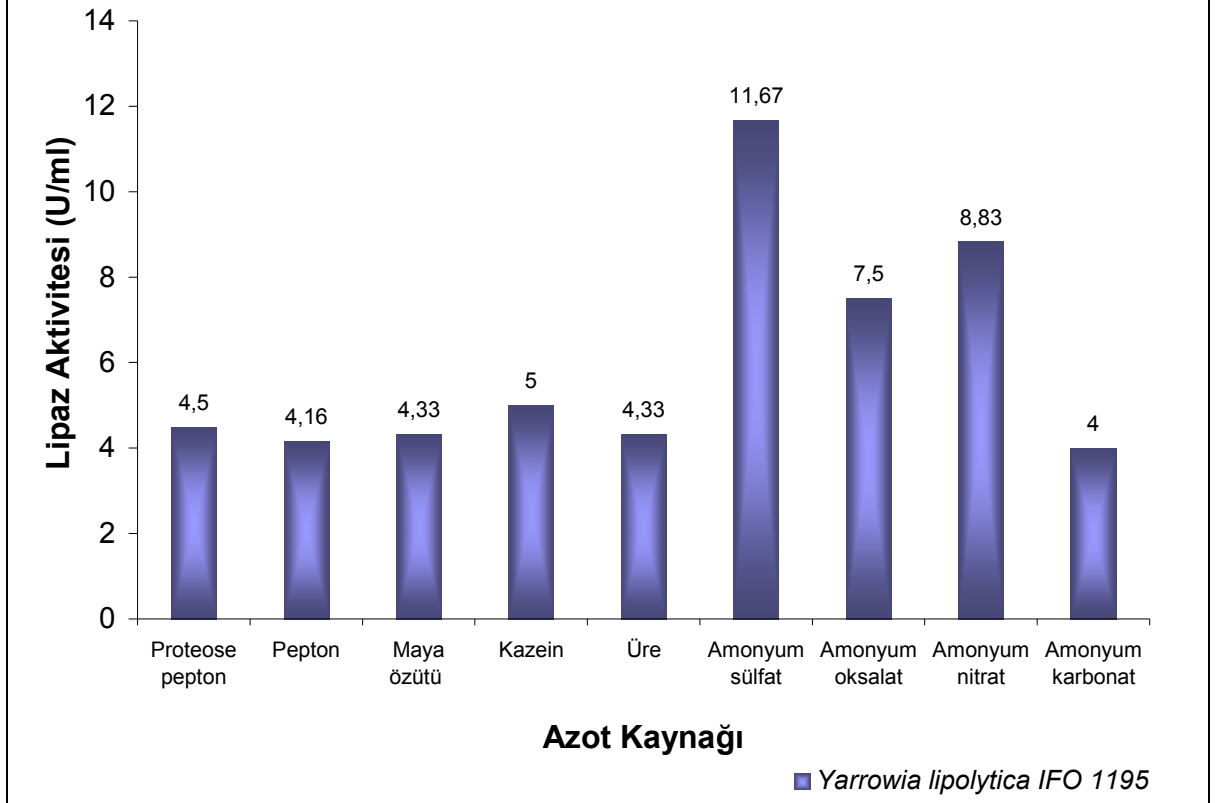
*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek lipaz aktivitesine 14,0 U/ml, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda 11,67 U/ml, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 10,67 U/ml ve *Candida tropicalis* suşunda 10,33 U/ml olarak amonyum sülfat içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en düşük lipaz aktivitesine 4,0 U/ml olarak maya özütü içeren ortamlarda, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda 4,0 U/ml olarak amonyum karbonatlı ortamlarda, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 3,5 U/ml olarak peptonlu ortamlarda ve *Candida tropicalis* suşunda 4,5 U/ml olarak maya özütü, kazein ve amonyum karbonatlı ortamlarda tespit edildi (Şekil 4.26.).

Ayrıca yukarıda bahsedilen azot kaynaklarını içeren ortamlara %1 riviera zeytin yağı ilave edilerek lipaz üretimi araştırıldı (Şekil 4.27.).

*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek lipaz aktivitesine 16,0 U/ml, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda 10,17 U/ml, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 9,5 U/ml ve *Candida tropicalis* suşunda 10,67 U/ml olarak amonyum sülfat ve riviera zeytin yağı içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en düşük lipaz aktivitesine 4,83 U/ml olarak pepton - maya özütüne ilave olarak riviera zeytin yağı içeren ortamlarda, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda 4,67 U/ml olarak riviera zeytin yağı ilave edilmiş üreli ve peptonlu ortamlarda, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 4,67 U/ml olarak riviera zeytin yağı ilave edilmiş peptonlu ortamlarda ve *Candida tropicalis* suşunda 4,5 U/ml olarak riviera zeytin yağı ilave edilmiş kazeinli ortamlarda tespit edildi (Şekil 4.27.).



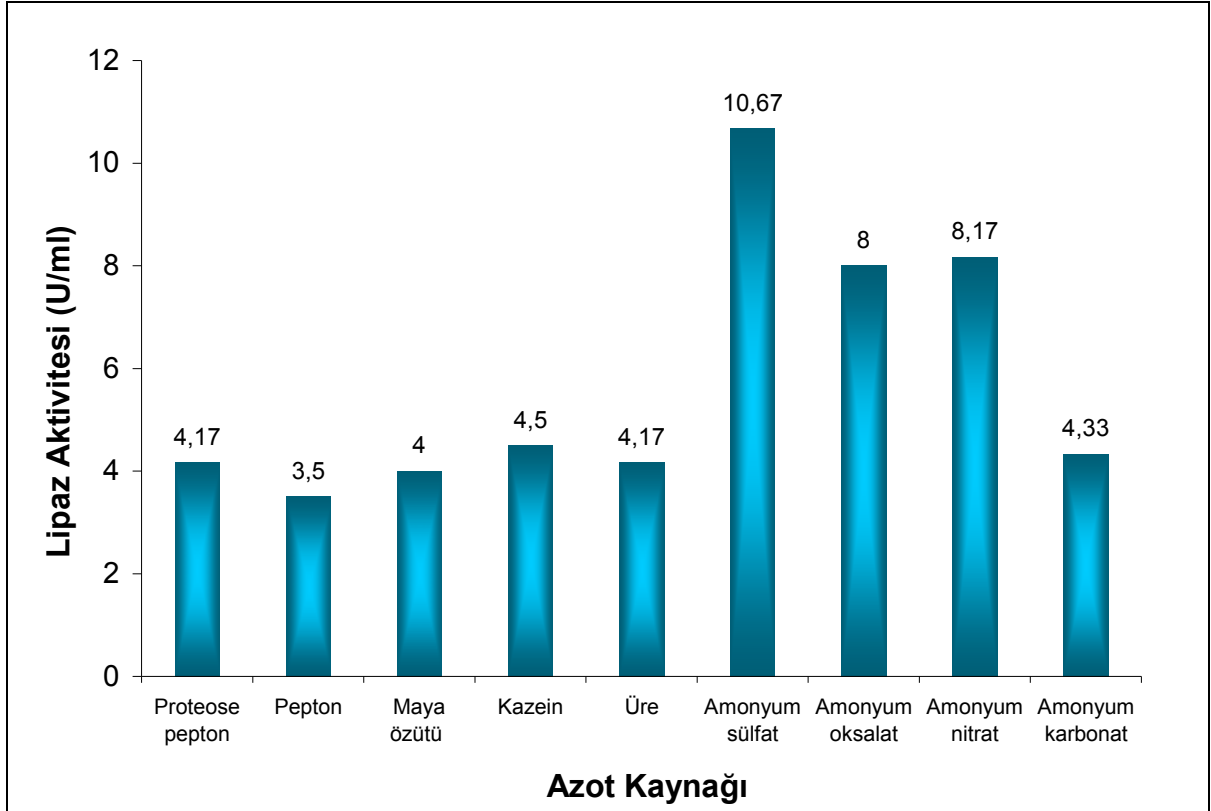
a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi.



b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi.

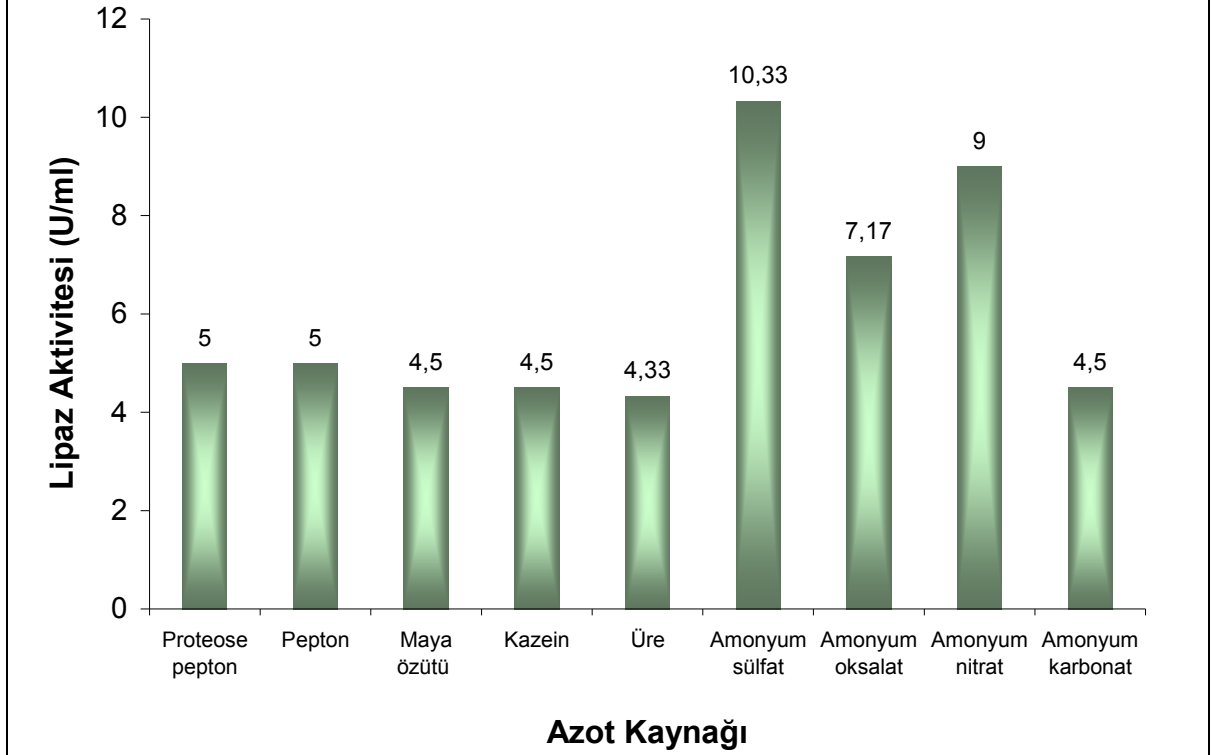
Şekil 4.26. Farklı azot kaynaklarının lipaz sentezine etkisi.





■ *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu

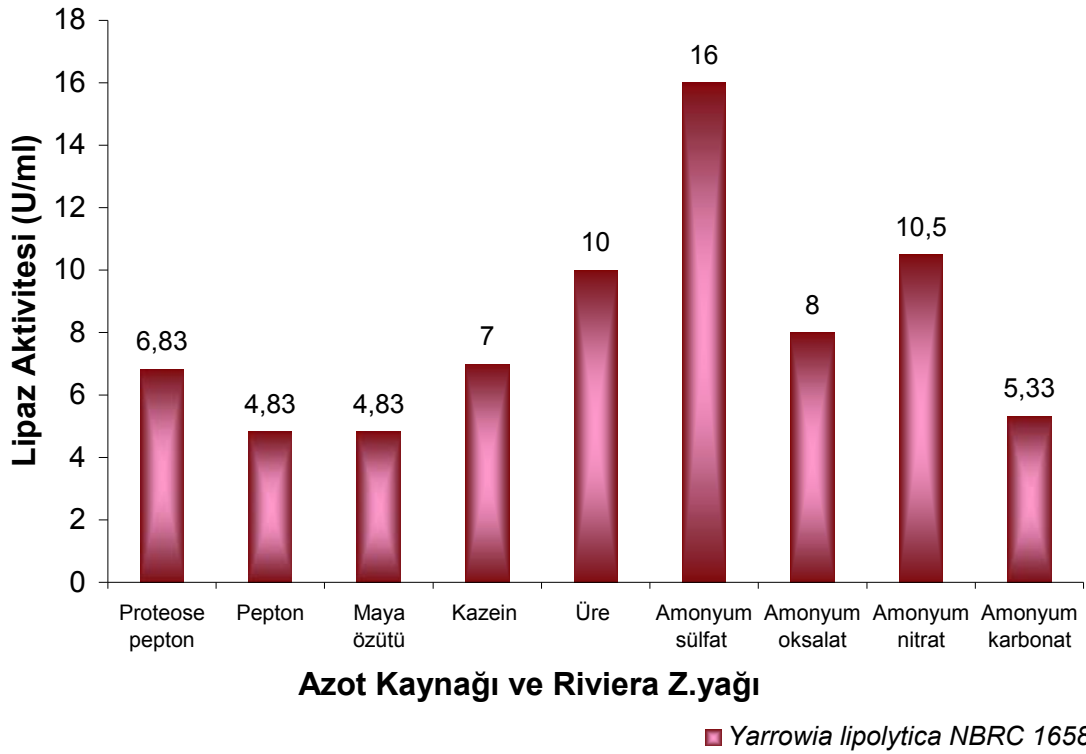
c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda farklı azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi.



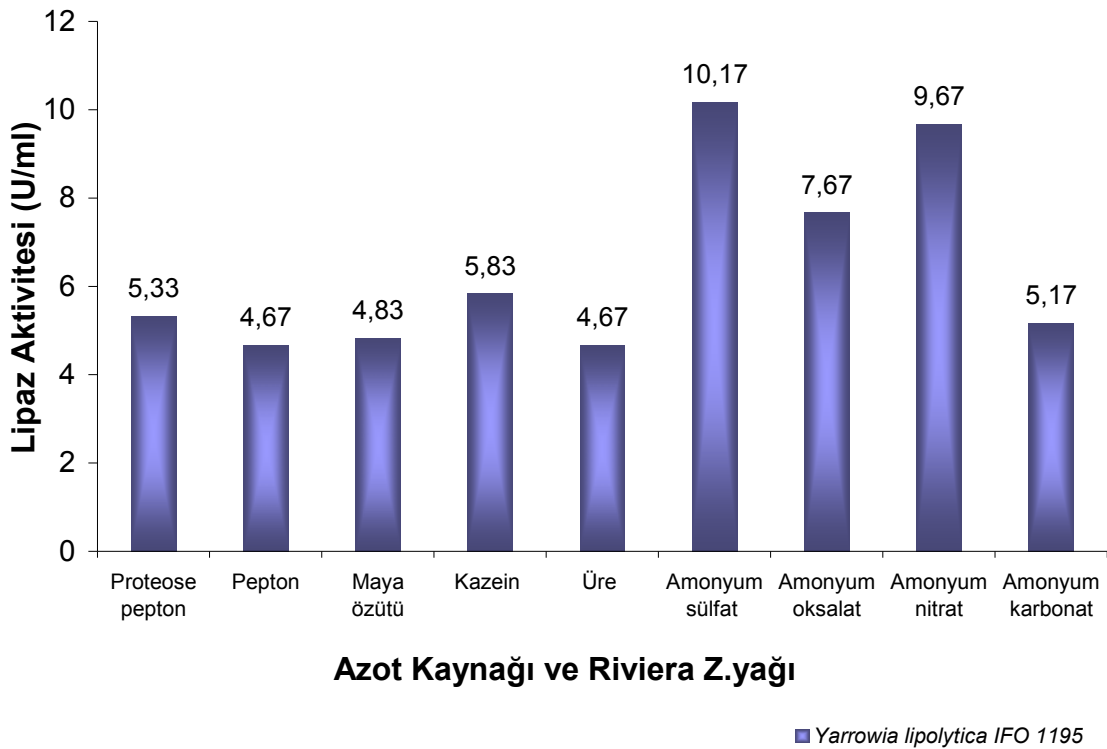
■ *Candida tropicalis*

d) *Candida tropicalis* suşunda farklı azot kaynaklarının lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.26. Devamı... Farklı azot kaynaklarının lipaz sentezine etkisi.

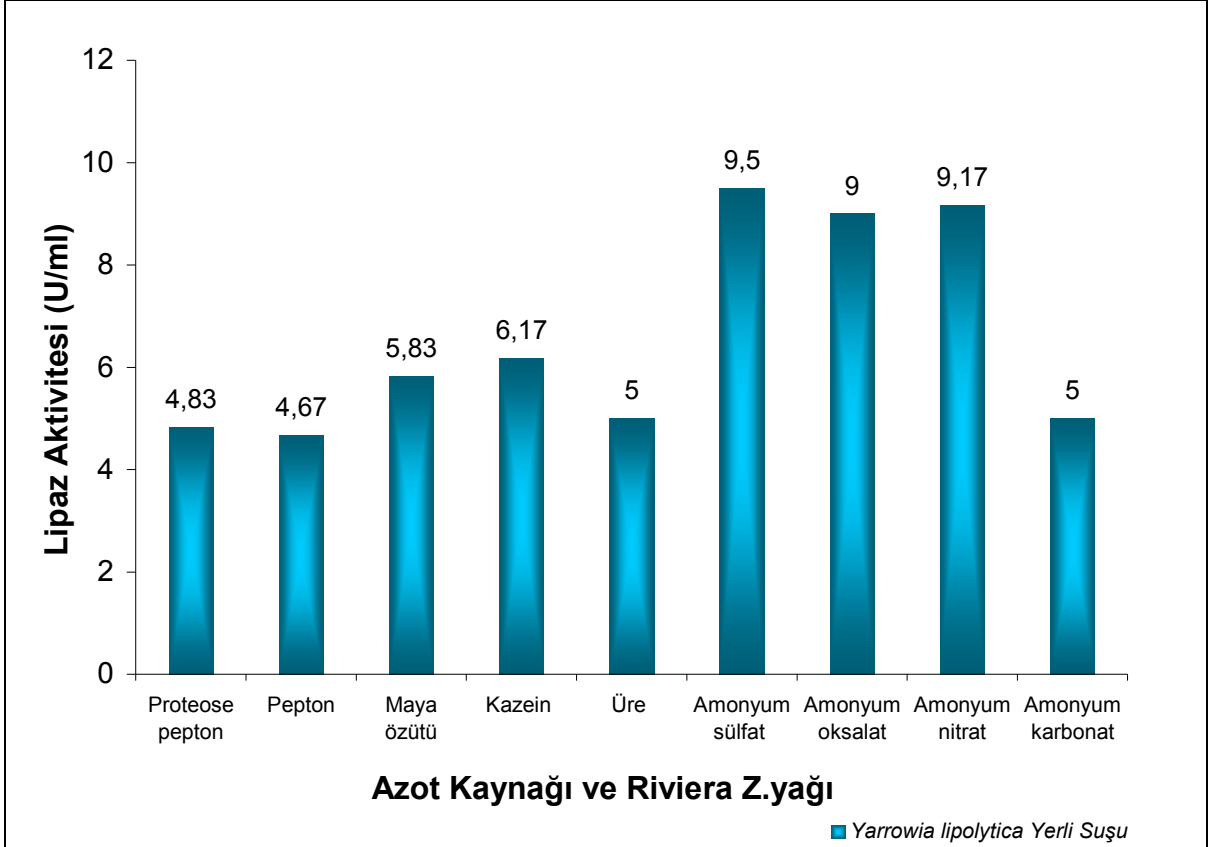


a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı azot kaynaklarına ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.

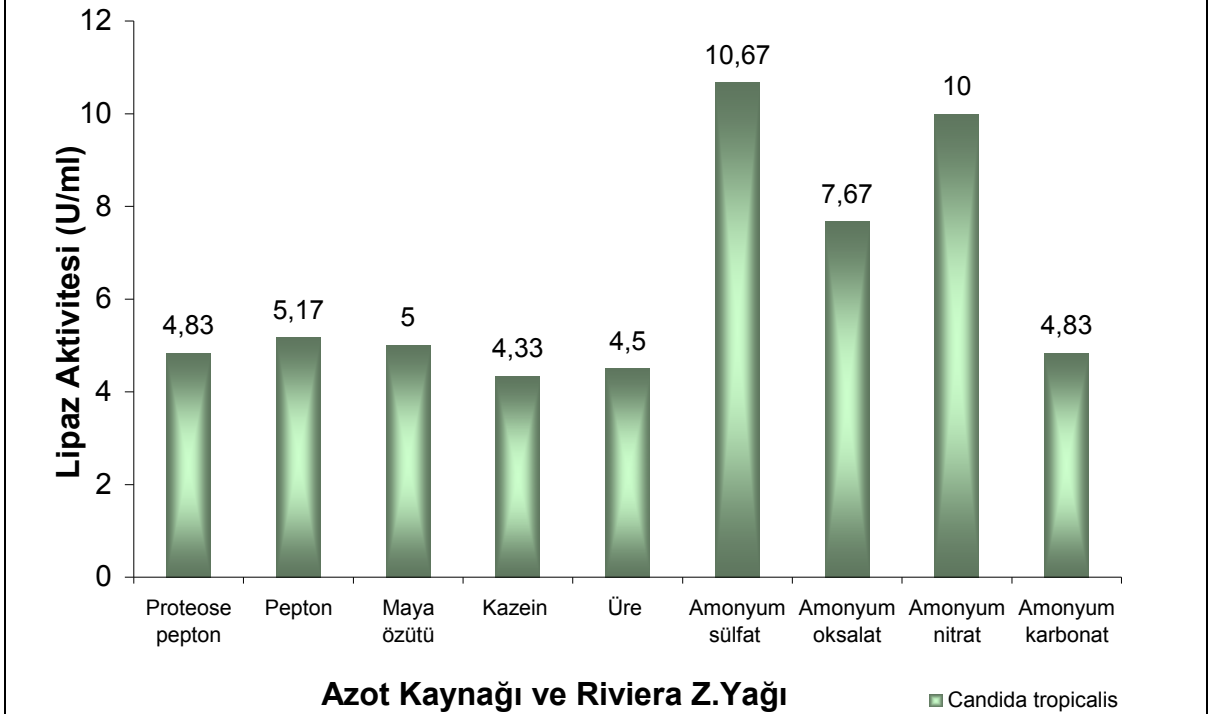


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı azot kaynaklarına ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.27. Farklı azot kaynaklarına ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda farklı azot kaynaklarına ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.



d) *Candida tropicalis* suşunda farklı azot kaynaklarına ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.27. Devamı... Farklı azot kaynaklarına ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.

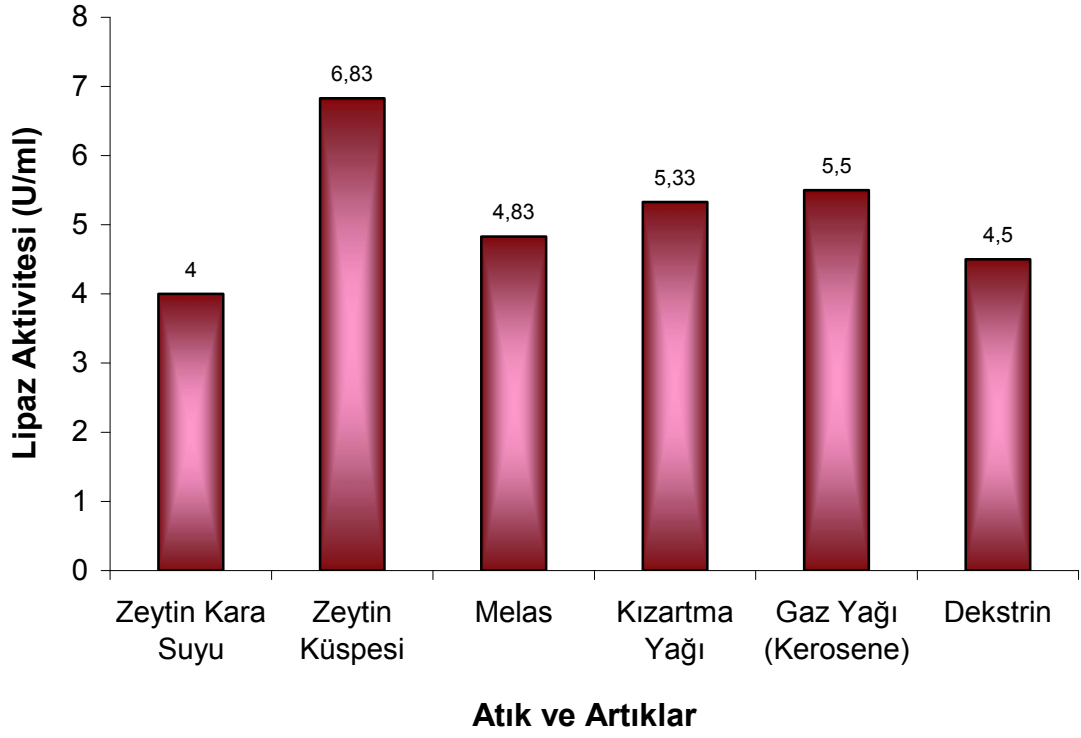
Tüm maya suşlarında elde edilen sonuçlara göre azot kaynaklarından en fazla lipaz üretimini artıran bileşiğin amonyum sülfat olduğu tespit edildi ancak amonyum oksalat ve amonyum nitrat içeren üretim ortamlarında da yüksek aktivite saptandı, diğer azotlu bileşiklerin lipaz üretimini fazla artırmadığı gözlemlendi.

#### **4.6.10. Çeşitli atık-artıklar ve lipaz üretimini artıran maddelerin enzim aktivitesine etkisi**

Çeşitli atık ve artıkların lipaz üretimine etkisinin tespiti amacıyla lipaz üretim besiyerlerine atık ve atık-artık olarak ayrı ayrı %1 zeytin kara suyu, %1 zeytin küspesi, %1 melas, ve %1 kızartma yağı, ayrıca lipaz üretimini artırdığı belirtilen %1 gaz yağı (kerosene) ve %1 dekstrin de eklendi. Ayrıca bir diğer besiyerlerine (kızartma yağı ve gaz yağı hariç) bu atık ve artıklara ilave olarak %1 riviera zeytin yağı eklendi. İnkübasyon sonrasında kültürler Whatman no:1 kağıdından süzülerek süpernatantlarda lipaz aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerler grafiklendi (Şekil 4.28.) ve (Şekil 4.29.).

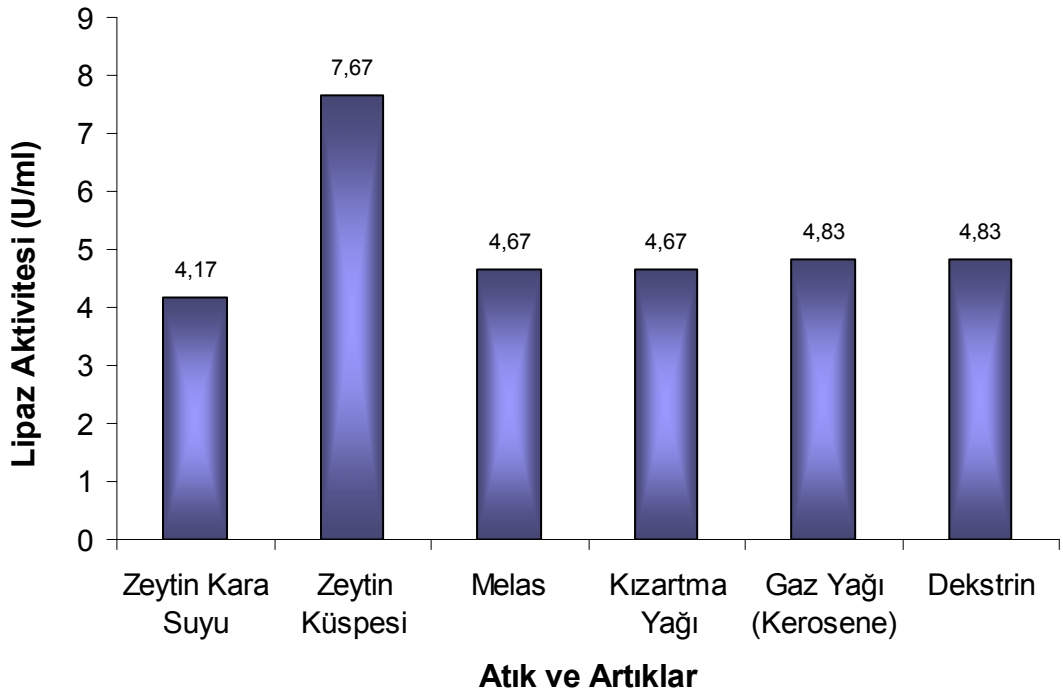
*Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek lipaz aktivitesi zeytin küspesi içeren ortamda (6,83 U/ml), sonrasında ise gaz yağı (5,5 U/ml) ve kızartma yağı (5,33 U/ml) içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda, *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda ve *Candida tropicalis* suşunda en yüksek lipaz aktivitesine zeytin küspesi içeren ortamda sırasıyla 7,67 U/ml, 7,33 U/ml, 8,17 U/ml olarak saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195, *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda ve *Candida tropicalis* suşunda en düşük lipaz aktivitesine ise zeytin karasuyu içeren ortamlarda saptandı (Şekil 4.28.).

Zeytin karasuyu, zeytin küspesi, dekstrin ve melas içeren ortamlara ilave olarak %1 riviera zeytin yağı içeren ortamlarda ilave edilen zeytin yağının lipaz aktivitesini etkilemediği hatta zeytin küspesi içeren ortamlara ilave edilen riviera zeytin yağının lipaz aktivitesini düşürdüğü saptandı (Şekil 4.29.).



■ *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658

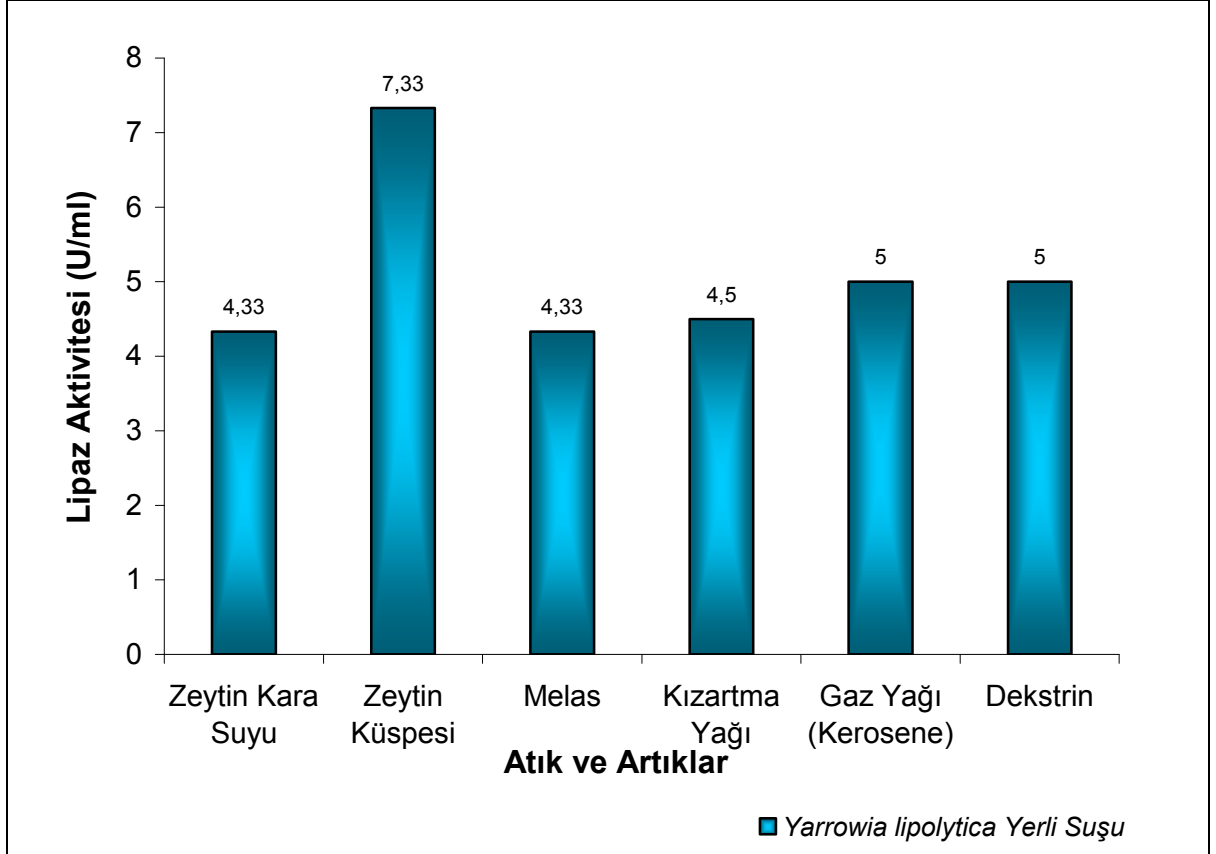
a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı atık ve artıkların lipaz aktivitesine etkisi.



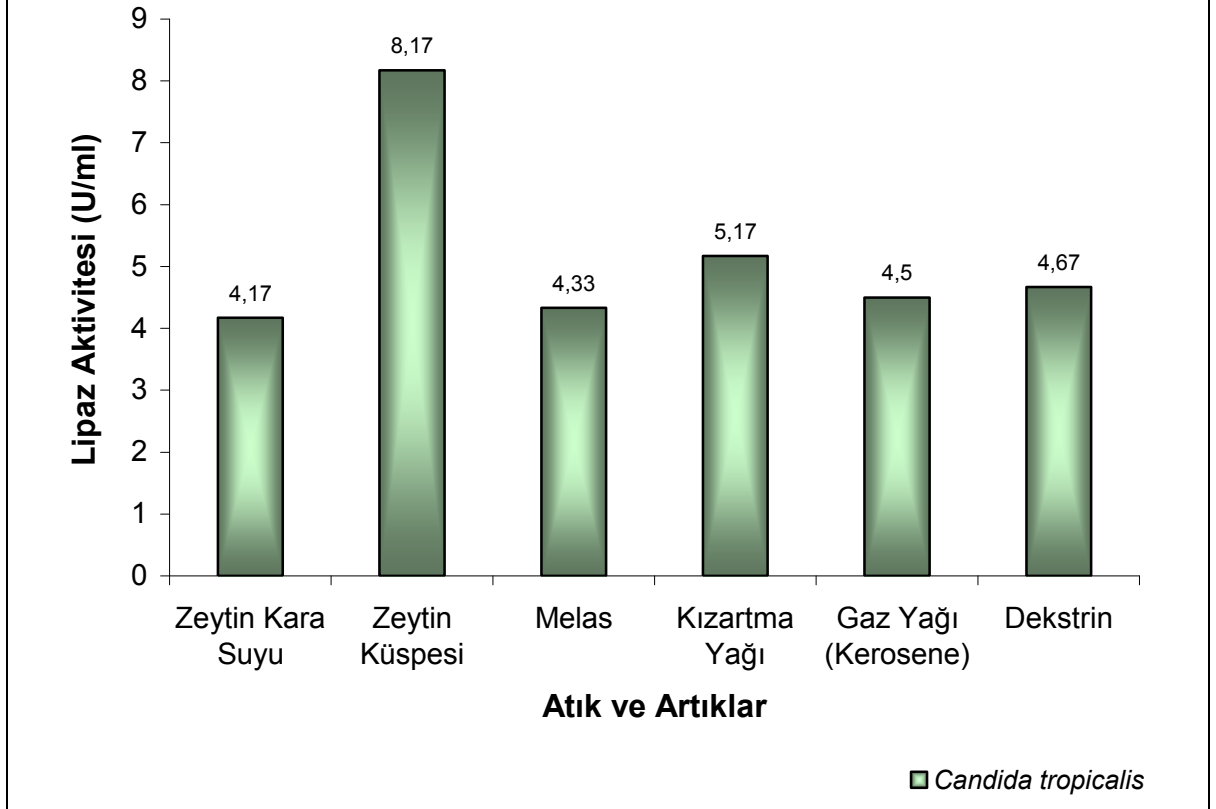
■ *Yarrowia lipolytica* IFO 1195

b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı atık ve artıkların lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.28. Çeşitli atık-artıkların lipaz aktivitesine etkisi.

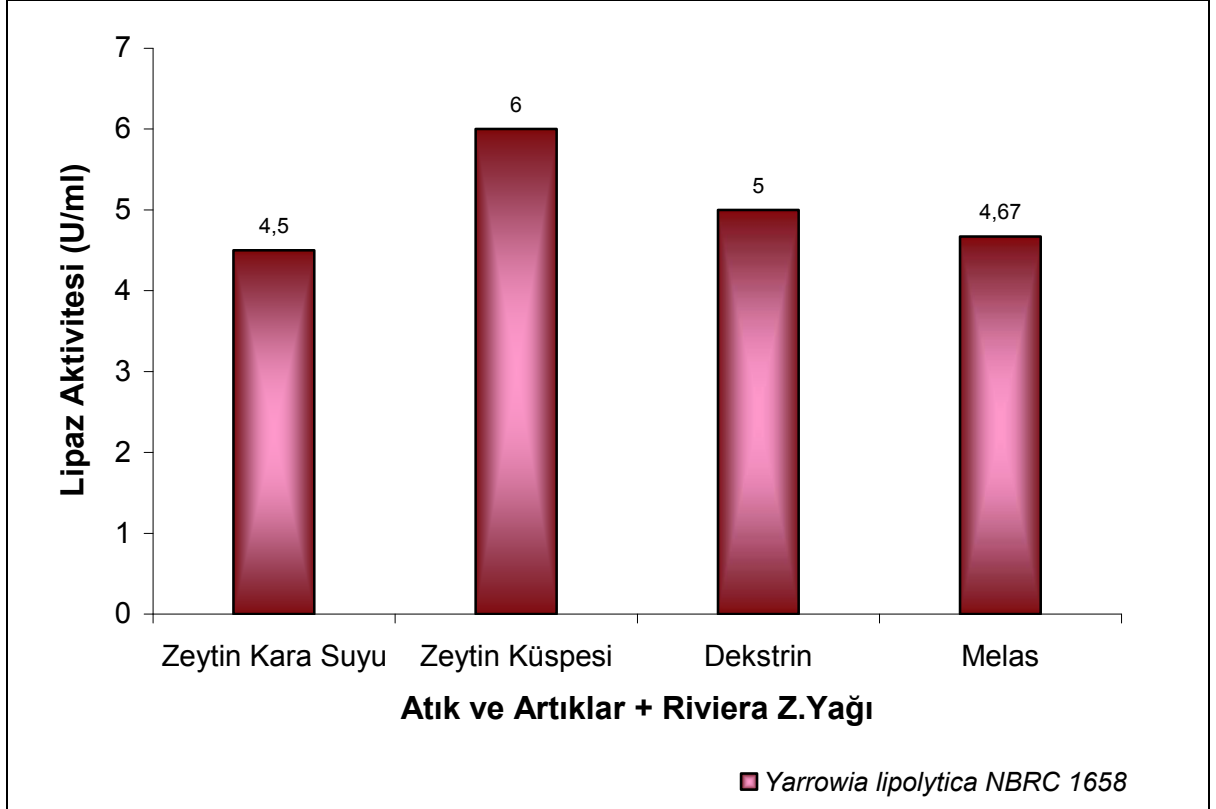


c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda farklı atık ve artıkların lipaz aktivitesine etkisi.

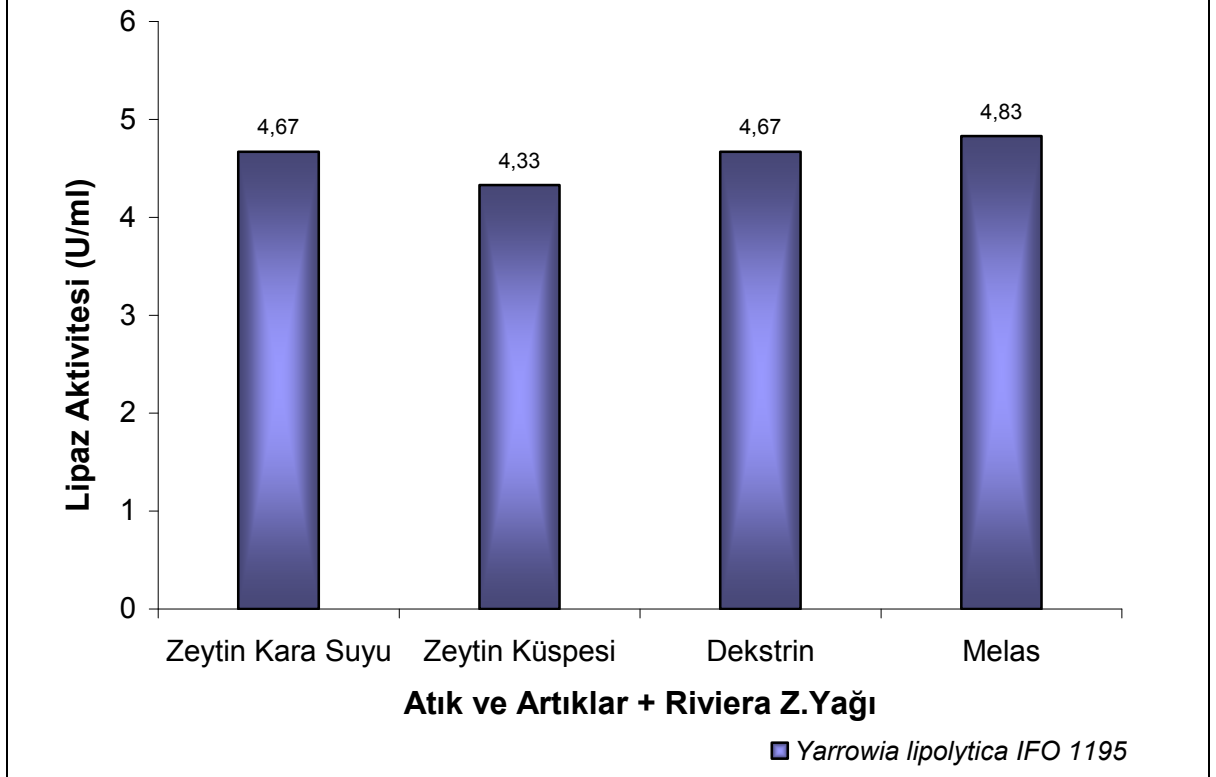


d) *Candida tropicalis* suşunda farklı atık ve artıkların lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.28. Devamı... Çeşitli atık-artıkların lipaz aktivitesine etkisi.

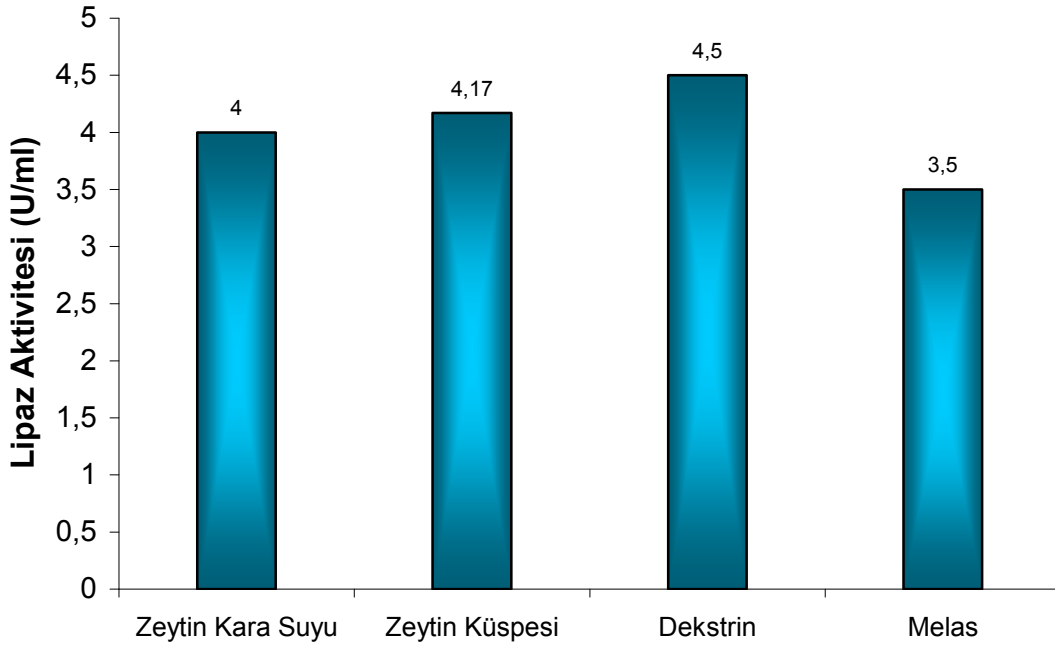


a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda farklı atık ve artıklara ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.



b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda farklı atık ve artıklara ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.

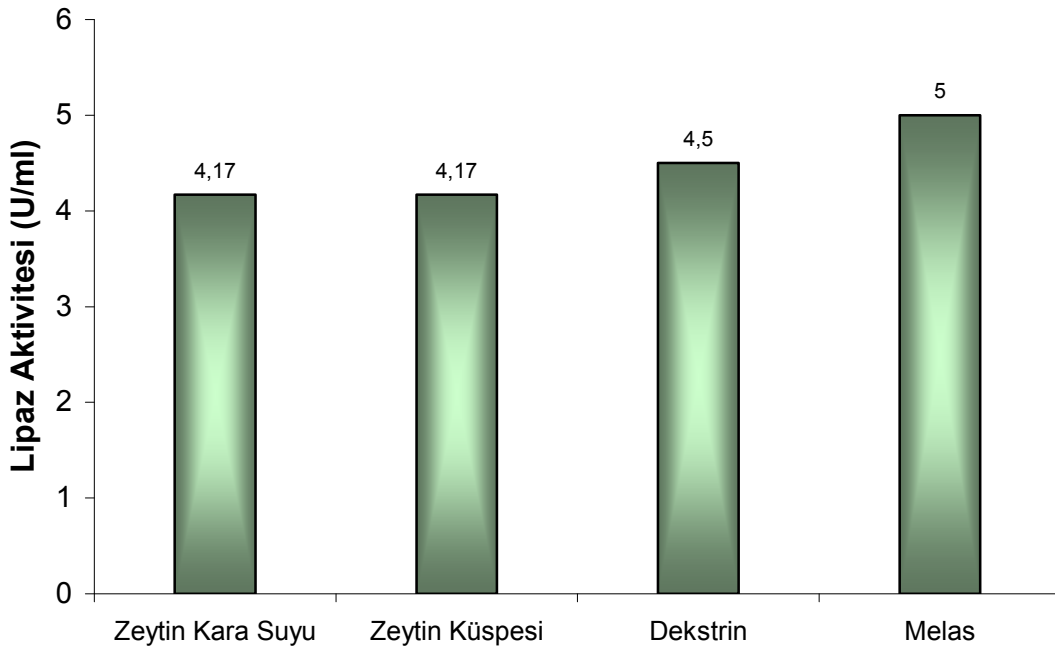
şekil 4.29. Çeşitli atık-artıklar ve %1 riviera zeytin yağının lipaz sentezine etkisi.



#### Atık ve Artıklar + Riviera Z.Yağı

■ *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu

c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda farklı atık ve artıklara ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.



#### Atık ve Artıklar + Riviera Z.Yağı

■ *Candida tropicalis*

d) *Candida tropicalis* suşunda farklı atık ve artıklara ilave olarak %1 riviera zeytin yağının lipaz aktivitesine etkisi.

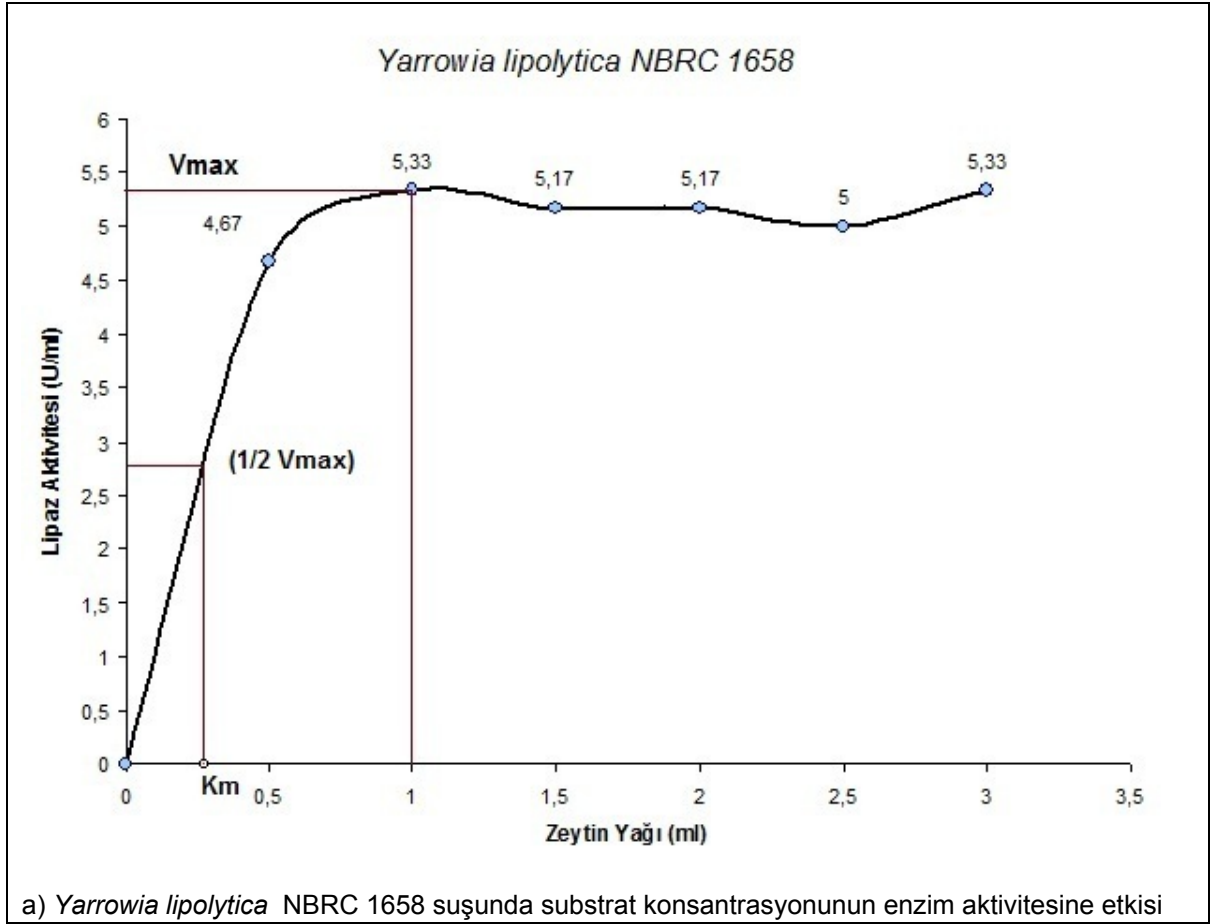
Şekil 4.29. Devamı... Çeşitli atık-artıklar ve %1 riviera zeytin yağının lipaz sentezine etkisi.



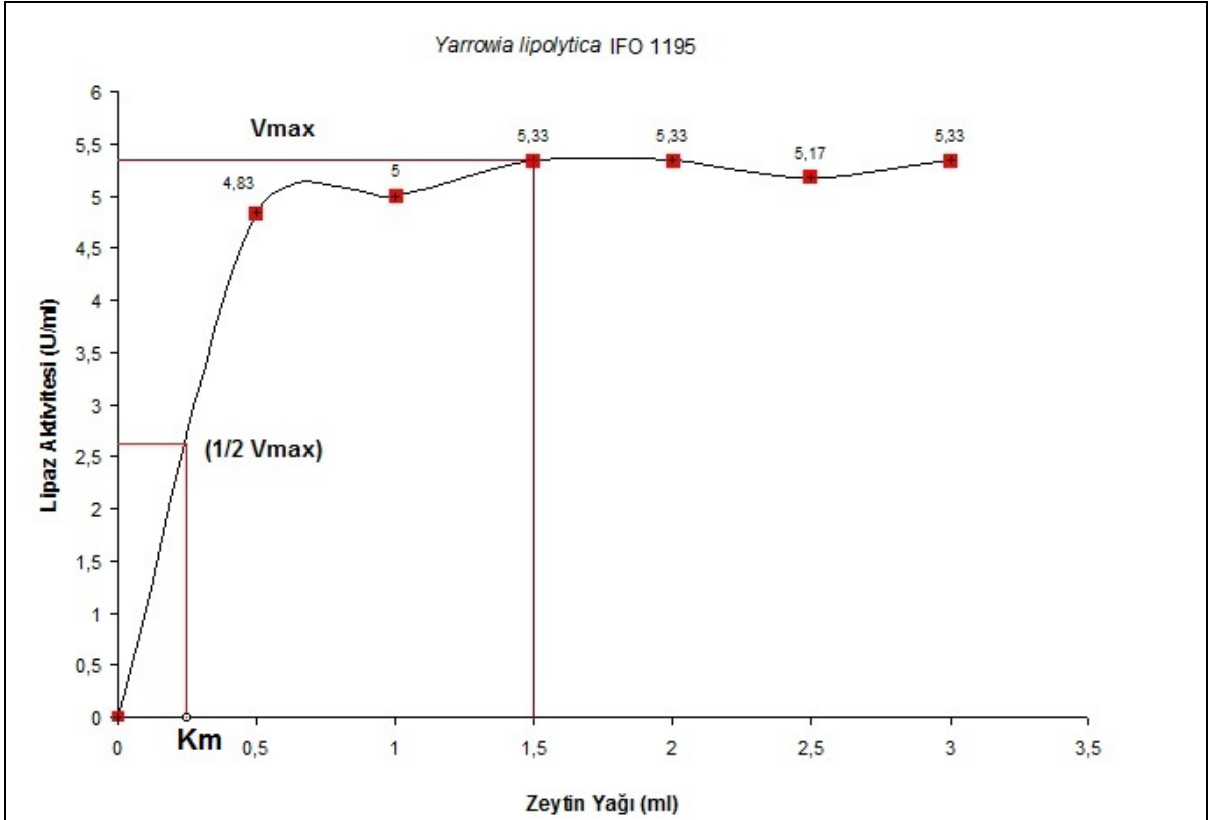
## 4.7. Lipazın Enzimolojik Özellikleri

### 4.7.1. Substrat konsantrasyonu

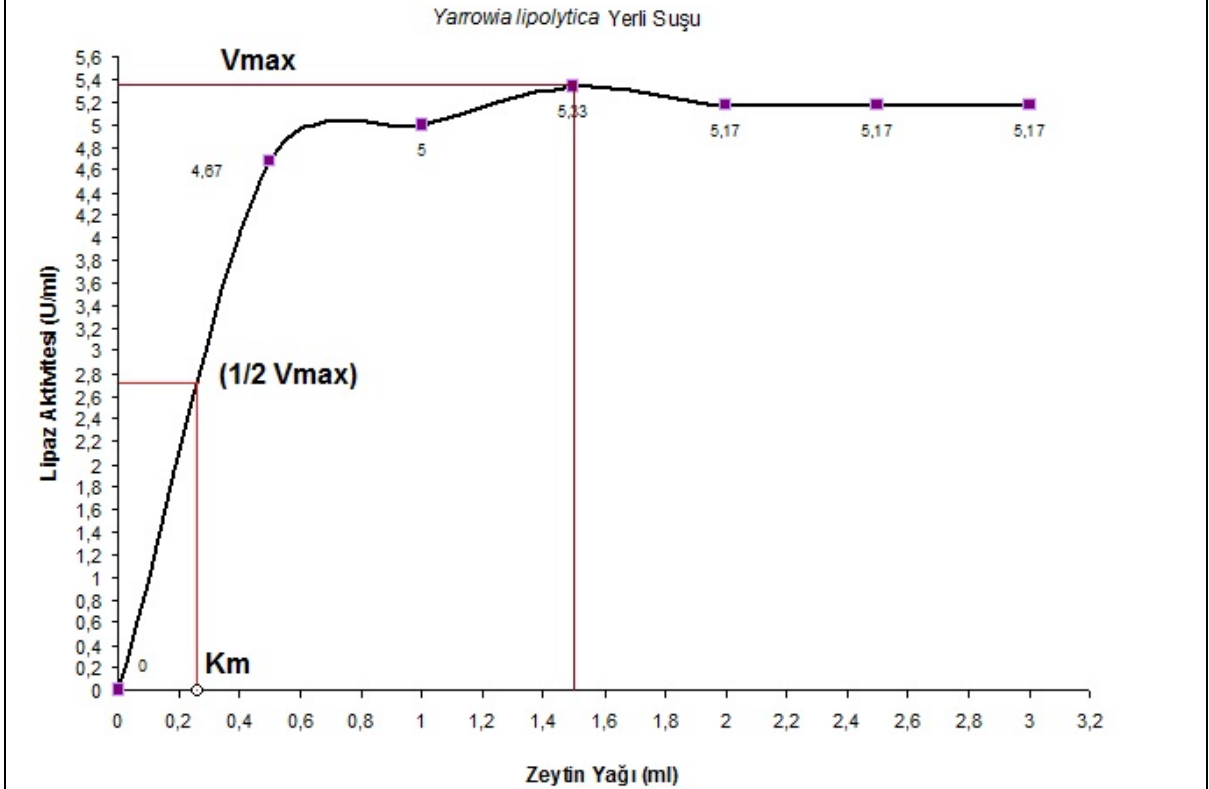
Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesini incelemek amacı ile enzim sentez tayininde substrat olarak kullanılan riviera tipi zeytin yağının %0,5-3,0 ml arasında değişen yoğunlukları sabit miktardaki enzimle reaksiyona sokularak aktivitelerine bakıldı. Sonuçlar grafiğe geçirilerek substrat doymuşluk eğrisi çizildi ve yorumlandı (Horton ve ark., 1993). Elde edilen grafiklerden her maya suşu için  $K_m$  değerleri hesaplandı. Buna göre  $K_m$  değerleri sırasıyla *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu için 0,26 , *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşu için 0,24 , *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu için 0,26 ve *Candida tropicalis* suşu için 0,25 ml olarak ölçüldü.



Şekil 4.30. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi

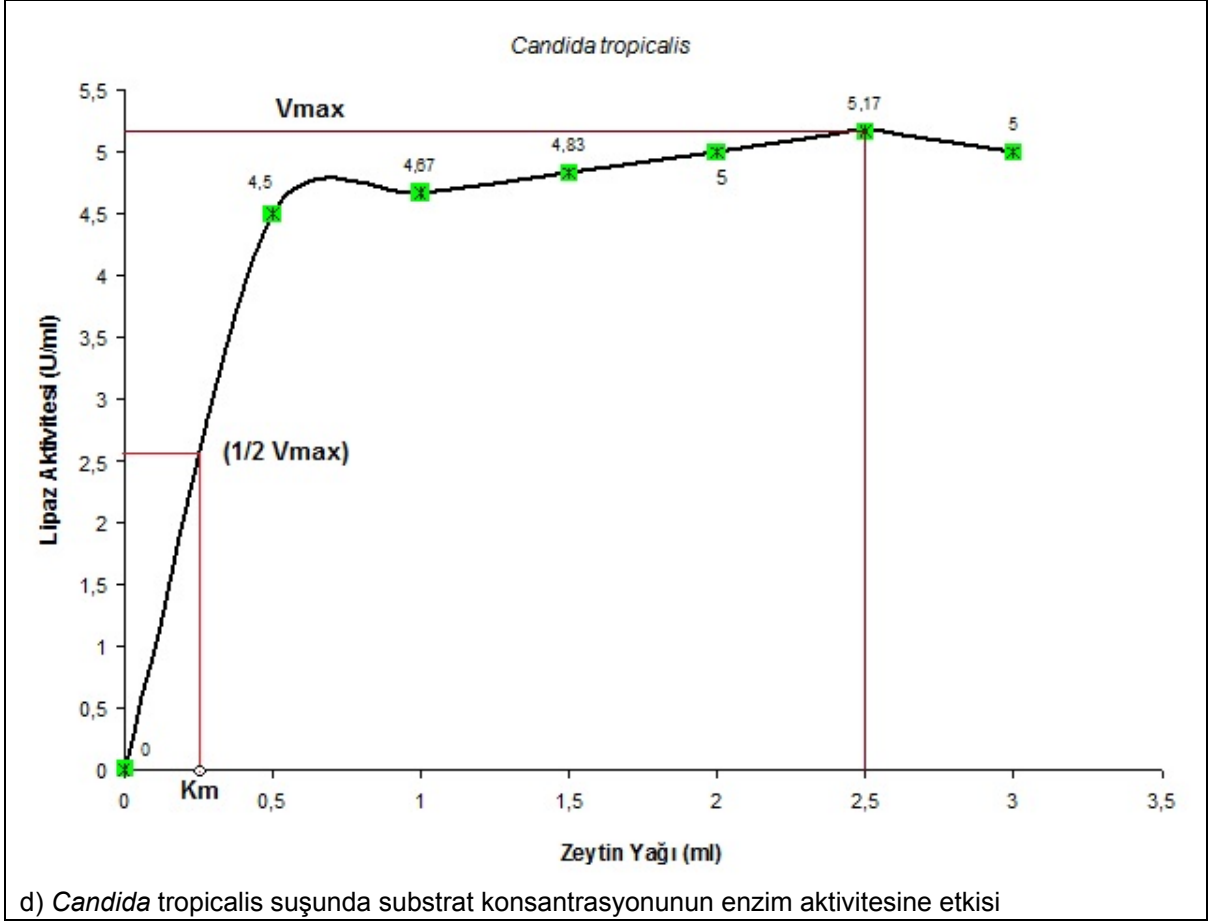


b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi

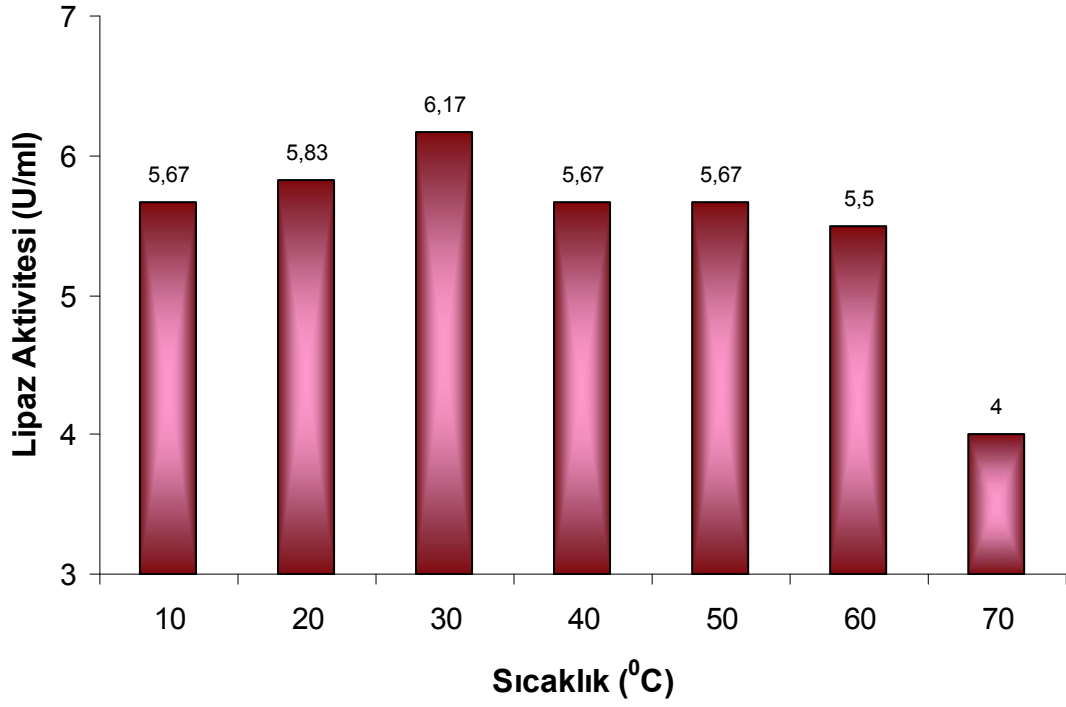
Şekil 4.30. Devamı... Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi



Şekil 4.30. Devamı... Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi

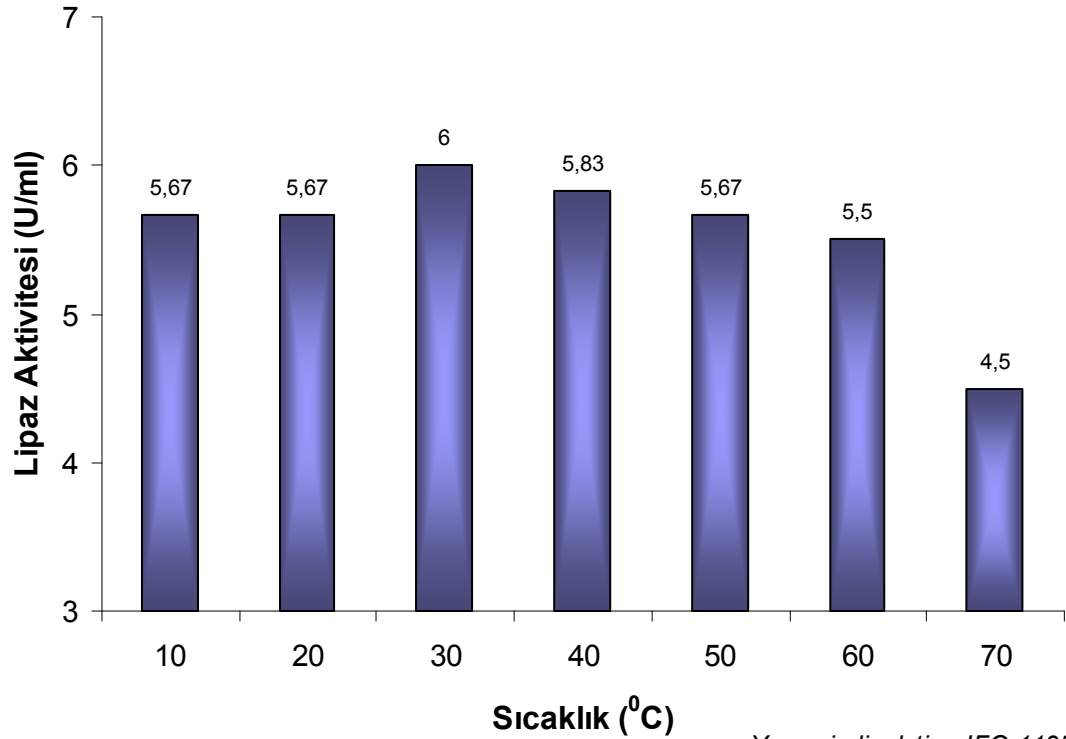
#### 4.7.2. Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi

Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi 10 - 70°C aralığında araştırıldı. Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi incelendiğinde 10 - 40°C'lerde tüm mayalarda yüksek aktivite saptandı. 50 - 60°C'lerde dahi enzim aktivitelerinde fazla kayıp olmadığı tespit edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195 ve *Candida tropicalis* suşlarında en yüksek aktiviteye 30°C'de rastlandı (6,17 U/ml, 6,0 U/ml ve 5,83 U/ml) ancak *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda en yüksek aktivite 20°C 'de (6,67 U/ml) saptandı. Sonuç olarak tüm maya suşlarında enzim 60°C'ye kadar lipaz aktivitesini korumakta, 70°C'de ise lipaz aktivitesi önemli ölçüde "sırasıyla 4 – 4,5 – 4,83 ve 3,67 U/ml" azalmaktadır (Şekil 4.31.).



■ *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658

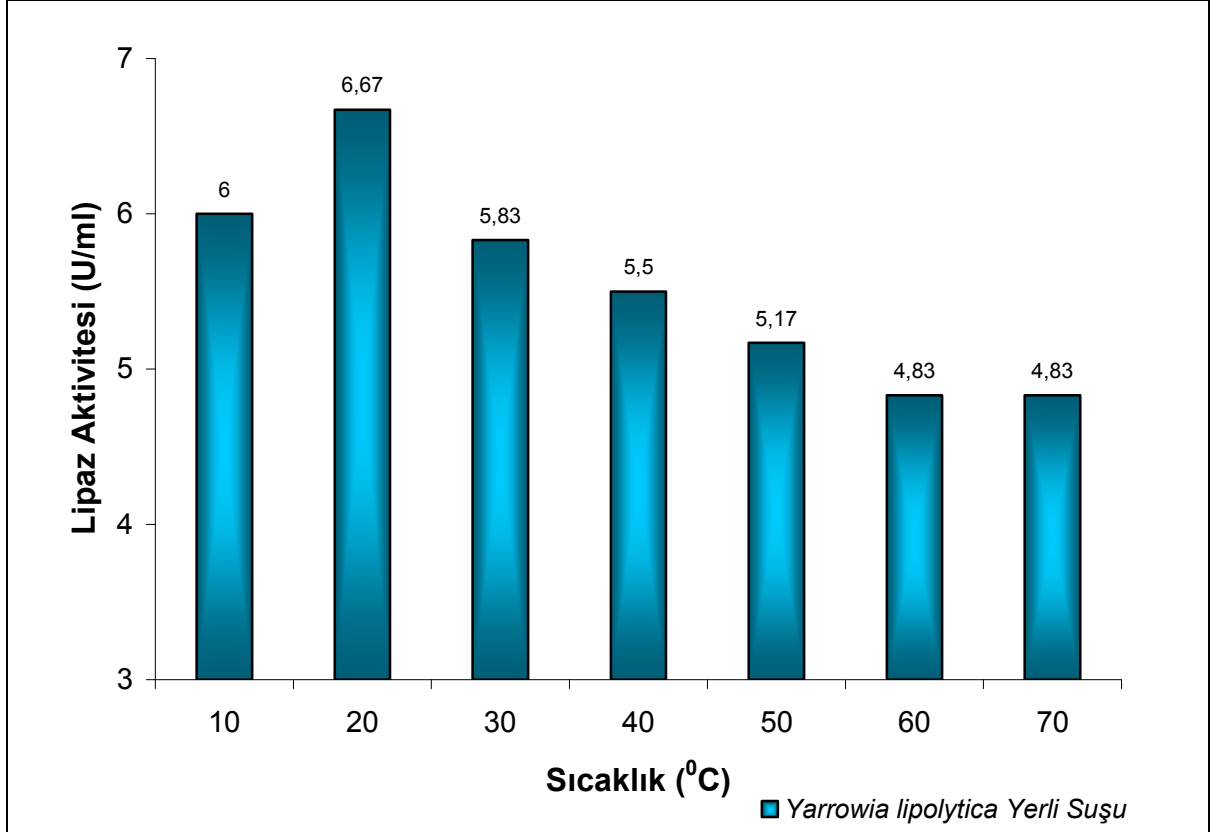
a) *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.



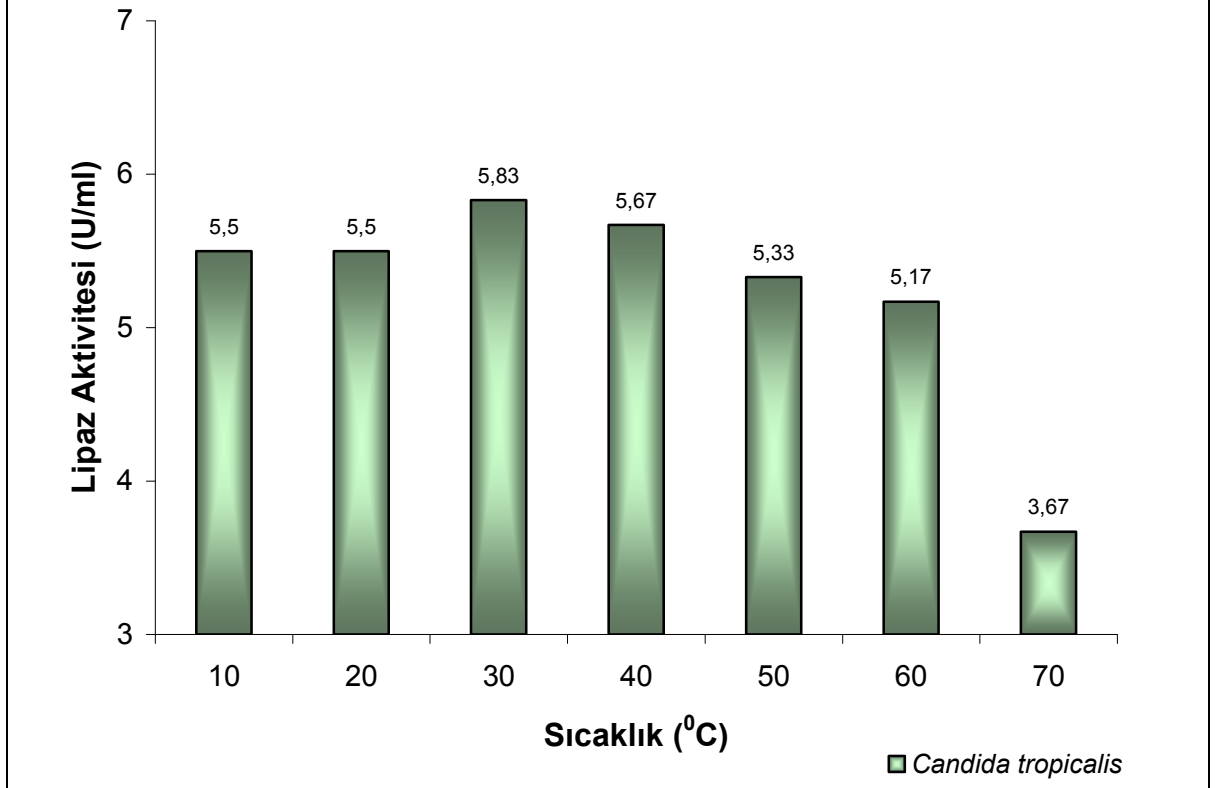
■ *Yarrowia lipolytica* IFO 1195

b) *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.

Şekil 4.31. Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.



c) *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.



d) *Candida tropicalis* suşunda tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi

Şekil 4.31. Devamı... Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi.

#### 4.8. Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

##### 4.8.1. Kaba enzim ekstresinin hazırlanması

Kaba enzim ekstresi elde etmek amacı ile en yüksek aktivite gösteren *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu seçildi. İnkübasyon sonrasında kültür ortamı Whatman no:1 filtre kağıdından süzülerek hücresel kısım uzaklaştırıldı ve hücresiz ortam saflaştırma işleminde kullanıldı. Saflaştırma işlemleri +4<sup>0</sup>C'de yapıldı.

##### 4.8.2. Amonyum sülfat ile çöktürme

Kaba enzim ekstresinin hazırlanmasından sonra saflaştırma işlemlerinden ilki olan amonyum sülfat ile çöktürme işlemi gerçekleştirilerek en yüksek saflaştırma oranına sahip olan diyaliz işlemi için ayrıldı (Çizelge 4.6.). Total protein miktarları, Şekil 4.33.'deki standart protein eğrisindeki formül ile hesaplandı.

Çizelge 4.6. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası saflaştırma değerleri.

Fraksiyon	Total Hacim (ml)	Protein		Enzim			Verim (%) <sup>*</sup>	S. Katsayısı <sup>**</sup>	
		mg/ml	Total (mg)	U/ml	Total Unite	Total Özgül Aktivite (U/mg protein)			
Kaba enzim ekstresi	100	0,201	20,10	5,17	517	25,72	<b>100</b>	<b>1</b>	
Amonyum sülfat Çöktürmesi	%40	10	0,570	5,70	14,33	143,3	25,14	<b>27,71</b>	<b>0,98</b>
	%60	10	0,415	4,15	24,83	248,3	59,83	<b>48,03</b>	<b>2,32</b>
	%80	10	0,448	4,48	44,33	443,3	98,95	<b>85,74</b>	<b>3,85</b>

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> Şekil 4.32.

a)

$$\frac{\text{Ayırma sonrasında total enzim aktivitesi}}{\text{Kaba enzim total enzim aktivitesi}} \times 100 = \text{Verim}$$

b)

$$\frac{\text{Ayırma sonrasında total özgül aktivite}}{\text{Total kaba enzim özgül aktivitesi}} = \text{Saflaştırma Katsayısı}$$

Şekil 4.32. a) Verim ve b) Saflaştırma katsayılarının hesaplanması.

#### 4.8.3. Diyaliz

Saflaştırma işleminde diyaliz işlemi uygulandı (Bailey, 1967; Chrzanowska, 2001; Kim ve ark., 2001). En yüksek yoğunluk oranına sahip ortam selüloz diyaliz tüplerine konarak 0,05 M (pH: 5,6) fosfat tamponuna karşı +4°C'de 24 saat diyaliz edildi. Diyaliz öncesi kaba enzim ekstresinin ve diyaliz sonrası ortamın enzim aktiviteleri ve toplam protein miktarları saptandı. Spesifik aktiviteleri ve saflaştırma katsayıları hesaplanarak yorumlandı (Çizelge 4.7.).

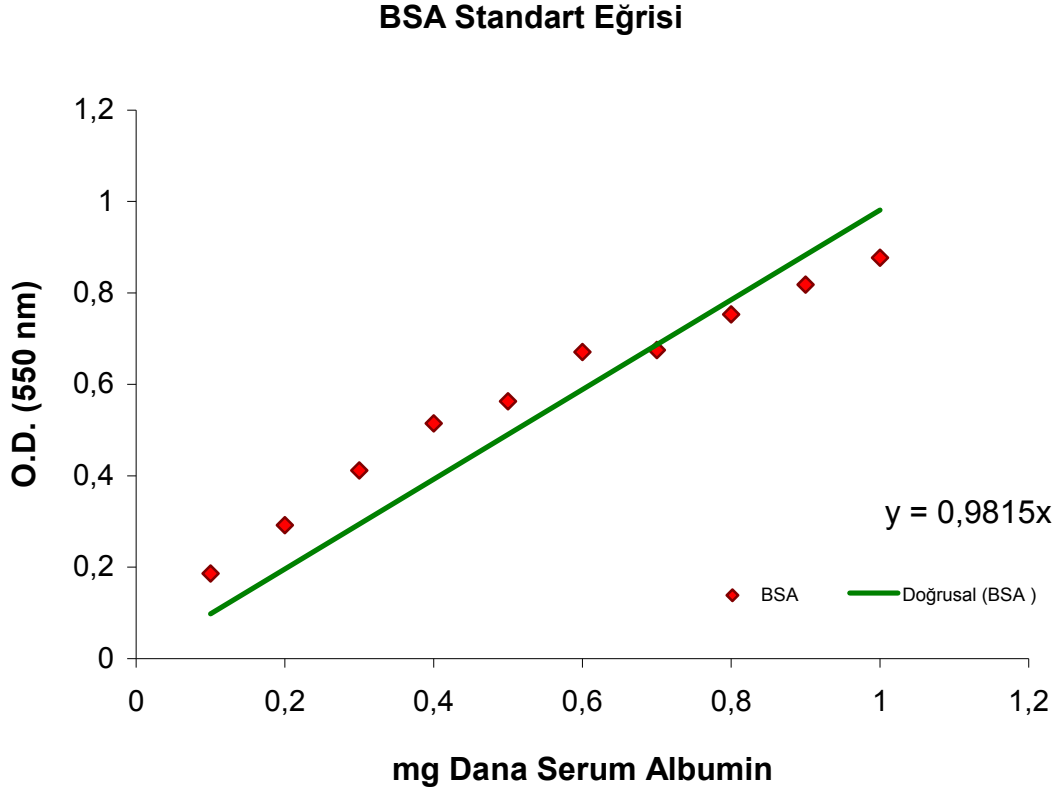
Çizelge 4.7. Diyaliz sonrası saflaştırma değerleri.

Saflaştırma Aşamaları	Total Hacim (ml)	Protein		Enzim			Verim (%) <sup>*</sup>	**S. Katsayısı
		mg/ml	Total (mg)	U/ml	Total Unite	Total Özgül Aktivite (U/mg protein)		
Kaba enzim ekstresi	100	0,201	20,10	5,17	517	25,72	<b>100</b>	<b>1</b>
%80 A. sülfat Çöktürmesi	10	0,448	4,48	44,33	443,3	98,95	<b>85,74</b>	<b>3,85</b>
Diyaliz	6	0,544	3,26	28,33	472,17	144,84	<b>91,33</b>	<b>5,63</b>

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> Şekil 4.32.

#### 4.8.4. Total protein miktarının hesaplanması

Santrifügasyon sonrasında elde edilen tüm süpernatantlardaki protein miktarı hesaplandı. Enzim örneklerindeki protein miktarı Lowry metodu (Lowry ve ark., 1951) ile spektrofotometrik olarak tayin edildi. Protein tayinlerinde Dana Serum Albumin ile hazırlanan standart protein eğrisi kullanıldı (Şekil 4.33.).

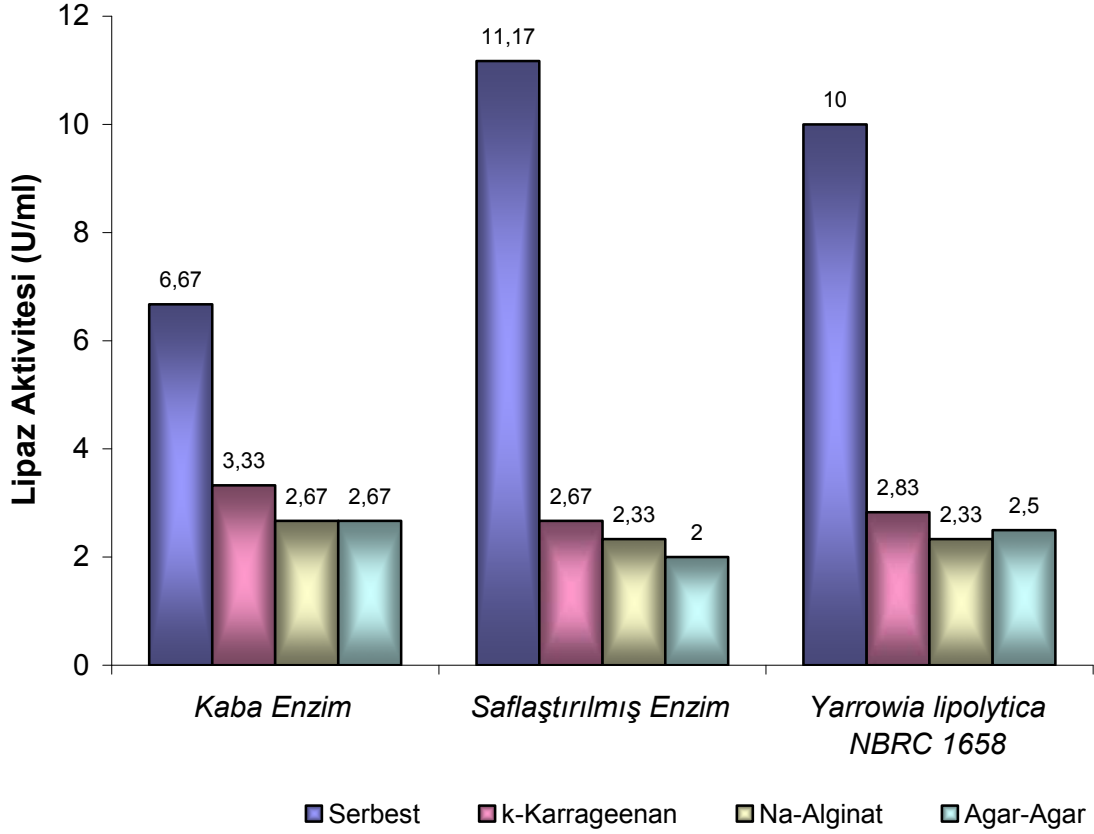


Şekil 4.33. Dana Serum Albumin standart eğrisi.

#### 4.9. İmmobilizasyon

Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz yöntemiyle saflaştırılmış lipaz enzimi ekstresi, kaba enzim ekstresi ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu ayrı ayrı Na-alginat, k-Karrageenan ve agar-agara tutuklandı. Saflaştırılmış lipaz enzimi ekstresi olarak, saflaştırılma aşamalarından diyaliz sonrası kalan 6 ml enzim örneği 50mM pH 5,6 fosfat tamponu ile 1:3 oranında seyreltili ve tutuklama çalışmalarında kullanıldı. Kaba enzim ekstresi, *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunun lipaz üretim ortamında üretimi sonrasında biyokütlenin Whatman no:1 kağıdından süzülmesiyle elde edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu ise lipaz üretim besiyeri ortamında 72 saat üretildikten sonra tutuklama çalışmalarında kullanıldı, sonuçlar grafiklendi (Şekil 4.34.).





şekil 4.34. Agar-agar, Na-Alginat ve k-Karrageenan'a tutuklama.

Sonuçta en yüksek lipaz aktivitesi serbest ve safılaştırıldıktan sonra 50mM fosfat tamponuda seyreltilmiş olan enzim örneğinde ölçüldü. 11,17 U/ml aktivite gösteren bu örneği takiben yine serbest *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda 10 U/ml lipaz aktivitesi saptandı. Destek materyalleri olarak kullanılan k-Karrageenan, Na-Alginat ve Agar-Agar'lara tutuklanan kaba enzim, safılaştırılmış enzim ve *Y. lipolytica* NBRC 1658 suşunun lipaz aktivitesinde düşüş gözlemlendi. Ancak serbest enzimlerin aktivitelerini yitirmeden geri kazanımları pek mümkün olmamaktadır ve reaksiyon ortamından istenilen zamanda uzaklaştırılmadıklarından reaksiyonun kontrolü de güçleşmektedir. Ayrıca serbest enzimler ortamdaki uzaklaştırılabilirler bile tekrar kullanılmaları aktivitelerini yitirdiklerinden dolayı mümkün değildir. İmmobilize enzimler ortamdaki uzaklaştırılabilir olduklarından kesikli ve sürekli sistemlerde kolaylıkla kullanılabilirlerdir. Bu enzimlerin kullanımda aktif olarak kaldıkları süre serbest enzimlere göre oldukça fazladır ve substrat fazında çözünmediğinden sistemin kontrolü çözünür enzimlere göre daha kolaydır. Bu nedenle özellikle endüstriyel ölçekte enzim kullanımında immobilizasyon önem kazanmaktadır.

## 5. TARTIŞMA

Enzimler tüm hücrel yapılar da var olan, katalitik aktiviteye sahip proteinlerdir. Doğadaki mevcut tüm enzimlerin içinde hidrolazlar belki de en kolay kullanıma sahip olanlardır, bunun nedeni kofaktörlere gereksinim duymamaları ve genellikle işleme koşullarında oldukça kararlı kalmalarıdır. Bu özellikler lipazlar ve fosfolipazlar için de geçerlidir. Lipidler ile ilişkili enzimlere olan bilimsel ilgi uzun bir geçmişe sahiptir, öncelikle bu ilgi lipazlar üzerine yoğunlaşmıştır sonrasında ise fosfolipazlar, lipooksijenazlar ve monooksijenazlar önem kazanmıştır. Günümüzde ise bu ilgi halen artan yoğunlukta devam etmektedir.

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'inin karbohidrazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır (Uhlig, 1998). Lipazlar dünya enzim pazarında proteazlar ve karbohidrazlardan sonra yer almaktadır ve %5'lik enzim pazarına sahiptir (Vakhlu ve Kour, 2006). Bir çok lipaz ticari olarak mevcuttur ve bir takım endüstriyel süreçlerde bu lipazlar kullanılmaktadır (Bornscheuer, 2000). Lipaz üreten mayalar içerisinde *Candida rugosa* ticari lipaz kaynaklarından en sıklıkla kullanılanıdır (Vakhlu ve Kour, 2006). Her ne kadar lipazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından üretilse de günümüzde bakteri ve fungal lipazlara olan ilgi daha fazladır. Mikrobiyal lipazlar nispeten kararlı ve çeşitli reaksiyonların katalizini gerçekleştirme yetisindedirler ve bu nedenle endüstriyel uygulamalarda daha önemli bir yere sahip olmuşlardır (Hou, 2002).

Mikroorganizmalar dünya genelinde onlarca milyar dolar değerinde yüzlerce ticari ürünün üretiminde kullanılmaktadırlar. Endüstriyel uygulamalarda enzimler önemli bir yer almaktadır. Enzim kaynakları olarak dünya mikroorganizmalarının sadece yaklaşık %2'si test edilmiştir (Hasan ve ark., 2006). Bu göstermektedir ki yaklaşık %98'lik bir kısım henüz taranmamıştır. Bu nedenle araştırmacılar mevcut suşların yanısıra enzim üretiminde topraktan ve sudan yeni mikrobiyal kaynakları taramaya devam etmektedir.

Bu çalışmada yapılmak istenen sitrik asit üretiminde potent suşlar olarak bilinen *Yarrowia lipolytica* suşlarının lipaz üretim koşullarını araştırmak ve *Yarrowia* suşlarına ilave olarak bir zeytin yağı atık toprak örneğinden izole edilen yeni bir maya örneği ile lipaz üretim değerlerini karşılaştırmaktır. Öncelikle Hacettepe

Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilen *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşu ve *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunun kültürasyonu yapılarak stoklanmıştır. Daha sonra Tarsus ilçesindeki bir zeytin yağı imalathanesinden alınan toprak örneğinden maya izolasyon çalışmaları yapılmış ve saflaştırılan bir maya örneği araştırmaya dahil edilmiştir. Maya örneğinin tanımlanması RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne yaptırılarak *Candida tropicalis* olarak tanımlanmıştır.

Kültürasyonu yapılan tüm *Yarrowia* suşları ve *Candida tropicalis* suşunun koloni ve hücre morfolojileri araştırıldıktan sonra bir takım biyokimyasal testleri takiben lipaz üretim optimizasyonu çalışmalarına başlanmıştır. Tüm *Yarrowia* suşları ve *Candida tropicalis* suşunun katalaz pozitif olduğu, nitratı nitrite indirgeyemediği, nişasta hidrolizi sonucunun olumsuz ancak üreaz hidrolizinin olumlu olduğu saptanmıştır. Tüm suşlardan elde edilen biyokimyasal sonuçlar suşların Kurtzman, 1999 kitabındaki taksonomik özellikler ile de birebir benzerlik göstermektedir.

Çalışmanın temelini oluşturan optimizasyon çalışmaları hem hücresel üretim hem de lipaz üretimi üzerine yapılmıştır. Ancak lipaz üretim çalışmaları enzimolojik özellikler ve verim açısından daha fazla önem arz etmektedir. Lipaz üretim ortamı olarak Hatzinikolaou ve ark, 1996, tarafından önerilen besiyeri ortamı kullanılmıştır. İçeriği g/L'de 12 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 0,3 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,25 CaCl<sub>2</sub> , 0,005 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,015 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O , 0,03 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 1 pepton olan besiyerine farklı karbon kaynakları, yağlar ve şekerler, ve farklı azot kaynakları ilave edilerek lipaz üretiminin optimizasyonu araştırılmış, besiyeri ortamının pH'sı ve üretim ortamının sıcaklığı değiştirilerek yine lipaz üretiminin optimizasyonu çalışılmıştır. Ayrıca farklı atık-artıkların lipaz üretimine etkisi de çalışmaya dahil edilmiştir.

Üretim ortamı sıcaklığının lipaz üretimine etkisi araştırıldığında en yüksek lipaz aktivitesi *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda 4,83 U/ml, IFO 1195 suşunda 5,5 U/ml, Yerli Suşunda 5,0 U/ml ve *Candida tropicalis* suşunda 4,5 U/ml olarak 30<sup>0</sup>C'de gözlemlendi. Ancak bu mayaların 20 ve 40 <sup>0</sup>C'lerde de 30<sup>0</sup>C'dekine yakın lipaz aktivitesi saptandı. Ayrıca üretim ortamının pH'sının üremeye etkisi incelendiğinde *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek aktivite 5 – 6

U/ml olarak pH 4-5 aralığında saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda pH 3 - 6 aralığında lipaz aktivitesinin yüksek olduğu ancak pH 7'den itibaren ciddi oranda azaldığı tespit edildi. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda en yüksek aktivite 5,33 – 5,83 U/ml olarak pH 4-5 aralığında saptandı. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda pH 3 - 7 aralığında lipaz aktivitesinin yüksek olduğu ancak pH 8'den itibaren oldukça azaldığı tespit edildi. *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda pH 3 - 5 aralığında lipaz aktivitesinin yüksek olduğu, pH 6 ve 7'de durağan olduğu (4,33 U/ml) ancak pH 8'den itibaren azaldığı gözlemlendi. *Candida tropicalis* suşunda ise pH 3 - 6 aralığında lipaz aktivitesinin yüksek olduğu, ancak pH 7'den itibaren yarı yarıya azaldığı gözlemlendi. Corzo ve Revah, 1999, *Yarrowia lipolytica* 681 suşu optimum lipaz üretim koşullarının sıcaklık 29,5<sup>0</sup>C ve pH 4,7 olduğunu saptamışlardır. Enzim maksimum aktivitesini pH 6'da 37<sup>0</sup>C'de göstermiştir. Geon-Ho ve ark., 2007, *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178 suşu alkali lipazı üzerine yaptıkları araştırmada, 27,5<sup>0</sup>C'de ve pH 8'de en yüksek aktivite gözlemlenmiştir. Kamzolova ve ark., 2005, lipaz aktivitesi için optimal pH'yı 8 olarak tespit etmişlerdir.

Karbon kaynağı olarak farklı yağların lipaz üretimine etkisi araştırıldığında *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda kanola yağında (6,0 U/ml) ve sızma zeytin yağında (5,5 U/ml), *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda soya yağında (7,33 U/ml) ve ayçiçek yağında (6,0 U/ml), *Y. lipolytica* Yerli Suşunda sızma zeytin yağı, mısır yağı, soya yağı ve kanola yağında (5,17 U/ml) ve *Candida tropicalis* suşunda soya yağında (5,33 U/ml) ve riviera zeytin yağı, ayçiçek yağı ve kanola yağında (5,17 U/ml) olmak üzere lipaz aktiviteleri saptanmıştır. Hatzinikolaou ve ark, 1996, tarafından önerilen besiyeri ortamına eklenen %1 oranındaki riviera zeytin yağı yerine *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda kanola yağı, *Y. lipolytica* IFO 1195 suşunda soya yağı, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda sızma zeytin yağı, mısır yağı, soya yağı veya kanola yağı ve *Candida tropicalis* suşunda soya yağı ile değiştirilmesi lipaz üretimi açısından olumlu sonuç verebilir. Karbon kaynağı olarak farklı mono ve disakkaritler üretim ortamına eklendiğinde lipaz üretimini yağlar kadar artırmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca karbon kaynağı olarak zeytin yağına ilave olarak üretim ortamına eklenen farklı şekerlerin de tek başına yağlar kullanıldığında elde edilen lipaz aktivitesine oranla aktiviteyi azalttığı tespit edilmiştir. Farklı araştırmacılar, farklı karbon kaynaklarını üretim ortamına ilave

ederek lipaz üretimini artırmaya yönelik çalışmalar yapmışlardır. Ginalska ve ark., 2006, yeni izole ettikleri *Geotrichum-like* R59 suşunun lipaz üretim ortamında yer alan zeytin yağı yerine yağ asitleri, triaçilgliseroller ve yağlar, glukoz yerine ise maltoz, galaktoz, ksiloz, fruktoz, laktoz, sukroz ve nişasta ekleyerek yaptıkları araştırmada %1 triolein ilave ettikleri ortamda en yüksek lipaz üretimini saptarken kısa-zincir yağ asitleri (tributirin ve trikaprilin) ilave ettikleri ortamlarda çok düşük lipaz üretimi tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar üretim ortamında yer alan glukoz yerine sukroz ilave ettiklerine en yüksek lipaz üretimini saptamışlardır. Cihangir ve Sarıkaya, 2003, *Aspergillus* sp.'den çeşitli karbon kaynaklarının lipaz sentezine etkisi üzerine yaptıkları araştırmada en yüksek aktiviteye 15,30 U/ml olarak zeytinyağı içeren ortamlarda saptamışlardır. *Yarrowia lipolytica* tarafından üretilen lipaz üzerine yapılan araştırmalar *Candida rugosa* ile kıyaslandığında çok fazla görülmemekle birlikte, Corzo ve Revah, 1999, *Yarrowia lipolytica* 681 suşunda glukoz, mısır ve zeytin yağının lipaz üretimini ve biyokütleyi artırdığını bildirmişlerdir. Geon-Ho ve ark., 2007, *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178 suşundan lipaz üretimi üzerine yaptıkları araştırmada, 8 farklı karbon kaynağı içerisinde glukoz ve gliserol içeren ortamların lipaz üretimi açısından en uygun ortamlar olduklarını bulmuşlardır. Babu ve Rao, 2007, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 suşundan lipaz üretimi üzerine yaptıkları araştırmada glukoz içeren üretim ortamlarında en yüksek lipaz aktivitesi, 8,4 U g ds<sup>-1</sup>, saptamışlardır. Dalmau ve ark., 2000, *Candida rugosa*'dan lipaz üretimi üzerine yaptıkları araştırmada en yüksek lipaz üretimine palmitik asit içeren ortamlarda (5,3 U/ml) saptamışlardır. Lipitsi karbon kaynakları yüksek lipaz ürünü elde etmek için gerekli görünse de birkaç araştırmacı yağların yokluğunda da yüksek ürün elde etmişlerdir (Sharma, 2001).

Azot kaynaklarının lipaz üretimine etkisini araştırmak için üretim ortamına karbon kaynağı olarak %1 zeytin yağına ayrı ayrı ilave edilen %1 oranındaki proteose peptone no:3, pepton, maya özütü, kazein, üre, amonyum sülfat, amonyum oksalat, amonyum nitrat ve amonyum karbonatın deneysel sonuçlarına göre *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek lipaz aktivitesine 16,0 U/ml, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda 10,17 U/ml, *Y. lipolytica* Yerli Suşunda 9,5 U/ml ve *Candida tropicalis* suşunda 10,67 U/ml olarak amonyum sülfat ortamlarda saptanmıştır. Ayrıca üretim ortamına karbon kaynağı ilave etmeden yapılan

araştırmada da lipaz üretiminin arttığı ve yine en yüksek aktivitenin amonyum sülfat içeren ortamlarda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Corzo ve Revah, 1999, *Yarrowia lipolytica*'dan lipaz üretimi için en iyi azot kaynağının üreli ortamlar olduğunu saptamışlardır. Cihangir ve Sarıkaya, 2003, *Aspergillus* sp.'den lipaz üretiminde peptonlu ortamların en yüksek lipaz üretimi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ginalska ve ark., 2006 yeni izole ettikleri *Geotrichum-like* R59 suşunun lipaz üretim ortamında yer alan ürenin en yüksek lipaz üretimini oluşturduğunu saptamışlardır. Geon-Ho ve ark., 2007, *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178 suşundan lipaz üretimi üzerine yaptıkları araştırmada, 9 farklı azot kaynağı içerisinde 1:1 oranındaki maya özütü-pepton karışımı içeren ortamların lipaz üretimini artırdığını saptamışlardır. Babu ve Rao, 2007, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 suşundan lipaz üretimi üzerine yaptıkları araştırmada ise üre içeren üretim ortamlarında en yüksek lipaz aktivitesi,  $8,9 \text{ U g ds}^{-1}$ , saptamışlardır ancak amonyum sülfat içeren ortamlarında da yüksek aktivite görülmektedir ( $7,3 \text{ U g ds}^{-1}$ ). Lopes ve ark., 2008, yaptıkları çalışmada lipaz üretiminin besiyerine amonyum sülfat ilavesiyle arttığını saptamışlardır.

Çeşitli atık ve artıkların lipaz üretimine etkisinin tespiti amacıyla lipaz üretim besiyerlerine atık ve atık-artık olarak ayrı ayrı %1 zeytin kara suyu, %1 zeytin küspesi, %1 melas, ve %1 kızartma yağı, ayrıca lipaz üretimini artırdığı belirtilen %1 gaz yağı (kerosene) ve %1 dekstrin de eklendi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda en yüksek lipaz aktivitesi zeytin küspesi içeren ortamda ( $6,83 \text{ U/ml}$ ), sonrasında ise gaz yağı ( $5,5 \text{ U/ml}$ ) ve kızartma yağı ( $5,33 \text{ U/ml}$ ) içeren ortamlarda saptandı. *Yarrowia lipolytica* IFO 1195 suşunda, *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda ve *Candida tropicalis* suşunda en yüksek lipaz aktivitesine zeytin küspesi içeren ortamda sırasıyla  $7,67 \text{ U/ml}$ ,  $7,33 \text{ U/ml}$ ,  $8,17 \text{ U/ml}$  olarak saptandı. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *Yarrowia lipolytica* IFO 1195, *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşunda ve *Candida tropicalis* suşunda en düşük lipaz aktivitesine ise zeytin karasuyu içeren ortamlarda saptandı. Zeytin küspesi içeren ortamların lipaz üretimini artırdığı bu nedenle zeytin yağı üretiminde bir artık olarak atılan bu atığın bu suşlar için lipaz üretiminde kullanılması düşünülebilir. Ancak zeytin yağı üretiminde atık olan zeytin kara suyu ise bu suşlar için uygun bir substrat olarak görülmemektedir. Lipaz üretim ortamına ilave edilen bu atık-artıklara ilave olarak karbon kaynağı %1 zeytin yağı eklendiğinde ise zeytin küspesi içeren ortamlarda

üretimin oldukça azladığı gözlenmiştir, bu nedenle zetin küspesinin tek başına kullanılması öngörülmektedir. Üretim ortamına eklenen dekstrinin ise daha önce literatürde *Rhizopus delemar*'dan lipaz üretiminde üretimi artırdığı belirtilmiş (Cihangir ve Sarıkaya, 2003) ancak yapılan deney sonucunda *Yarrowia* suşları ve *Candida tropicalis* suşu için uygun olmadığı tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada gaz yağı ve evsel kızartma yağının da lipaz üretimine etkisi araştırılmıştır. Bunun nedeni günümüzde biyodizel üretiminde özellikle evsel kullanılmış kızartma yağının substrat olarak kullanılmasıdır. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu kızartma yağı bulunan üretim ortamında 5,33 U/ml aktivite göstermiştir, yine yeni izole edilen *Candida tropicalis* suşunda da 5,17 U/ml aktivite saptanmıştır. Her iki suşun da biyodizel üretiminde alternatif suşlar olabileceği ve bu nedenle biyodizel üretiminde uygun araştırma suşları olabileceği öngörülmektedir. Çaylı ve Küsefoğlu, 2008, yaptıkları çalışmada iki aşamalı reaksiyonla kullanılmış yağlardan iyi kalitede biyodizel üretiminin gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Kızartma atık yağlarının biyodizel üretiminde kullanılarak ülke ekonomisine katkı sağlaması araştırılmalı ve bu yöndeki çalışmalar artırılmalıdır. Örneğin Brezilyada Araujo ve ark., 2010, nın bu konuyla ilgili araştırmaları mevcuttur. Ayrıca Zhu ve ark, 2008, Anastopoulos ve ark., 2001, Hsu ve ark., 2002, Dizge ve Keskinler, 2008, ve daha bir çok araştırmacı farklı yağlar ve yağ atıkları, immobilize ve immobilize olmayan lipaz enzimi ve de farklı mikroorganizmalar kullanarak biyodizel üretimi üzerine bir çok araştırma yapmışlardır.

Tepkime ortamı sıcaklığının lipaz aktivitesine etkisi incelendiğinde 10-40°C'lerde tüm mayalarda yüksek aktivite saptandı. 50-60°C'lerde dahi enzim aktivitelerinde fazla kayıp olmadığı tespit edildi. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, IFO 1195 ve *Candida tropicalis* suşlarında en yüksek aktiviteye 30°C'de rastlandı (6,17 U/ml, 6,0 U/ml ve 5,83 U/ml) ancak *Yarrowia lipolytica* Yerli Suşu'nda en yüksek aktivite 20°C 'de (6,67 U/ml) saptandı. Sonuç olarak tüm maya suşlarında enzim 60°C'ye kadar lipaz aktivitesini korumakta, 70°C'de ise lipaz aktivitesi "sırasıyla 4 – 4,5 – 4,83 ve 3,67 U/ml" azalmaktadır. Üretilen lipaz enziminin 60°C'de kararlılığını koruması esasen iyi bir veridir. Ancak enzimin tamamen termofilik sayılması için 70°C üzerindeki sıcaklıklarda da kararlılığını koruması gerekmektedir. Yine de tüm mayalardan üretilen lipaz enzimleri 70°C'de dahi aktivitelerini sürdürebilmektedirler. Mahadik ve ark., 2002, *Aspergillus niger* NCIM 1207 suşu

lipazının optimum sıcaklığını 50°C olarak bildirmişlerdir ve 60°C'de 5 saat enzimin kararlılığını koruduğunu saptamışlardır.

Lipaz üretim optimizasyonu tamamlanan *Yarrowia lipolytica* suşları ve *Candida tropicalis* suşları arasından en yüksek aktivite gösteren *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu seçilerek enzim saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuştur. Öncelikle farklı yoğunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak %80 yoğunlukta kaba enzim 3,85 kat saflaştırılmıştır. Bu örnek daha sonra diyaliz yapılarak 5,63 kat saflaştırılması sağlanmıştır. Saflaştırılan örnek daha sonra lipaz enziminin immobilizasyon çalışmaları için +4°C'de saklanmıştır. Bir çok araştırmacı ister *Yarrowia lipolytica*'dan üretilen lipazın ister diğer suşlardan üretilen lipazın saflaştırılmasında ilk aşama olarak amonyum sülfat çöktürme yöntemini uygulamışlardır. Saxena ve ark., 2003, *Aspergillus carneus* lipazını, Mhetras ve ark., 2009, *Aspergillus niger* NCIM 1207 lipazını, Rifaat ve ark., 2010, *Fusarium oxysporium* lipazını, Sun ve ark., 2008, *Rhizopus chinensis* lipazını saflaştırırken ilk olarak amonyum sülfat çöktürme yöntemini sonrasında diyaliz yöntemini uygulamışlardır. Bu araştırmacılara enzim saflaştırmasında aynı yöntemin kullanıldığı yüzlercesi eklenebilir.

Tutuklama materyali olarak mevcut Na-alginat, k-Karrageenan ve agar kullanılmıştır. Ancak sadece saflaştırılmış lipaz enziminin tutuklanması yerine, kaba enzim ve *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşu da destek materyallerine tutuklanmıştır. Sonuçta en yüksek lipaz aktivitesi serbest ve saflaştırıldıktan sonra 50mM fosfat tamponuda seyreltilmiş olan enzim örneğinde ölçüldü. 11,17 U/ml aktivite gösteren bu örneği takiben yine serbest *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşunda 10 U/ml lipaz aktivitesi saptandı. Destek materyalleri olarak kullanılan k-Karrageenan, Na-Alginat ve Agar-Agar'lara tutuklanan kaba enzim, saflaştırılmış enzim ve *Y. lipolytica* NBRC 1658 suşunun lipaz aktivitesinde düşüş gözlemlendi. Ancak serbest enzimlerin aktivitelerini yitirmeden geri kazanımları pek mümkün olmamaktadır ve reaksiyon ortamından istenilen zamanda uzaklaştırılmadıklarından reaksiyonun kontrolü de güçleşmektedir. Ayrıca serbest enzimler ortamdaki uzaklaştırılabilirse bile tekrar kullanılmaları aktivitelerini yitirdiklerinden dolayı mümkün değildir. İmmobilize enzimler ortamdaki uzaklaştırılabilirliklerinden kesikli ve sürekli sistemlerde kolaylıkla



kullanılabilmektedirler. Bu enzimlerin kullanımda aktif olarak kaldıkları süre serbest enzimlere göre oldukça fazladır ve substrat fazında çözünmediğinden sistemin kontrolü çözünür enzimlere göre daha kolaydır. Bu nedenle özellikle endüstriyel ölçekte enzim kullanımında immobilizasyon önem kazanmaktadır.

Lee ve ark., 2006, *Rhizopus oryzae*'den ürettikleri lipazı silika-jel üzerine çapraz-bağlama metodu ile tutuklamışlardır. Magnan ve ark., 2004, *Candida antarctica* lipase B'yi seramik membran üzerine tutuklamışlardır, öncesinde bir polimer tabakaya (jelatin/polietilen imin) kovalent olarak bağlanmış enzim çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehid ile seramik membrana adsoblanmıştır. *Fusarium solani* FS1 lipazı Knight ve ark., 2000, tarafından poliakrilamid boncuklara kovalent bağlanma ile tutuklanmıştır. Cunha ve ark. 2008, yüksek aktiviteye sahip *Yarrowia lipolytica* lipazı (YLL)'nin fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlama ile tutuklanması üzerine yaptıkları araştırmada enzim oktil-agaroz ve oktadesil-boncuklara hidrofobik adsorpsiyon ile, MANAE-agaroz desteği üzerine iyonik adsorbsiyon ile adsorblanmıştır. CNBr-agaroz ise kovalent bağlama için destek materyali olarak immobilizasyonda kullanılmıştır. Immobilizasyon verimi oktil-agaroz için %71, oktadesil-boncuklar için %90 ve MANAE-agaroz için %97 olarak hesaplanmışken aktivite korunumu daha düşük gerçekleşmiştir (sırasıyla %34, %50 ve %61). Bu veriler göstermektedir ki tutuklama işlemleri sırasında lipaz enziminde aktivite kaybı gerçekleşmektedir. Kovalent bağlama ile immobilizasyonda ise enzim aktivitesinin tamamının kaybı gözlenmiştir (Cunha ve ark., 2008).

Elde edilen tüm verilen incelendiğinde *Yarrowia lipolytica* suşları ve *Candida tropicalis* suşundan lipaz üretim optimizasyonu araştırması sonucunda tüm suşlarda lipaz üretimi artmıştır. En yüksek aktivitelere yukarıda belirtildiği gibi amonyum sülfat içeren üretim ortamlarında saptanmış ve zeytin imalatında artık ürün olan zeytin küspesinde de aktivite artışı tespit edilmiştir. Lipaz üretim ortamına amonyum sülfat ve zeytin küspesi ilavesi lipaz üretimini artırdığı gibi zeytin küspesinin geri kazanımı da sağlanmış olacaktır. Ayrıca tüm maya suşlarından üretilen lipaz enziminin sıcaklığa dayanıklılığına bakıldığında 60°C'lere kadar yüksek aktivite görülmesi enzimin sıcaklığa, endüstriyel ölçekte bakıldığında, yeterince dayanıklı olduğunu göstermektedir. *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 suşundan elde edilen kaba enzim ekstresi, saflaştırılmış enzim örneği

ve biyokütlesi 3 farklı destek materyaline tutuklanarak öncelikle enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Serbest enzim örneklerine göre aktivite düşük bulunmuştur. Ancak tutuklanmış enzimin ve mikroorganizmanın defalarca kullanılabilmesi avantajı göz önünde bulundurulduğunda tutuklamanın önemi ortaya çıkmaktadır.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, Türkiye toprağından izole edilen yeni ve enzim verimi yüksek izolatın sanayi açısından değerlendirilmesi ayrıca güncel özelliğıe sahip olan kristalizasyon ve üç boyutlu yapının çözülmesi konusu dikkate alınarak bu konuda araştırmaların yapılması hedeflenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aloulou A., Rodriguez A. J., Puccinelli D., Mouz N., Leclaire J., Leblond Y., Carriere F., 2007, Purification and biochemical characterization of LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1771, 228-237p.
- Álvaro G. and Illanes A., 2008, *Enzymes Biocatalysis – Principles and Applications*, Editor Andrés Illanes, Springer Science + Business Media B.V., 295p.
- Anastopoulos G., Lois E., Serdari A., Zanicos F., Stournas S., and Kalligeros S., 2001, Lubrication Properties of Low-Sulfur Diesel Fuels in the Presence of Specific Types of Fatty Acid Derivatives, *Energy & Fuels*, 15, 106-112p.
- Araujo V.K.W.S., Hamacher S., Scavarda L.F., 2010, Economic assessment of biodiesel production from waste frying oils, *Bioresource Technology*, 101, 4415–4422p.
- Aravindan R., Anbumathi P., and Viruthagiri T., 2007, Lipase applications in food industry, *Indian Journal of Biotechnology*, Vol 6, 141-158p.
- Aunstrup K., 1980, *Proteinases, Microbial Enzymes and Bioconversions*, Edited by: Rose A. H., Academic Press, 49-114p.
- Babu I.S., and Rao G.H., 2007, Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in Solid State Fermentation Using Mixed Substrate, *Research Journal of Microbiology*, Vol: 2, Issue: 5, 469-474p.
- Bailey J.L., 1967, *Techniques in Protein Chemistry*, Second revised and expanded edition, Elsevier Publishing Company, NewYork, 251-277p.
- Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R., 2000, Methods for lipase detection and assay: a critical review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 133-153p.
- Bornscheuer U., 2000, Preface, *Enzymes in Lipid Modification*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Edited by Uwe T. Bornscheuer, Foreword p.
- Brocca S., Secundo F., Ossola M., Alberghina L., Carrea G., and Lotti M., 2003, Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes, *Protein Science*, 12, 2312–2319p.
- Chrzanowska J., Bananas J., Kolaczowska M., 2001, Purification and characterization of *Beauveria bassiana* proteinases, *Acta Biotechnol.*, 21, 73-81p.

- Cihangir N., ve Sarıkaya E., 2003, *Aspergillus* Sp.'den Lipaz Enzimi Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, TÜBİTAK, MİSAG-168 numaralı proje, 13,20s.
- Copeland R.A., 2000, A Brief History of Enzymology, ENZYMES – A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Secon Edition, Wiley-VHC A John Wiley & Sons Inc., 1-10p.
- Corzo G., and Revah S., 1999, Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681, Bioresource Technology 70, 173-180p.
- Cunha G.A., Fernández-Lorente G., Bevilaqua V.J., Destain J., Paiva C.M.L., Freire G.M., Fernández-Lafuente R., Guisán M.J., 2008, Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase – a Comparison of Stability of Physical Adsorption and Covalent Attachment Techniques, Appl. Biochem. Biotechnol., 146, 49-56p.
- Çaylı G., ve Küsefoğlu S., 2008, Increased yields in biodiesel production from used cooking oils by a two step process: Comparison with one step process by using TGA, Fuel Processing Technology, 89, 118-122p.
- Dalmau E., Montesinos J.L., Lotti M., Casas C., 2000, Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*, Enzyme and Microbial Technology 26, 657-663p.
- D'Annibale A., Sermanni G. G., Federici F., Petruccioli M., 2006, Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production, Bioresource Technology, 97, 1828-1833p.
- Dizge N., ve Keskinler B., 2008, Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase, Biomass And Bioenergy, 32, 1274–1278p.
- Falch E.A., 1991, Industrial enzymes – developments in production and application, Biotech. Adv. 9, 643-658p.
- Fujino S., Akiyama D., Akaboshi S., Fujita T., Watanabe Y., and Tamai Y., 2006, Purification and characterization of phospholipase B from *Candida utilis*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70 (2), 377-386p.
- Geon-Ho L., Bae J-H., Suh M-J., Kim I-H., Hou C.T., and Kim H-R., 2007, New Finding and Optimal Production of a Novel Extracellular Alkaline Lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178, J. Microbiol. Biotechnol., 17(6), 1054-1057p.

- Ginalska G., Cho H-Y., Cho N-S., Bancercz R., Kornilowicz T., Leonowicz A., Shin S-J. and Ohga S., 2007, Effect of Culture on Growth and Lipase Production by A newly Isolated Strain, *Geotrichum*-like R59 (Basidiomycetes), J. Fac. Agr. Kyushu Univ., 52 (1), 29-34p.
- Guisan M.J., 2006, Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins, Methods In Biotechnology – Immobilization of Enzymes and Cells - Second Edition, Edited by Jose M. Guisan, Humana Press Inc., 1p.
- Hadeball W., 1991, Production of Lipase by *Yarrowia lipolytica* I. Lipases from Yeasts (Review), Acta Biotechnol., 11, 2, 159-167p.
- Hasan F., Shah A. A., Hameed A., 2006, Industrial applications of microbial lipases, Enzyme & Microbial Technology, 39, 2, 235-251p.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A., 2009, Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review, Biotechnology Advances, 27, 782-798p.
- Hatzinikolaou D., Macris J.B., Christakopoulos P., Kekos D., Kolisis F.N., and Fountoukidis G., 1996, Production and Partial Characterisation of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, 18, 547-552p.
- Horton H.R., Moran L. A., Ochs R. S., Rawn J. D., Scrimgeour K. G., 1993, Principles of Biochemistry, Neil Patterson Publishers/Prentice-Hall Inc., 57p.
- Hou T.C., 2002, Industrial Uses of Lipase, Lipid Biotechnology, Edited by Tsung Min Kuo and Harold W. Gardner, Marcel Dekker Inc., 390-400p.
- Hsu A-F., Jones K., Foglia T.A., and Marmer W.N., 2002, Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel, Biotechnol. Appl. Biochem., 36, 181–186p.
- Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Aurich A., Perevoznikova O.A., Shishkanova N.V., Stottmeister U., and Finogenova T.V., 2005, Lipase Secretion and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast Grown on Animal and Vegetable Fat, Food Technol. Biotechnol. 43 (2) 113–122p.
- Karakoç B.Ş., 2004, Bazı Matrikslere Tutuklanmış *Aspergillus niger*'den Gibberellik Asit Üretimi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 30-43s.


- Kim S.S., Kim Y. J., Rhee I., 2001, Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674, *Arch Microbiol.*, 175, 458-461p.
- Knight K., Pimentel M. do C.B., Camargo de Moraes M.M., Ledingham W.M., de Lima Filho J. L., Maia M. de M.D., 2000, Immobilization of Lipase from *Fusarium solani* FS1, *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:220-222p.
- Kurtzman C.P., 1999, *The Yeasts, A Taxonomic Study, Fourth Edition*, Edited by Cletus P. Kurtzman and Jack W. Fell, Elsevier Science B.V., 385, 420-421p.
- Lanciotti R., Gianotti A., Baldi D., Angrisani R., Suzzi G., Mastrocola D., Guerzoni M. E., 2005, Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater, *Bioresource Technology*, 96, 317-322p.
- Lee D.H., Park C.H., Yeo J.M., and Kim S.W., 2006, Lipase Immobilization on Silica Gel Using a Cross-linking Method, *J. Ind. Eng. Chem.*, Vol. 12, No. 5, (2006) 777-782p.
- Litwack G., 1960, *Experimental Biochemistry, A Laboratory Manual*, John Wiley & Sons Inc., 247-253p.
- Lopes M., Araújo C., Aguedo M., Gomes N., Gonçalves C., Teixeira J.A., and Belo I., 2009, The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect, *J Chem Technol Biotechnol*; 84: 533–537p.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. Randal R. J., 1951, Protein measurement with the folin reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275p.
- Mahadik N.D., Puntambekar U.S., Bastawde K.B., Khire J.M., Gokhale D.V., 2002, Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 38, 715-721p.
- Magnan E., Catarino I., Paolucci-Jeanjean D., Preziosi-Belloy L., Belleville M.P., 2004, Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability, *Journal of Membrane Science* 241, 161–166p.
- Matsuo T., Kobayashi T., Kimura Y., Hosoda A., Taniguchi H., Adachi S., 2008, Continuous synthesis of glyceryl ferulate using immobilized *Candida antarctica* lipase, *Journal of Oleo Science*, 57 (7), 375-380p.

- Mhetras N.C., Bastawde K.B., Gokhale D.V., 2009, Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207, *Bioresource Technology* 100 (2009) 1486–1490p.
- NITE, 2004, National Institute of Technology and Evaluation, NITE Biological Resource Center, Catalogue Detail Information, <http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBR C&CAT=00001658>, <http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBR C&CAT=00001195>.
- NITE, 2005, National Institute of Technology and Evaluation, NITE Biological Resource Center, Sequence Information, <http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/SequencSearchServlet?ID=NBRC&CA T=00001195&DNA=6>
- Rahman R.N.Z.R.A., Leow T.C., Salleh A.B. and Basri M., 2007, *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia, *BMC Microbiology*, 7:77p.
- Reetz T. M., 2006, Practical Protocols for Lipase Immobilization Via Sol-Gel Techniques, *Methods In Biotechnology – Immobilization of Enzymes and Cells - Second Edition*, Edited by Jose M. Guisan, Humana Press Inc., p65-74p.
- Rezenka T., 1991, Overproduction of Microbial Lipids and Lipases, *Folia Microbiologica* 36 (3), 211-224p.
- Rifaat H.M., El-Mahalawy A.A., El-Menofy H.A., and Donia S.A., 2010, Production, Optimization and Partial Purification of Lipase from *Fusarium oxysporium*, *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, V (N): 70-84p.
- Saxena R.K., Sheoran A., Giri B., Davidson S.W., 2003, Purification strategies for microbial lipases, *Journal of Microbiological Methods*, 52, 1-18p.
- Saxena R.K., Davidson W.S., Sheoran A., Giri B., 2003, Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*, *Process Biochemistry* 39, 239-247p.
- Scioli C. and Vollaro L., 1997, The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters, *Wat. Res.* Vol 31, No 10, 2520-2524p.
- Seitz W.E., 1974, Industrial Applications of Microbial Lipases: A Review, *Journal of The American Oil Chemists' Society*, Vol 51, 12-16p.

- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C., 2001, Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, 19, 627-662p.
- Stead D., 1986, Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses, *Journal of Dairy Research*, 53, 481-505p.
- Steele D.B. and Stowers M.D., 1991, Techniques for selection of industrially important microorganisms, *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 89-106p.
- Sugihara A., Tani T., Tominaga Y., 1991, Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp., *Journal of Biochemistry*, 109, 211-216p.
- Sun S.Y., Xu Y., and Wang D., 2009, Purification and biochemical characterization of an intracellular lipase by *Rhizopus chinensis* under solid-state fermentation and its potential application in the production of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84: 435–441p.
- Svendsen A., 2000, Lipase Protein Engineering, *Biochimica et Biophysica Acta*, 543, 223-238p.
- Sztajer H., Maliszewska I. And Wieczorek J., 1988, Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes, *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 492-497p.
- Thomson C.A., Delaquis J.P., and Mazza G., 1999, Detection and measurement of microbial lipase activity: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(2): 165-187p.
- Uhlig H., 1998, *Industrial Enzymes and Their Applications*, Translated and Updated by Elfriede M. Linsmainer – Bednar., John Wiley and Sons. Inc.
- Vahklu J. and Kour A., 2006, Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 9, No. 1, 69-85p.
- Yalçın K.S., 2007, *Yarrowia lipolytica* İle Sitrik Asit Üretimine Etki Eden Çeşitli Parametrelerin İncelenmesi ve Bazı Endojen Maya Suşlarının Sitrik Asit Üretim Kapasitelerinin Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 37s.



- Yano Y., Oikawa H., Satomi M., 2008, Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast *Yarrowia lipolytica*, *International Journal of Food Microbiology*, 121, 302-307p.
- Yu M., Qin S., Tan T., 2007, Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*, *Process Biochemistry*, 42, 384-391p.
- Zeng J., Du W., Liu X., Liu D., Dai L., 2006, Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43, 15–18p.
- Zhu L.Y., Zong M.H., Wu H., Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation, *Bioresource Technology*, 99, 7881–7885p.

K İ Ş İ S E L	Ad, Soyad:	<b>Özgür KEBABCI</b>	
	Adres:	Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı 06800 Beytepe / ANKARA	
	Telefon:	GSM : +90 533 6584047	
	E-mail Adresi:	<a href="mailto:ozgur_kebabci@yahoo.com">ozgur_kebabci@yahoo.com</a> <a href="mailto:ozgur.kebabci@gmail.com">ozgur.kebabci@gmail.com</a>	
	Dogum Tarihi:	03.02.1975	
D E N E Y İ M	Mevcut İş:	<b>HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ , Ankara</b> Araştırma Görevlisi Sorumlu Olduğu Dersler: Genel Mikrobiyoloji I & II , Tıbbi Mikrobiyoloji, Parazitoloji Laboratuvar Pratiği *Endüstriyel Enzimler üzerine yüksek lisans tamamladı...	
	Deneyim:	<b>Y. Lisans Tezi:</b> Yeni Mikrobiyal Kaynaklardan Proteaz Eldesi ve Özelliklerinin Saptanması.	
	Projeler:	<b>Tübitak Projesi:</b> Yeni Mikrobiyal Kaynaklardan Proteaz Eldesi ve Özelliklerinin Saptanması.	
	Kurslar:	<b>2 Mayıs –3 Ağustos 2007:</b> JICA (Japonya Uluslararası İşbirliği Ajansı) tarafından yürütülen KOBİ'lerin Gelişimi İçin Teknik Destek I (Biyoteknoloji/Plastik Teknolojisi) Grup Eğitim programı, Osaka Municipal Technical Research Institute (OMITRI) – JICA – Japonya  <b>4-8 Eylül 2000:</b> Tanıda DNA Teknikleri IV. Yaz Okulu (Summer Work) Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.	
	Sempozyumlar:	<b>23-24 Ekim 2000:</b> Küreselleşme Sürecinde Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Sempozyumu, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, T.C. Çevre Bakanlığı ve Biyoteknoloji Derneği tarafından düzenlenmiştir. * Sempozyumda hem katılımcı hem de görevli olarak yer almıştır.	
	Kongreler:	<b>23-27 Haziran 2008, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi:</b> <i>Claviceps purpurea</i> 'dan Ergot Alkaloid Üretim Optimizasyonu, Trabzon (Poster Sunumu)  <b>25-29 Ağustos 2003, XIII. Biyoteknoloji Kongresi:</b> Toprak İzolatı Yeni Bacillus sp'den Proteaz Eldesi ve Enzimolojik Özelliklerinin Saptanması, (Sözlü Sunum)  <b>25-29 Ağustos 2003, XIII. Biyoteknoloji Kongresi:</b> Topraktan Proteolitik Aktiviteye sahip Fungus İzolasyonu. (Poster Sunumu)  <b>17-21 Eylül 2001, XII. Biyoteknoloji Kongresi:</b> Tarımsal Toprak ve Su Kaynaklarından Proteaz Sentezleyen Mikroorganizma İzolasyonu ve Büyüme Koşullarının Optimizasyonu. (Poster Sunumu) * Kongrede hem katılımcı hem de görevli olarak yer almıştır.	
E Ğ İ T İ M	Eğitim:	<b>Yüksek Lisans</b>	
	Doktora:	<b>Hacettepe Üniversitesi (2010)</b>	
	Bölüm:	Biyoteknoloji Anabilim Dalı	
	Yüksek Lisans:	<b>Hacettepe Üniversitesi (2003)</b>	
	Bölüm:	Biyoteknoloji Anabilim Dalı	
	Üniversite:	<b>Hacettepe Üniversitesi (1998)</b>	
	Bölüm:	Biyoloji	
	Yabancı Diller:	<b>İngilizce</b> (Çok İyi) ve <b>Japonca</b> (Başlangıç)	
Bilgisayar:	Hacettepe Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi Bilgisayar Okuryazarlığı Sınavı Başarı Belgesi WINDOWS 9X,ME,XP/Vista ve MS OFFICE 97/2000/XP/2003/2007		

